

Estudio de sistemas membranales por Langmuir-Blodgett y Langmuir-Schaefer e incorporación de nanopartículas magnéticas

Sebastián Gaviria Martínez y Daniel Ignacio Sánchez Hernández

Trabajo de Grado para optar el título de Ingeniero Químico

Directora:

Luz Marina Ballesteros Rueda

Ingeniera Química, MSc, Ph. D

Codirectora:

Pilar Cea Minguez

Doctora en Ciencias Universidad de Zaragoza

Tutor:

Johan Camilo Herrera Tarazona

Ingeniero Químico

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Físicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2023

Dedicatoria

Al creador de todas las cosas, al que me ha dado la fortaleza para continuar cuando he estado a punto de caer y me ha dotado con el don de la vida, salud y gracia, por cada una de sus infinitas bendiciones que me han permitido abrir las puertas para llegar hasta aquí; por ello, con toda la humildad que mi corazón puede emanar, dedico primeramente este trabajo a Dios.

A mis amados padres, Héctor y Leila, por y para quien soy, mis principios, mis valores, mi perseverancia y mi tenacidad. A ustedes, que son la brújula que orienta mi vida, mi apoyo incondicional, quienes día a día me enseñan el valor y la recompensa que llega al asumir riesgos, y de quienes siempre he recibido no solamente palabras de aliento cuando mis días eran grises sino esa fuerza y confianza intransigente por explotar mis habilidades. Todo esto, con una dosis incuantificable de amor y sin pedir nada a cambio.

A mi querida tía Nidia, mi segunda mamá, por estar siempre para mí, por apoyarme, cuidarme y brindarme su cariño a través de los años.

A mi abuela Blanquita, por darme el amor más puro, bonito, leal y desinteresado del mundo.

A mis demás familiares, por ser partícipes en cada una de mis etapas y por apoyarme con el mayor de los ánimos. Gracias por ofrecerme su amor, por tenerme en sus oraciones y bríndame sus actos de generosidad y amabilidad.

A Ana María, Valeria, Daniel, Isabel, Laura, Valentina, Camila y Nathalia, mis amigos, mis colegas, mis compañeros de fatiga, de viaje y ahora de vida, gracias por su apoyo cuando los momentos eran difíciles.

A Daniel Ignacio, mi compañero de trabajo de grado, dos polos opuestos que compaginaron para que esto fuera posible y que gracias a esta aventura que emprendimos juntos hicimos un lazo de hermandad.

Desde mi corazón para ustedes ¡Gracias!

Sebastian Gaviria Martínez

A Dios, por tantas bendiciones, por darme la vida y por dejarme nacer en este país maravilloso y en mi familia, porque gracias a todas estas circunstancias pude estar en el lugar adecuado en el momento adecuado y poderme enterar de esta pasantía.

A mi madre, geñita, porque día a día me has dado todo lo que has podido y más, por ser tan maravillosa conmigo, aunque tal vez un poco más estricta de lo que merezco, siempre me has dado la fuerza para seguir adelante, muchas gracias por estar ahí y nunca abandonarme,

Te amo madre

A mi nonita que desde allá en el cielo sé que me cuida y espero estar haciéndola sentir orgullosa.

A mi hermano, por siempre subirme el ánimo y siempre sacarme mis más sinceras carcajadas, deseo que logres grandes cosas hermanito y siempre podrás contar conmigo, aunque no hablemos todos los días siempre estaré ahí para ti.

A mi Amor hermoso a mi Richi por llegar a mi vida y hacerme olvidar que el mundo existe, gracias por todo tu apoyo, contigo comprendí lo que en verdad es sentirse completo, Te amo y te agradezco infinito por el gran sacrificio que hiciste para ir a visitarme a España ya que yo la estaba pasando muy mal y nadie más me comprendía, gracias a ti y mi madre pude salir de mi primera y única crisis de ansiedad la cual no le deseo a nadie. Los amo demasiado.

A mis amigos, Sofi, Angy, Kleiver, Leidy, Sandri, Erick, Lau, Xio, Ronald, Cami y Natha por ayudarme cuando más lo necesité y por dejarme ser parte de sus vidas, siempre estaré ahí amigos créanme y discúlpenme si alguna vez los he ofendido, saben que yo solo quiero verlos felices, los quiero mucho y gracias por ser parte de mi vida.

A mis niñas, mis hijas, Azu y Panpan por siempre recibirme con miles de besos y abrazos cada que llego porque haberlas adoptado y hecho parte de nuestras vidas junto con richi ha sido la cosa más maravillosa que nos ha podido pasar, despedirme de ellas fue lo más difícil que he hecho y no lo quiero volver a repetir.

A mis nuevos amigos internacionales, al Simo, Andre, Savi, Pame y Dani, que fueron los mejores roomies que pude tener; y saber que llegué a ese apto por casualidad y lo repetiría mil veces con tal de volverlos a conocer, hacen parte de un pedacito de mi corazón ahora y siempre, están invitados a mi boda.

A todas las personas que nos han ayudado cuando más lo hemos necesitado, mil gracias porque para lograr esta pasantía sin morir en el intento, necesité de todos ustedes.

En especial a mi compañero de tesis el Sebs como yo le digo, muchas y muchas gracias sebas porque, aunque sabes que no contaba mucho lo que me estaba pasando siempre estuviste apoyándome en el lab; aunque a veces sentía que estaba haciendo poco y debía ayudarte más, sabes que como un gran equipo y de alguna forma nos repartíamos el trabajo equitativamente, espero poder seguir en contacto al menos para adelantar el chisme jijiji. Mil gracias.

Daniel I. Sánchez Hernandez

Agradecimientos

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

A la UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA por mantener el convenio con la UIS, el cual permitió llevar a cabo esta pasantía de investigación y en la que se enmarca este proyecto.

A la profesora LUZ MARINA BALLESTEROS RUEDA por la dedicación y apoyo que ha brindado a este proyecto, por confiar en nuestro trabajo, por el respeto a nuestras sugerencias e ideas y por la dirección y rigor que ha facilitado a las mismas. Gracias por hacernos partícipes del convenio realizado entre la UIS y la UNIZAR.

A la profesora PILAR CEA MINGUEZA, por abrirnos las puertas de su grupo de investigación, por compartir sus conocimientos de manera profesional e invaluable de este campo, por motivarnos e incentivar en nosotros un amor por la ciencia.

Al INSTITUTO DE NANOCIENCIA Y MATERIALES DE ARAGON y su personal de trabajo, en especial mención al LABORATORIO DE MICROSCOPIA AVANZADA por la utilización de sus equipos e instalaciones durante el desarrollo de esta pasantía de investigación.

A los profesores IGNACIO GASCÓN y SANTIAGO MARTÍN por su disposición y ayuda frente a nuestras cuestiones durante el primer mes de práctica en la Facultad de Ciencias.

A los integrantes del GRUPO DE INVESTIGACIÓN PLATÓN, por recibarnos con amabilidad y estar dispuestos a colaborarnos, en especial mención: Chema, Quique, Inés y Manuel.

A nuestras amigas NATHALIA MORENO y CAMILA CACERES, con quienes compartimos muchas alegrías, algunas tristezas, infinidades de recuerdos y varios “100 montaditos”. Sin su bondad, carisma, cariño, hermandad y amistad este reto no hubiera sido posible.

A nuestra querida MARIA PINO, por ser la alegría del despacho y contagiarnos de su energía. Gracias por dedicarnos su tiempo, por las largas y extenuantes jornadas de trabajo, apoyarnos cuando no teníamos ánimos y por abrirnos las puertas de su hogar para hacernos sentir en casa a pesar de la distancia. Extrañamos tu risa en los almuerzos.

A nuestra apreciada LAURA DOTOR, por asumir el rol de tutora de este TFG, por orientarnos, apoyarnos y ayudarnos durante la investigación. Gracias por enseñarnos España, hablar de mil ocurrencias durante el almuerzo y compartir la hora del café cuando los días eran eternos. Extrañamos ese siseo.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	12
1. Objetivos.....	14
1.1. Objetivo general	14
1.2. Objetivos específicos.....	14
2. Marco conceptual y Estado del arte	15
3. Metodología experimental	25
3.1. Materiales	25
3.2. Métodos.....	26
3.2.1. Fabricación de monocapas de Langmuir	27
3.2.2. Fabricación de películas Langmuir-Blodgett (LB).....	27
3.2.3. Fabricación de películas Langmuir-Schaefer (LS).....	29
3.2.4. Deposición de nanopartículas magnéticas (MNPs)	29
4. Resultados.....	31
5. Conclusiones.....	45
6. Recomendaciones	47
Referencias Bibliográficas	48
Apéndices.....	61

Lista de Tablas

Pág.

Tabla 1. Variación de la masa por medio de la microbalanza de cuarzo 41

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Esquema representativo de una isoterma de compresión genérica	19
Figura 2. Esquema de transferencia según la técnica de Langmuir-Blodgett y Langmuir-Schaefer	21
Figura 3. Esquemmatización de la unión covalente mediante química click bioortogonal de NPs magnéticas a la superficie de membranas celulares.....	23
Figura 4. Diagrama metodológico	26
Figura 5. Espectro FTIR-ATR de los glicoesfingolípidos: (a) GSL1, (b) GSL3 y (c) comparativa GSL1 y GSL3	31
Figura 6. Caracterización de las monocapas de los compuestos estudiados mediante: (a) isothermas presión superficial por área molecular (π -A) y (b) K_s - π de las monocapas estudiadas.....	34
Figura 7. Mezcla binaria DPPC-COL 1:1 transferida a $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$: (a) imagen topográfica de AFM de la película LB y (b) perfil de altura de la sección transversal (línea roja) y su Rq-RMS roughness	36
Figura 8. Película de GSL1 transferida a $8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ sobre la monocapa de DPPC:COL 1:1 por LS: (a) imagen topográfica de AFM, (b) esquema de las alturas y valores del recubrimiento extraídos del AFM, (c) vista 3D de las monocapas y (d) perfil de altura de la sección transversal (línea roja) y su Rq-RMS roughness	37
Figura 9. Película de GSL3 transferida a $8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ sobre la monocapa de DPPC:COL 1:1 por LS: (a) imagen topográfica de AFM, (b) esquema de las alturas y valores del recubrimiento extraídos del AFM, (c) vista 3D de las monocapas y (d) perfil de altura de la sección transversal (línea roja) y su Rq-RMS roughness	38

- Figura 10.** Comparación de las películas DPPC:COL 1:1 + GSL1 tras el proceso de incubación: (a y c) imagen topográfica de AFM con MNPs sin alquino sobre la película DPPC:COL 1:1 + GSL1 y (b y d) imagen topográfica de AFM con MNPs con alquino sobre la película de DPPC:COL 1:1 + GSL1 39
- Figura 11.** Comparación de las películas DPPC:COL 1:1 + GSL3 tras el proceso de incubación: (a y c) imagen topográfica de AFM con MNPs sin alquino sobre la película de DPPC:COL 1:1 + GSL3 y (b y d) imagen topográfica de AFM con MNPs con alquino sobre la película de DPPC:COL 1:1 + GSL3 40
- Figura 12.** Espectro de FTIR-ATR de DPPC-COL-GSL1 (a) antes y (b) después de la incubación con MNPs con alquino..... 42
- Figura 13.** Espectro de FTIR-ATR de DPPC-COL-GSL3 (a) antes y (b) después de la incubación con MNPs sin alquino..... 43
- Figura 14.** Espectro de FTIR-ATR de DPPC-COL-GSL3 (a) antes y (b) después de la incubación con MNPs con alquino..... 44

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Propiedades físicas y químicas de los compuestos	61
Apéndice B. Sustratos, reactivos y disolventes.....	63
Apéndice C. Cuba KSV NIMA 2003.....	65
Apéndice D. Limpieza de la cuba	70
Apéndice E. Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)	72
Apéndice F. Microbalanza de Cuarzo (QCM).....	78
Apéndice G. Imágenes de AFM de DPPC:COL 1:1 + GSL y su interacción con MNPs.....	81
Apéndice H. Cálculos de la Microbalanza de Cuarzo (QCM).....	84
Apéndice I. Espectrómetro de Infrarrojo por Transformada de Fourier en modo ATR (FTIR-ATR)	88
Apéndice J. Número de onda de los grupos funcionales	90
Apéndice K. Marcación de la mica.....	92

Resumen

Título: Estudio de sistemas membranales por Langmuir-Blodgett y Langmuir-Schaefer e incorporación de nanopartículas magnéticas*

Autor: Sebastián Gaviria Martínez, Daniel Ignacio Sánchez Hernández**

Palabras Clave: Membrana Celular, Nanopartículas Magnéticas, Langmuir-Blodgett, Langmuir-Schaefer, Microscopia de Fuerza Atómica, Microbalanza de Cuarzo, *Click Bioortogonal*, Espectroscopia de Infrarrojo.

Descripción: En los últimos años, los tratamientos convencionales contra el cáncer ocasionan efectos colaterales que repercuten en la vida del paciente. La terapia génica es una alternativa de alto interés en el área clínica para evitar tratamientos invasivos; sin embargo, el sistema de entrega no viral a través de la membrana celular presenta inconvenientes debido a la baja eficiencia de transfección al no lograr generar poros de tamaño adecuado y al tratarse de sistemas dinámicos y complejos que dificultan su estudio *in vivo*. Por lo tanto, es necesaria la fabricación de membranas celulares miméticas que permitan el estudio y control de sus componentes. En este trabajo de grado se fabricaron películas de Langmuir-Blodgett y Langmuir-Schaefer simulando membranas biológicas a partir de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatocolina (DPPC), colesterol (COL), glicoesfingolípido 1 (GSL1) y glicoesfingolípido 3 (GSL3) 10^{-4} M para depositar nanopartículas magnéticas (MNPs) de óxido de hierro funcionalizadas con polietilenglicol (PEG) y dibenzociclooctino (DBCO) mediante autoensamblaje con el fin de lograr una reacción química *click bioortogonal*. La caracterización de los procesos de fabricación de películas de Langmuir y deposición de MNPs se realizó usando microscopia de fuerza atómica (AFM), microbalanza de cuarzo (QCM) y espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR-ATR), de esta manera se busca evaluar la interacción MNPs/membrana y evidenciar los cambios en las membranas modeladas. Los resultados mostraron modelos de membranas celulares con alturas promedio entre 8 - 9 nm, de los cuales $\approx 5 - 6$ nm corresponden a la bicapa del DPPC-COL y $\approx 3 - 4$ nm de los GSL, mientras se evidenció que implementar MNPs funcionalizadas con DBCO y PEG generaban una organización poco homogénea sobre la superficie de la membrana. Finalmente, este trabajo proporciona información útil sobre la formación y simulación de membranas lipídicas soportadas de DPPC+COL+GSL; aunque deja el interrogante sobre la selectividad del proceso de deposición con las MNPs.

*Trabajo de grado

**Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directora: Luz Marina Ballesteros Rueda, Ingeniera Química, MSc, Ph.D. Codirectora: Pilar Cea Mínguez, Doctora en Ciencias. Tutor: Johan Camilo Herrera Tarazona, Ingeniero Químico.

Abstract

Title: Study of membrane systems by Langmuir-Blodgett and Langmuir-Schaefer and incorporation of magnetic nanoparticles*

Authors: Sebastián Gaviria Martínez, Daniel Ignacio Sánchez Hernández**

Keywords: Cell Membrane, Magnetic Nanoparticles, Langmuir-Blodgett, Langmuir-Schaefer, Atomic Force Microscopy, Quartz Microbalance, *Bioorthogonal Click*, Infrared Spectroscopy.

Description: In recent years, conventional cancer treatments cause side effects that impact on the patient's life. Gene therapy is an alternative of great interest in the clinical area to avoid invasive treatments. However, the non-viral delivery system through the cell membrane has drawbacks due to the low transfection efficiency because it does not generate pores of adequate size and because they are dynamic and complex systems that make it difficult to study *in vivo*. Therefore, it is necessary to manufacture mimetic cell membranes that allow the study and control of their components. In this degree work, Langmuir-Blodgett and Langmuir-Schaefer films simulating biological membranes were made from 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC), cholesterol (Chol), glycosphingolipid 1 (GSL 1) y glycosphingolipid 3 (GSL 3) 10^{-4} M to deposit magnetic nanoparticles (MNPs) of iron oxide functionalized with polyethylene glycol (PEG) and dibenzocyclooctyne (DBCO) by self-assembly to achieve a *bioorthogonal click* chemical reaction. The characterization of the Langmuir film fabrication and MNPs deposition processes was performed using atomic force microscopy (AFM), quartz microbalance (QCM), and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR-ATR), in order to evaluate the MNPs/membrane interaction and to evidence changes in the synthesised membranes. The result showed cell membranes with average heights between 8 – 9 nm, of which $\approx 5 - 6$ nm correspond to the DPPC-Chol bilayer and $\approx 3 - 4$ nm to the GSLs, while it was evidenced that implementing DBCO and PEG functionalized MNPs generated an inhomogeneous organization on the membrane surface. Finally, this work provides useful information on the formation and simulation of DPPC+Chol+GSL supported lipid membranes; however, it leaves a question mark on the selectivity of the deposition process with the MNPs.

*Degree work

**Faculty of Physicochemical Engineering. School of Chemical Engineering. Director: Luz Marina Ballesteros Rueda, Chemical Engineer, MSc, Ph.D. Co-director: Pilar Cea Mingueza, Doctor of Science. Tutor: Johan Camilo Herrera Tarazona, Chemical Engineer.

Introducción

En las últimas décadas, el estudio, comportamiento y simulación de la membrana celular ha representado una compleja y atractiva investigación en el marco de la nanociencia. De gran relevancia también son las propiedades que presentan los nanomateriales y como interactúan con la membrana celular debido a la amplia gama de aplicaciones en el campo de la salud. En la actualidad lograr avances novedosos en tecnología aplicable al área de la salud es motivo de interés para la academia. Además, la posibilidad de usar métodos y nanomateriales ha permitido obtener conocimientos en la simulación de membranas biológicas, el desarrollo de dispositivos biomiméticos para el diagnóstico, encapsulación de medicamentos y control en la administración de fármacos; haciendo parte de las principales investigaciones biotecnológicas con fines terapéuticos de diversas enfermedades asociadas con el trastorno de células o tejidos; es decir, el cáncer (Fitts et al., 2019; Peetla et al., 2009).

Los procedimientos convencionales del cáncer - quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, entre otras - generan efectos secundarios en la vida del paciente por la inadecuada distribución de medicamentos en el cuerpo causando anemia, alopecia, delirio, trombocitopenia, y otras muchas (Montero et al., 2005). Durante la última década, la terapia génica ha representado una alternativa para evitar tratamientos invasivos, aunque su aplicación conlleva a una baja eficiencia de transfección (Cortés C. & Ojeda G., 2020). La transfección se refiere a la introducción de ADN al interior de células eucariotas, y puede realizarse en sistemas virales y no virales suministrando los fármacos de forma controlada y localizada (Armenta Ruiz et al., 2006). La baja eficiencia en las metodologías de transfección no viral reduce el transporte de sustancias entre las células y el medio, limitando las aplicaciones terapéuticas. Una opción de aumentar la transfección

no viral es mejorar las condiciones de los poros de las membranas celulares por donde se trasfiere el material genético. Entre el 2017 – 2020 se desarrolló el proyecto MagicCellGene; hombro a hombro entre instituciones españolas y portuguesas, que tenía como objetivo utilizar nanopartículas magnéticas (MNPs) inmovilizadas covalentemente para inducir poros en la membrana celular con el fin de mejorar la transfección no viral (Grazú Bonavía et al., 2017). Parte del trabajo realizado en la Universidad de Zaragoza (UNIZAR) consistió en lograr la apertura de huecos en membranas modeladas con la finalidad de obtener una prueba de concepto que ratificase la hipótesis de partida. Es más, una vez demostrada esta prueba de concepto (Ruiz-Rincón et al., 2020) y dado que las MNPs con las que se ha trabajado no se depositan de forma selectiva sobre la membrana, se han prolongado las investigaciones más allá del proyecto inicial, en la búsqueda de MNPs que se depositen de forma selectiva a través de la química *click bioortogonal*. Asimismo, la Universidad Industrial de Santander (UIS) está aportando a esta línea de trabajo con contribuciones de estancias de investigación pasadas (Cortés C. & Ojeda G., 2020) y la que aquí se reporta realizadas por estudiantes de pregrado de Ingeniería Química.

De acuerdo con los aspectos mencionados y partiendo de todos los estudios sistemáticos acerca del comportamiento de la membrana celular, este trabajo de investigación se enfoca en la simulación, estudio y caracterización de membranas celulares por Langmuir-Blodgett y Langmuir-Schaefer, y la interacción con nanopartículas magnéticas de óxido de hierro funcionalizadas con el fin de lograr la química *click bioortogonal* entre las MNPs y los elementos de la membrana celular.

1. Objetivos

1.1. Objetivo general

Evaluar la interacción de los modelos de sistemas membranales con nanopartículas magnéticas funcionalizadas.

1.2. Objetivos específicos

- Analizar el efecto del método empleado para inmovilizar nanopartículas magnéticas en modelos de membrana celular sobre la distribución homogénea de esta.
- Evaluar la eficacia de incorporación en la membrana simulada de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con un grupo terminal alquino.

2. Marco conceptual y Estado del arte

El desarrollo e investigación de modelos de sistemas membranales, surge de la necesidad de comprender y modificar su funcionamiento para posibles aplicaciones en distintos campos de investigación, en las que principalmente se encuentra el área clínica.

Los sistemas membranales son un grupo de sistemas laminares comprendidos por diferentes tipos de modificaciones a una de las estructuras celulares más compleja y universal del ser vivo: las membranas celulares eucariotas, las cuales están formadas por una bicapa lipídica de unos 5 nm de espesor, que contiene una alta variedad de lípidos y proteínas transmembranales, integrales o periféricas (Cunill Semanat, 2017). Además, su composición depende del tipo de membrana. Un estudio publicado en el 2008 presenta que la membrana plasmática y algunos organelos celulares como el retículo endoplasmático, aparato de Golgi y mitocondria, están compuestos y representan la principal fuente de producción de fosfolípidos estructurales, glicerofosfolípidos (GLY), esfingolípidos (ES), esteroides (ST) y ceramidas (CE). Así mismo, se resalta que la composición de la membrana es heterogénea y temporal, y a su vez se modifica como consecuencia de la realización de sus funciones o en algunos casos por deficiencia nutricional. (Jiménez-Munguía et al., 2022; Van Meer Gerrit et al., 2008)

Por otra parte, las membranas celulares cumplen un papel esencial en los procesos celulares puesto que la magnitud del efecto xenobiótico sobre un organismo depende de la concentración del compuesto activo en el sitio de acción y entrada en las células, esto ocurre a través de la membrana plasmática mediante canales, proteínas transportadoras, pinocitosis o difusión, por lo que el efecto es limitado por la biodisponibilidad del compuesto y su transporte a través de estas (Dotor et al., 2023). Además, la membrana no solo brinda soporte mecánico, flexibilidad y movilidad sino

que también actúa como barrera de difusión gracias a su anfifilicidad, regulando su semipermeabilidad para la realización de procesos biofísicos y bioquímicos como: gemación, metabolismo, fusión-fusión celular, fagocitosis, intercambio molecular mediante gradientes electroquímicos y de concentración (Watson, 2015), transmisión y transducción de señales en el interior y exterior celular (Deamer, 2017; Lee, 2003; Penkauskas & Preta, 2019). Por lo tanto, es importante realizar estudios de su composición química, la distribución de sus constituyentes y las fuerzas que actúan sobre estos; sin embargo, realizar estudios de células *in vivo* es difícil debido a la complejidad de las mismas, así que para su comprensión se recurre a modelos de membranas celulares que permitirían estudiar y evaluar de una manera más sencilla todos estos procesos ocurridos entre un agente externo y la membrana a nivel molecular (Małgorzata, 2013; Wydro et al., 2011).

Para la fabricación de membranas biomiméticas se dispone de diferentes técnicas experimentales, unas a partir de células vivas como el método de cizallamiento de glóbulos rojos abiertos, el método hipotónico de lisiscentrifugación y la preparación de membrana plasmática de ovocitos (Cortés C. & Ojeda G., 2020); y otras metodologías que van desde el autoensamblaje hasta la formación por inducción eléctrica, como liposomas y vesículas (Anariba et al., 2003; Hane et al., 2009), monocapas insolubles de Langmuir y bicapas lipídicas soportadas sobre sustratos (Gerick & Huhnerfuss, 1995; Haro et al., 2005; Miyoshi & Kato, 2015; Ruiz-Rincón et al., 2017), entre otros (García-Manyes & Sanz, 2010). Actualmente, el control y rigurosidad en los modelos de sistemas membranales requieren de métodos precisos como la técnica de deposición de Langmuir-Blodgett (LB) y Langmuir-Schaefer (LS) puesto que producen bicapas altamente ordenadas y libre de defectos (Aroti et al., 2007; Ruiz-Rincón et al., 2017).

El fundamento de las técnicas mencionadas anteriormente se basa en la formación de monocapas en la interfase aire-agua descrita a finales del siglo XVIII por Benjamín Franklin, sirviendo de base para investigaciones futuras en este nuevo campo (Roberts & Swalen, 1990). Las contribuciones más importantes vinieron de parte de Irving Langmuir y Lord Rayleigh, confirmando que las capas de moléculas anfifílicas esparcidas sobre superficies acuosas (película de Langmuir) tienen el espesor de una capa molecular simple, con las moléculas orientadas en la superficie acuosa, con el grupo funcional polar inmerso en el agua y la cadena alifática situada casi perpendicular a la superficie (Ballesteros R, 2012). Estos experimentos apoyaron la hipótesis de la existencia de interacciones de corto alcance, y sirvieron de base para conocer la naturaleza de las moléculas que pueden formar estas películas.

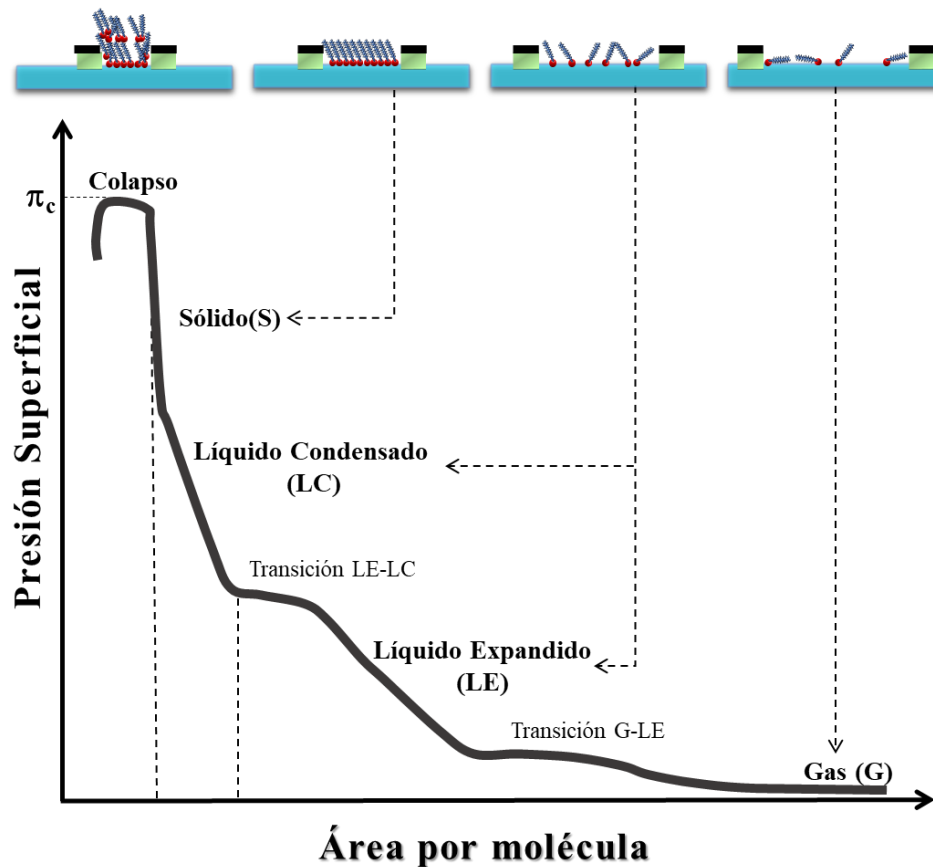
La técnica de Langmuir consiste en la dispersión de una solución en una cuba de Langmuir hecha de material hidrofóbico (generalmente teflón, para que no contamine la subfase acuosa y esta pueda formar el menisco convexo) que contiene una subfase líquida con una alta tensión superficial (generalmente se emplea agua ultrapura, filtrada y purificada por ósmosis inversa) donde las moléculas son ordenadas mediante una compresión en la superficie (Pérez & de la Rosa Cruz, 2010). Esta técnica se fundamenta en que las moléculas anfifílicas poseen una parte hidrofílica con grupos funcionales del tipo -OH, -COOH, -NH₂, etc. y una hidrófoba con una o varias cadenas hidrocarbonadas o fluorocarbonadas; que en conjunto les permite permanecer ancladas en la interfase aire-agua por la parte hidrófila y estabilizadas gracias a las interacciones de Van der Waals establecidas entre moléculas vecinas por la parte hidrofóbica (Černiukè et al., 2006). Además, las moléculas deben ser disueltas en un solvente volátil, inmiscible en agua y con coeficiente de extensión $S > 0$, para una dispersión espontánea de las moléculas sobre el agua (Ishii, 1998).

La técnica básica y ampliamente utilizada para la caracterización *in situ* de la película de Langmuir es la isoterma de presión superficial-área por molécula ($\pi - A$), que representa el cambio de la presión (una medida de la disminución de la tensión superficial, es decir, un análogo bidimensional a la presión) en función del área disponible para cada molécula en la superficie de la subfase acuosa. La medición suele realizarse en condiciones de pseudoequilibrio, comprimiendo continua y lentamente la monocapa mientras se controla la presión superficial. La medida de la presión superficial durante la compresión de la monocapa se suele realizar usando el método del platillo de Wilhelmy, que permite cuantificar las fuerzas que actúan sobre el platillo, las descendentes como la gravedad y tensión superficial, y las ascendentes, como la flotabilidad debida al desplazamiento del agua (Dynałowicz-Łatka et al., 2001; Wilhelmy, 1863).

La isoterma de Langmuir provee información sobre las fases y transiciones de fase en la monocapa (ver **Figura 1**): G (fase gaseosa, cuando las moléculas están lo suficientemente separadas para que las fuerzas de cohesión sean despreciables), G-LE (coexistencia de la fase gas-líquido expandido), LE (fase de líquido expandido, en la que existe ciertas fuerzas atractivas entre las moléculas), LE-LC (coexistencia de la fase líquida expandida y fase líquida condensada), LC (fase líquida condensada, en la que las moléculas empiezan a estar cada vez más junta), S (fase sólida, donde la película es muy rígida y las cadenas hidrófobas forman un empaquetamiento compacto) y colapso (Adamson, 1997; Dotor Delgado, 2020). La monocapa colapsa debido a que se supera el valor mínimo de área física real que ocupa la molécula, esta ruptura de la monocapa puede dar lugar a la formación de multicapas (no homogéneas y desordenadas) o pérdida del material dentro de la subfase.

Figura 1.

Esquema representativo de una isoterma de compresión genérica



Nota. Representación de la presión superficial versus área por molécula para una molécula anfifílica sencilla donde se indica esquemáticamente las fases y el punto de colapso. Adaptado de (Adamson, 1997; Ballesteros R, 2012).

Es importante señalar que el número y la complejidad de las fases observadas en la isoterma varían en función del sistema estudiado y de las condiciones experimentales en las que se realiza la isoterma (concentración, temperatura, velocidad de compresión, pH, presencia de sales, entre otros) (Adamson, 1997; Davies, 1963), por tal motivo, la isoterma de la **Figura 1** es una forma idealizada de las diferentes fases para una sustancia anfifílica simple. La presión de colapso es característica de cada material, puesto que, si los compuestos de una mezcla binaria o ternaria son inmiscibles, se espera un colapso intermedio al comportamiento de los compuestos puros; por el

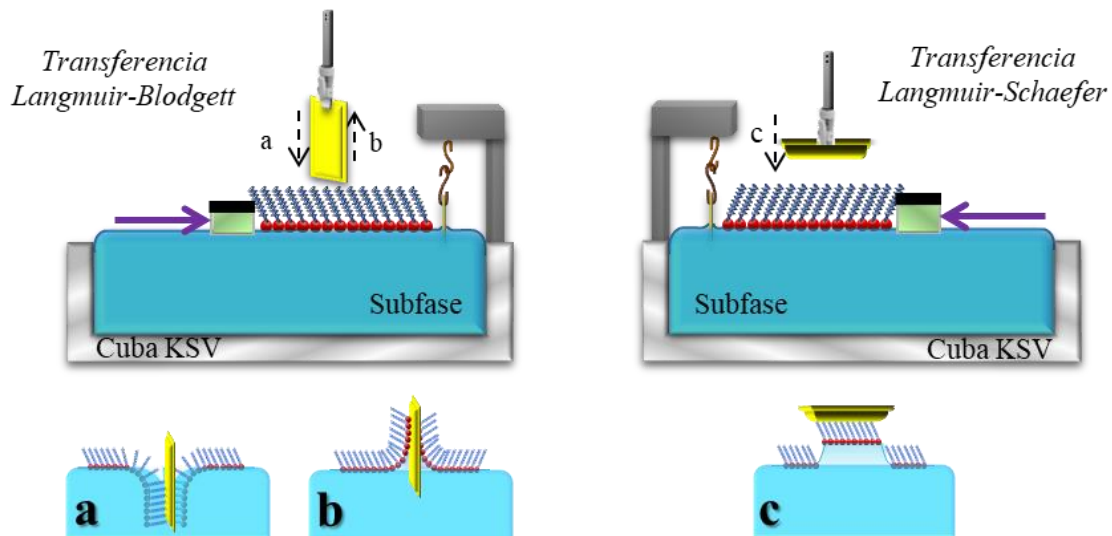
contrario, si son miscibles se mostrará solo un colapso a una presión diferente de la de los compuestos puros (Zhao et al., 2004).

Una monocapa de Langmuir en la interfase aire-agua puede ser transferida sobre un soporte sólido tal como vidrio, silicio, mica, cuarzo, oro, entre otros. Este tipo de metodología recibe los nombres de deposición por Langmuir-Blodgett (LB) o Langmuir-Schaefer (LS), siendo estos los métodos más utilizados para depositar películas. Sin embargo, en la bibliografía se reportan otros métodos de transferencia como el método de Kossi y Leblanc (Batty et al., 1995; Kossi & Leblanc, 1981) que combina la deposición vertical y de contacto, o la deposición ultrarrápida, una análoga del método LB que permite obtener películas no homogéneas e irregulares muy útiles en el campo de sensores de gases tóxicos.

El término de Langmuir-Blodgett hace referencia a monocapas que se han transferido sobre un sustrato que se mueve vertical a la película de Langmuir. El sustrato es emergido a una velocidad suficientemente lenta como para permitir el acople de los fosfolípidos en la interfase al sustrato. Este proceso de deposición corresponde a la técnica LB y constituye el primer paso para la formación de la membrana (ver **Figura 2.b**) (Kurniawan et al., 2018). Por otro lado, la técnica de deposición por LS posee el mismo principio, pero la deposición no se da por la inmersión/emersión en vertical del sustrato, sino que éste es aproximado a la interfase de manera totalmente horizontal o paralela a la película de Langmuir (ver **Figura 2.c**). Generalmente, ambas metodologías se usan en conjunto para la fabricación de membranas celulares modelo, es decir, la monocapa interior es acoplada por LB y la monocapa exterior por LS con el fin de evitar problemas de desorción (Ruiz-Rincón, 2015). Además, la ventaja de usar ambas técnicas es la posibilidad de controlar en cada paso la transferencia para reproducir las condiciones biológicas necesarias (Zasadzinski et al., 1991).

Figura 2.

Esquema de transferencia según la técnica de Langmuir-Blodgett y Langmuir-Schaefer



Nota. Esquema representativo para la transferencia de monocapas sobre sustratos sólidos por: (a) inmersión Langmuir-Blodgett, (b) emersión Langmuir-Blodgett y (c) deposición Langmuir-Schaefer. Adaptado de (Ballesteros R, 2012).

Por otra parte, con la preparación y caracterización de modelos de LB-LS por métodos de deposición de Langmuir, se pueden alcanzar altas calidades si se tiene un control exhaustivo de parámetros tales como la rugosidad, limpieza, velocidad de inmersión y emersión del sustrato, control constante en la presión superficial, fase lipídica, humedad, pH y temperatura (Kurniawan et al., 2018). Así mismo, para lograr resultados apropiados, es necesario contar con la instrumentación especializada para llevar a cabo las deposiciones y adicionalmente, debe existir un paso previo de limpieza exhaustiva con el fin de evitar variaciones y afectaciones en la transferencia de masa desde la interfase agua-aire hacia la superficie del sustrato (Carrión, 2016).

La inmovilización de las membranas celulares sobre diferentes soportes sólidos uniformes y poco rugosos como la mica plana para la caracterización detallada de la misma, soportes de silicio poroso para estudios de permeabilidad de la membrana y demás (Ruiz-Rincón, 2015),

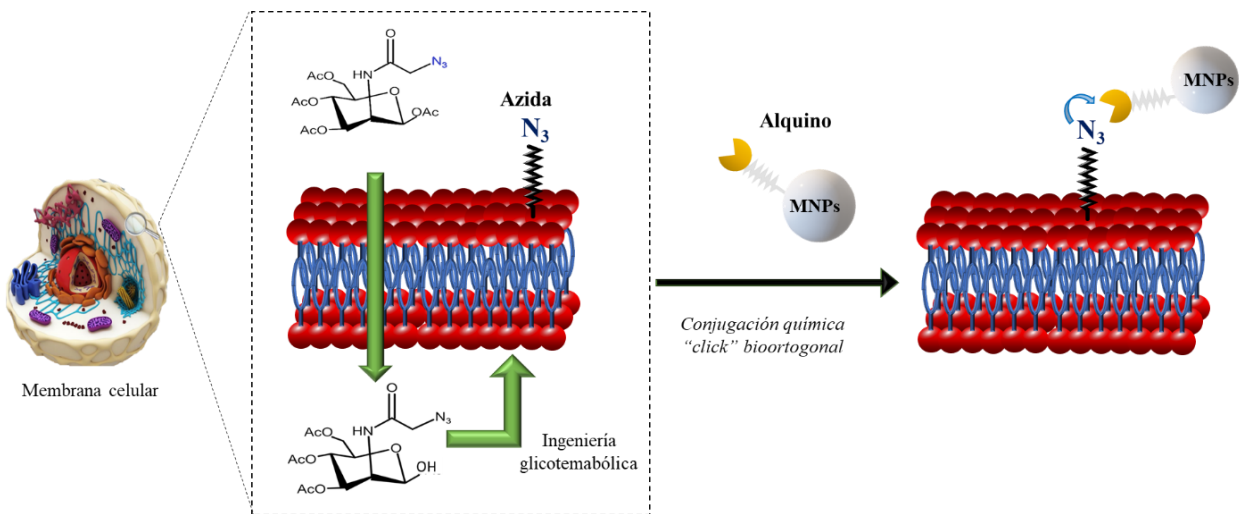
permite seguir reacciones y cambios en la superficie del sistema membranal con resolución molecular mediante técnicas como la Microscopia de Fuerza Atómica (AFM) (ver **Apéndice E**) y la Microbalanza de Cuarzo (QCM) (ver **Apéndice F**) que proporcionan información de las nanoestructuras de la monocapa formada, propiedades mecánicas de la membrana biomiméticas, así como la interacción de la membrana con nanopartículas (Shan & Wang, 2015). Sin embargo, dependiendo del principio por el cual está basado la técnica de caracterización, se puede obtener información diferente sobre las bicapas. En el caso de los métodos ópticos, unos proveen información de la masa seca absorbida o desorbida, tal como es el caso de Elipsometría, y otros como la Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR) refleja un espectro que permite analizar las propiedades fisicoquímicas y el espesor de la monocapa formada (Herrera & Coronado, 2020).

Desde que, en 2001, K. Barry Sharpless definió el término de la química *click* como un “conjunto de reacciones potentes, rápidas, selectivas y de alto rendimiento” (Kolb et al., 2001), esta estrategia se ha logrado implementar en varios campos del conocimiento destacándose la ciencia de los materiales, la química orgánica y la biotecnología (Arseneault et al., 2015; Patterson et al., 2014). Una de las metodologías en la que se da este fenómeno químico es la cicloadición [3+2] entre azidas y alquinos catalizados por cobre Cu(I) (CuAAC) (Agard et al., 2004). Tanto los alquinos como los azidas son grupos pequeños que no perturban el sistema biológico, puesto que los enlaces formados son altamente estables y rígidos, manteniendo la conformación de la biomolécula. Sin embargo, el efecto citotóxico del cobre en la reacción hace difícil el uso de este tipo de química en presencia de células *in vivo* / *in vitro* (Idiago-López et al., 2021). Como alternativa a la reacción clásica, se desarrolló la cicloadición [3+2] entre azidas y alquinos tensionados (SPAAC) (ver **Figura 3**) como ciclooctinos con la necesidad de eliminar el uso del

cobre como catalizador; a esta nueva estrategia se le denominó la química *click bioortogonal* (Idiigo-López et al., 2022; Roca et al., 2009).

Figura 3.

Esquematzación de la unión covalente mediante química click bioortogonal de NPs magnéticas a la superficie de membranas celulares



Nota. Unión covalente de NPs magnéticas a la superficie de membranas celulares mediante química *click bioortogonal*. Adaptado de (Herrero, 2018).

En investigaciones anteriores, se han aprovechado las propiedades de nanopartículas magnéticas para el desarrollo de aplicaciones biomédicas (Clemons et al., 2019; Materón et al., 2021; Mosayebi et al., 2017); por lo que se ha hecho uso de MNPs de óxido de hierro ferrimagnéticas funcionalizadas con grupos ciclooctino con el fin de inmovilizarla sobre membranas celulares mediante reacción química *click bioortogonal* (Gawali et al., 2021). Esta reacción se presenta cuando las MNPs cumplen con las características apropiadas y se produce una unión covalente entre los grupos funcionales, tal que se anclan a la membrana celular ya simulada, para posterior aplicación de un campo magnético externo (Ruiz-Rincón et al., 2020).

A pesar de tener ya muchas aplicaciones en biología y bioquímica, el uso de la química *click bioortogonal* para unir covalentemente nanomateriales a membranas celulares apenas se ha explorado hasta la fecha y no se ha descrito ningún ejemplo del uso de esta metodología para unir NPs a membranas de células vivas. En el grupo de investigación Platón donde se ha realizado el presente trabajo de grado, se ha planteado recientemente el uso de la química *click bioortogonal* como herramienta para inmovilizar MNPs en la superficie del modelo del sistema membranal. Esto se conseguiría a través del empleo de un GSL que incorpora el grupo azida en la superficie de la membrana celular simulada, para que posteriormente reaccione con un grupo alquino presente en las nanopartículas funcionalizadas y de esta manera, ocurra la reacción.

3. Metodología experimental

3.1. Materiales

En este trabajo se han utilizado disoluciones de Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), Colesterol (COL) y dos tipos de Glicosfingolípidos sintéticos (GSL), el GSL1 (C₄₈H₉₃NO₈) y el GSL3 (C₄₈H₉₂N₄O₇) para la elaboración de modelos de membranas celulares (ver propiedades físicas y químicas en **Apéndice A**). Las cantidades apropiadas de los compuestos se disolvieron en cloroformo para preparar soluciones madre de 10⁻⁴ M en 50 mL de acuerdo con los estudios realizados por el grupo consolidado Platón (Ruiz-Rincón et al., 2017).

Para la limpieza de la cuba se emplea etanol (EtOH), acetona (C₃H₆O) y cloroformo (CHCl₃). La subfase acuosa empleada para la dispersión es agua ultrapura (sistema de purificación *Millipore* Milli-Q con resistividad 18,2 M Ω·cm). Para fabricar membranas celulares simuladas se ha usado una mezcla del fosfolípido DPPC y COL en una relación molar 1:1 según los parámetros encontrados en la investigación de (Chiodini et al., 2020) sobre el estudio del módulo de Young y el área de exceso en función de la presión superficial y las fracciones molares. Se ha seleccionado DPPC por ser uno de los componentes principales de las membranas celulares, representa en mayor proporción los tensioactivos pulmonares y por su carga neutra en la preparación de liposomas. Por otro lado, se ha empleado el COL por su trascendental papel en la membrana celular al ser un componente activo en la fluidez de esta, aumenta la densidad de empaquetamiento, reduce defectos en el orden estructural de la cadena de fosfolípidos, así como regula el mecanismo que controla la asimetría de los fosfolípidos en la membrana.

Las películas LB se depositaron sobre sustratos de mica proporcionados por *Electron Microscopy Sciences Company* y sustratos de cuarzo recubierto por oro utilizados en la

microbalanza de cuarzo, provenientes de *Standford Research Systems*. Todos los reactivos utilizados se han adquirido en la casa comercial *Sigma-Aldrich*. Para más información sobre los reactivos, disolventes y sustratos ver **Apéndice B**.

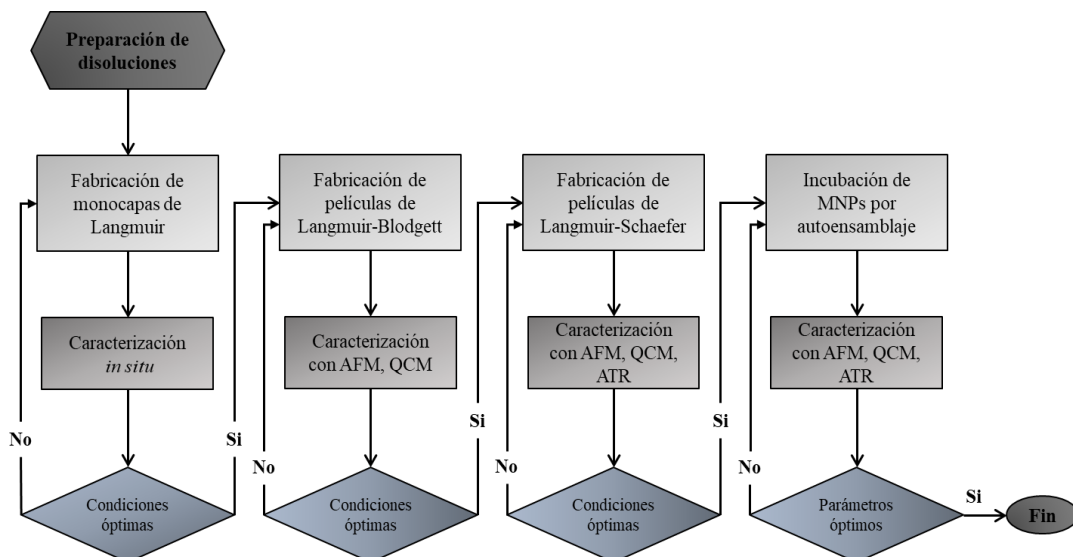
Los glicosfingolípidos sintéticos (GSL) utilizados en este trabajo de grado fueron sintetizados por el grupo de Daniel B.Werz (con afiliación Albert-Ludwings-Universität Freiburg, Germany al comienzo de la colaboración pero cuya afiliación actual es University of Freiburg, Germany); estos glicosfingolípidos están formados por un monosacárido, cuya molécula es una β -D glucosa que es una D-glucopiranososa con configuración β en el centro anomérico (Schütte et al., 2014). Las nanopartículas de hierro fueron sintetizadas y funcionalizadas por el grupo *Bionanosurf* del Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA) (Idiago-López et al., 2021, 2022).

3.2. Métodos

La metodología desarrollada en el presente trabajo se ilustra en la Figura 4.

Figura 4.

Diagrama metodológico



3.2.1. Fabricación de monocapas de Langmuir

Las isothermas de presión superficial-área por molécula ($\pi - A$) se registraron en una subfase de agua Milli-Q utilizando una cuba de teflón NIMA-KSV (ver **Apéndice C**) (Biolin Scientific, 2020) a una temperatura constante ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) en una sala semilimpia. Se siguió un protocolo de limpieza exhaustivo antes de cada experimento (ver **Apéndice D**).

En todos los experimentos se utilizó un área inicial constante por molécula ($129 \text{ \AA}^2 \cdot \text{molécula}^{-1}$) dispersando sobre la superficie del agua 1000 μL de la disolución que contiene el compuesto a estudiar. La dispersión se realiza con la ayuda de una micro-jeringa de Hamilton, gota a gota, a una distancia cercana a la superficie sin llegar a generar contacto agua-gota-jeringa para así asegurarse de que estas no caigan al fondo y no muy cerca del papel del platillo de Wilhelmy, evitando la contaminación de este y que la presión de la balanza no supere los $1 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ ya que puede limitar la formación de monocapas estables de Langmuir al afectar la estructura y orden de las moléculas al disipar el solvente. Después de la dispersión, se deja evaporar el solvente durante al menos 15 minutos antes de iniciar la compresión de la película con las barreras de la cuba moviéndose a una velocidad constante de $10 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$. Conforme se comprimen las barreras, la formación de la monocapa provoca un cambio de la presión superficial medida mediante el método de Wilhelmy. La representación de este cambio durante la compresión de las moléculas permitió obtener isothermas de presión superficial-área por molécula ($\pi - A$) de los compuestos puros y la mezcla binaria para identificar la estabilidad de la monocapa en la interfase aire-agua. Todas las isothermas se repitieron al menos tres veces para confirmar su reproducibilidad.

3.2.2. Fabricación de películas Langmuir-Blodgett (LB)

Las películas de Langmuir se transfirieron sobre sustratos de mica y QCM, empleados en la microbalanza de cuarzo. Las placas de mica, que son hidrofílicas, se cortaron en trozos de

aproximadamente $1 \times 1 \text{ cm}^2$ y fueron exfoliadas con cinta adhesiva antes de su posterior uso para generar superficies planas con una muy baja rugosidad; en cambio, los sustratos de QCM nuevos se dejan en EtOH/H₂O (24 horas), se lavan con CHCl₃ (12 horas) y se secan con nitrógeno (N₂) para poder depositar monocapas LB. En el caso de sustratos de QCM usados previamente en algún experimento, se emplea una solución de ácido sulfúrico (H₂SO₄) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), denominada “solución piraña” en proporción 3:1. Dado que la mezcla es un potente agente corrosivo y oxidante, descompone los restos de material orgánico que posee el sustrato, aumenta la hidrofiliidad y la energía superficial debido al mayor número de grupos funcionales disponibles como resultado de la acción sinérgica de sus componentes. Esto significa que la solución también puede disolver fácilmente los tejidos y la piel, pudiendo causar graves daños y quemaduras químicas en caso del contacto involuntario (Santos et al., 2022; Wang et al., 2017), por lo que deben tomarse las debidas precauciones en su manejo.

La transferencia de la monocapa de DPPC-COL en la interfase aire-agua sobre el sustrato sólido, se hace a una presión constante de $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ por el método de inmersión vertical y a una velocidad de compresión de las barreras de $6 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$. En todos los casos, la transferencia se realizó a una velocidad constante de $1 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$, a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y una humedad de $50 \pm 10\%$. Las muestras obtenidas se secan por 24 h y posteriormente se guardan en viales hasta su caracterización mediante Microscopia de Fuerza Atómica (ver **Apéndice E**) y Microbalanza de Cuarzo (ver **Apéndice F**).

Para ser capaces de volver a los mismos sitios antes y después de las deposiciones de las MNPs, es importante marcar el sustrato. El marcaje del sustrato consiste en cuatro cuadrados externos de $30 \mu\text{m}$ de lado, distanciados por $100 \mu\text{m}$ y cuatro cuadrados internos de $3 \mu\text{m}$ de lado, distanciados por $30 \mu\text{m}$; las marcas tienen 80 nm de altura de los cuales 75 nm son de cobre, Cu y

5 nm de cromo, Cr. Estas marcas sobre la mica se realizan mediante técnicas físicas de deposición de vapor del metal en cuestión en sala blanca del Laboratorio de Microscopía Avanzada (LMA). Las marcas actúan como referencia en el proceso de caracterización por AFM (ver **Apéndice K**).

3.2.3. Fabricación de películas Langmuir-Schaefer (LS)

La incorporación de los GSL sobre la membrana celular se obtuvo transfiriendo la monocapa por la técnica Langmuir-Schaefer sobre una cara de los sustratos que están dispuestos de forma horizontal (paralelo a la superficie del agua) a una presión superficial de $8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Las muestras obtenidas se secan por 24 h y posteriormente se guardan en viales hasta su caracterización con AFM y QCM.

3.2.4. Deposición de nanopartículas magnéticas (MNPs)

Sobre las películas de LS se busca una deposición específica de nanopartículas magnéticas (MNPs) formadas por magnetita [Fe_3O_4] y maghemita [Fe_2O_3] con un diámetro de 12 nm cada una y características hidrofílicas, funcionalizadas con un grupo alquino terminal y sin alquino (para ensayos de control) con el propósito de que se produzca una reacción química *click bioortogonal* entre las azidas y alquinos presentes en la membrana celular simulada, demostrando así su especificidad.

En la literatura, uno de los recubrimientos de NPs empleados con frecuencia es la sílice, ya que es un material que forma una cubierta de diferentes grosores alrededor del núcleo magnético de las NPs y su carga negativa, hacen que estas sean dispersables y muy estables en soluciones acuosas (Lozano Ocaña et al., 2022). Para ello se han seleccionado dos tipos de MNPs, unas derivatizadas con cadenas de polietilenglicol (PEG) y grupos dibenzociclooctino (MNP-alquino); y su control correspondiente a la que no se ha incorporado dicho grupo (MNP-control). Estas nanopartículas han sido mostradas con más detalle en (Idiago-López et al., 2022).

Se hace uso de un recubrimiento con polietilenglicol (PEG) ya que es utilizado para mejorar la eficiencia en el suministro de fármacos y genes a las células (Suk et al., 2016) y el recubrimiento con dibenzociclooctino (DBCO) porque presenta una cinética de reacción rápida y ayuda a disminuir la carga negativa para conseguir el decrecimiento de los grupos carboxilos [-COOH] libres en la superficie de las NPs (Moreno, 2017).

La incorporación de las MNPs en fase acuosa en la monocapa formada por el GSL se lleva a cabo por el procedimiento de autoensamblaje. La incubación de MNPs se hizo en un vial al que se le ha hecho una limpieza previa con EtOH, agua Milli-Q y secado con N₂. Se ubica la mica o sustrato de QCM de tal forma que la parte superior sea la que contenga el GSL. La concentración de partida de las MNPs fue de 0,04 mg Fe·mL⁻¹ que se conserva en refrigeración, por lo que es necesario dejar atemperar antes de incubar. Se debe asegurar que toda la superficie de los sustratos quede bien cubierta; se sella el vial con papel aluminio para evitar pérdidas por evaporación del solvente y se deja incubar por el tiempo designado, para el caso en cuestión 1 h de acuerdo con los estudios previos realizados por el grupo de investigación (Idiago-López et al., 2022; Ruiz-Rincón et al., 2020). Después del periodo de incubación, se retira el material en exceso haciendo 10 lavados con agua Milli-Q y se deja secar por 24 h a temperatura ambiente.

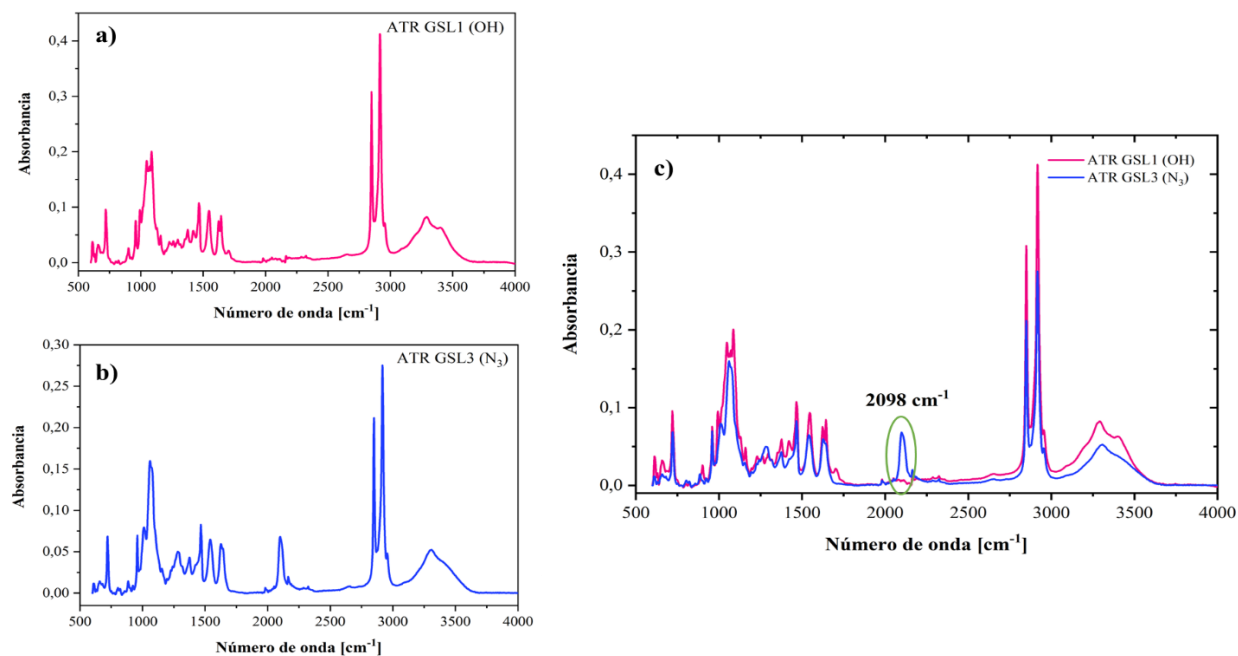
Posteriormente se realiza un estudio topográfico con el AFM y de recubrimiento superficial con la QCM, en donde se intentará estudiar si las MNPs funcionalizadas con alquino presentan un anclaje a la membrana formada con el glicosfingolípido que contiene el azida empleando las MNPs funcionalizadas sin alquino como ensayo de control. Para verificar el anclaje también se hizo uso de la Espectroscopia de Infrarrojo mediante el modo ATR (ver **Apéndice I**).

4. Resultados

Con objeto de caracterizar los grupos funcionales presentes en el GSL1 y el GSL3, se procedió a realizar sus espectros ATR. En este caso, ambos compuestos tienen una estructura base similar, con la diferencia que el GSL1 posee un grupo hidroxilo (-OH) en el carbono 6 del anillo piranosa, mientras que el GSL3 posee un grupo azida (-N₃). Según la literatura los grupos funcionales como el -OH se presentan en números de onda de 3670 a 3580 cm⁻¹ y el azida en números de onda de 2170 a 2080 cm⁻¹ (Long, 2004).

Figura 5.

Espectro FTIR-ATR de los glicosfingolípidos: (a) GSL1, (b) GSL3 y (c) comparativa GSL1 y GSL3



Tal y como se esperaba, en la **Figura 5** se aprecia la diferencia entre los espectros con/sin el grupo funcional debido a la aparición de una banda característica en torno a los 2098 cm⁻¹ correspondiente al grupo azida del GSL3 (**Figura 5.b**), mientras que en la **Figura 5.a** esta banda no aparece.

En la **Figura 6** se presentan las isothermas de los compuestos puros que involucran la variación de la presión superficial (π) en función del área por molécula (A) y los gráficos $K_s - \pi$ de las monocapas estudiadas. Se evidencia una disminución del área por molécula a medida que aumenta la presión, hasta un comportamiento del colapso para el DPPC, COL, GSL1 y GSL3. Se realizaron tres isothermas por compuestos y se concluyó que eran reproducibles, además, las isothermas π - A de las monocapas DPPC y COL son conocidas, y las presentadas son acorde a las reportadas en la literatura (Ruiz-Rincón, 2021).

Para ampliar el estudio de la monocapa, durante este trabajo, se calculó el módulo elástico (K_s) para cada uno de los compuestos puros a partir de los datos de la isoterma $\pi - A$ siguiendo la **(Ec. 1)** (Dotor et al., 2023):

$$K_s = -A \cdot \left(\frac{\delta\pi}{\delta A} \right)_T \quad (\text{Ec. 1})$$

La **Figura 6.b** muestra el módulo de Young o modulo elástico, K_s , frente a la presión superficial para la monocapa de Langmuir del DPPC, COL, GSL1 y GSL3. Esta gráfica proporciona información adicional sobre las transiciones de fase que tienen lugar en la monocapa a lo largo del proceso de compresión en la interface aire-agua. El análisis se hizo según la aproximación de David y Rideal, donde los K_s comprendidos entre 10 - $50 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ corresponden a la fase LE, los valores de K_s comprendidos entre 100 - $250 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ se da una fase LC y los valores hasta $1000 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ corresponde a la fase S (Davies, 1963).

Para la monocapa de COL, el despegue de la isoterma ocurre a $0,34 \text{ nm}^2\cdot\text{molécula}^{-1}$ aproximadamente. Mas allá de este punto, la presión superficial aumenta sin ningún cambio a medida que se comprime la película, hasta alcanzar el colapso a los $45 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. En el gráfico $K_s - \pi$, la transición entre LE-LC puede observarse a una presión superficial baja, de $1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, y

la transición entre las fases LC-S se produce a unos $13 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. El K_s máximo alcanzado para el COL fue de $565 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

En el caso del DPPC, el despegue de la isoterma se produce aproximadamente en $0,8 \text{ nm}^2\cdot\text{molécula}^{-1}$. El cambio de pendiente entre $5 - 9 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ es indicativo de una transición de fase de LE-LC. Finalmente el colapso ocurre a $60 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. En la **Figura 6.b**, la fase LC se alcanza a unos $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. El K_s máximo es de $194 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

Con respecto a la monocapa del GSL1, el despegue de la isoterma se produce a los $0,67 \text{ nm}^2\cdot\text{molécula}^{-1}$, este dato denota el primer valor del área por molécula en el que puede detectarse la presión superficial durante el proceso de compresión. El cambio de pendiente entre $0,35 - 0,5 \text{ nm}^2\cdot\text{molécula}^{-1}$ indica una transición de fase de G-LE; a partir de este valor la presión superficial aumenta monótonamente hasta alcanzar el colapso a unos $55 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. En el gráfico $K_s - \pi$, la fase LC se logra a los $15 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, alcanzando un K_s máximo de $225 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, cerca del límite entre las fases LC-S.

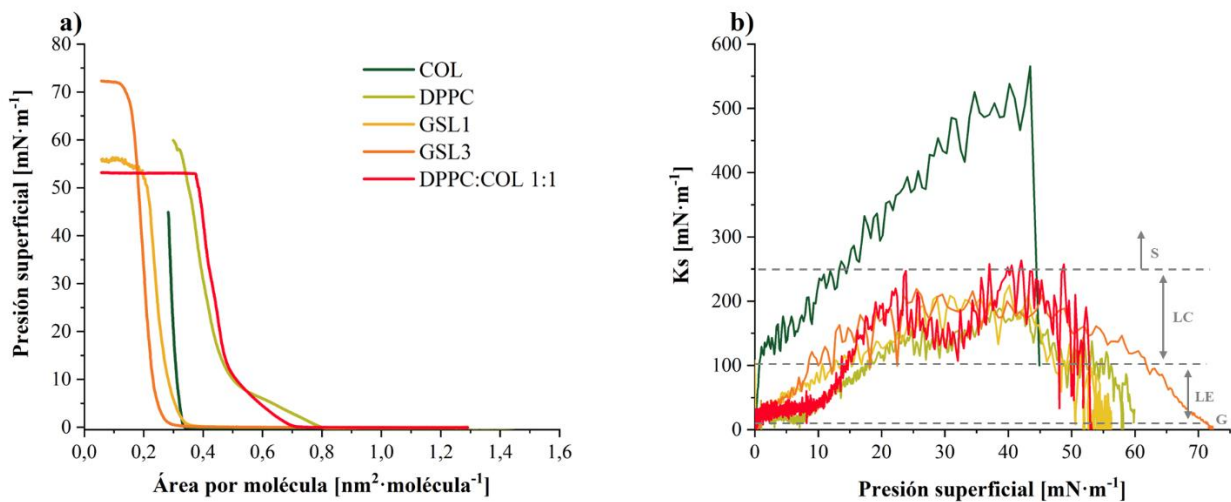
El despegue de la isoterma del GSL3 se evidencia a los $0,4 \text{ nm}^2\cdot\text{molécula}^{-1}$. El cambio de pendiente a $0,3 \text{ nm}^2\cdot\text{molécula}^{-1}$ es indicativo de una transición de fase de G-LE, mientras que a $8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ se observa una transición de fase de LE-LC. Esto puede verse mejor en la **Figura 6.b**, por debajo de $8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, K_s es de unos $110 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (fase LE), mientras que por encima de $15 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, K_s alcanza un máximo de $220 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Finalmente, el colapso ocurre a $70 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

De acuerdo con el sistema binario DPPC:COL 1:1, la adición de COL a DPPC da lugar a una isoterma más condensada que se asemeja a la isoterma obtenida para una monocapa única de COL (aumento constante de la presión). Esto se ajusta a observaciones preliminares en las que se sabe que el COL influye en la fluidez de la membrana lipídica al aumentar el orden estructural de

las cadenas alquílicas del fosfolípido (Miyoshi & Kato, 2015; Redondo-Morata et al., 2012; Vist & Davis, 1990), mostrando en cambio un efecto contrario en los fosfolípidos en fase gel (Hung et al., 2007; Reis et al., 1996; Róg et al., 2009).

Figura 6.

Caracterización de las monocapas de los compuestos estudiados mediante: (a) isothermas presión superficial por área molecular (π -A) y (b) K_s - π de las monocapas estudiadas



En conclusión, el COL presenta los valores más altos de K_s , es decir, la fase más comprimida. El DPPC, GSL1 y GSL3 presentan valores intermedios de K_s , con lo cual la monocapa permanece en la fase LC sin alcanzar la fase S.

Después de realizar la caracterización *in situ* de los compuestos puros y la mezcla binaria; las películas de DPPC: COL 1:1 se transfirieron a $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ para formar la monocapa LB; la elección de esta presión de transferencia se hizo de acuerdo con los estudios termodinámicos previos realizados por el grupo de investigación Platón (Ruiz-Rincón, 2021). También se tuvo en consideración, los datos reportados en la literatura, donde a este valor de presión se simula mejor la fuerza lateral ejercida en las membranas biológicas (Chapman, 1988; Grage et al., 2022). Para evaluar la calidad de las monocapas formadas por LB, se tuvo en cuenta la ratio de transferencia

(TR). Una TR próxima a 1 indica que el material presenta una buena adherencia al sustrato y, por ende, mejor es el proceso de transferencia. El valor de TR se calcula mediante la (Ec. 2) (de Oliveira et al., 2017):

$$\tau = \frac{A_L}{A_S} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde A_L es la disminución del área ocupada por las moléculas en la interfase aire-agua (a presión constante) y A_S es el área del sustrato cubierta por la monocapa. En este trabajo, este valor se determinó directamente sobre el proceso de transferencia con la ayuda del software de la cuba NIMA-KSV. El TR para una sola monocapa de DPPC:COL 1:1 sobre sustratos de mica fue de 1.

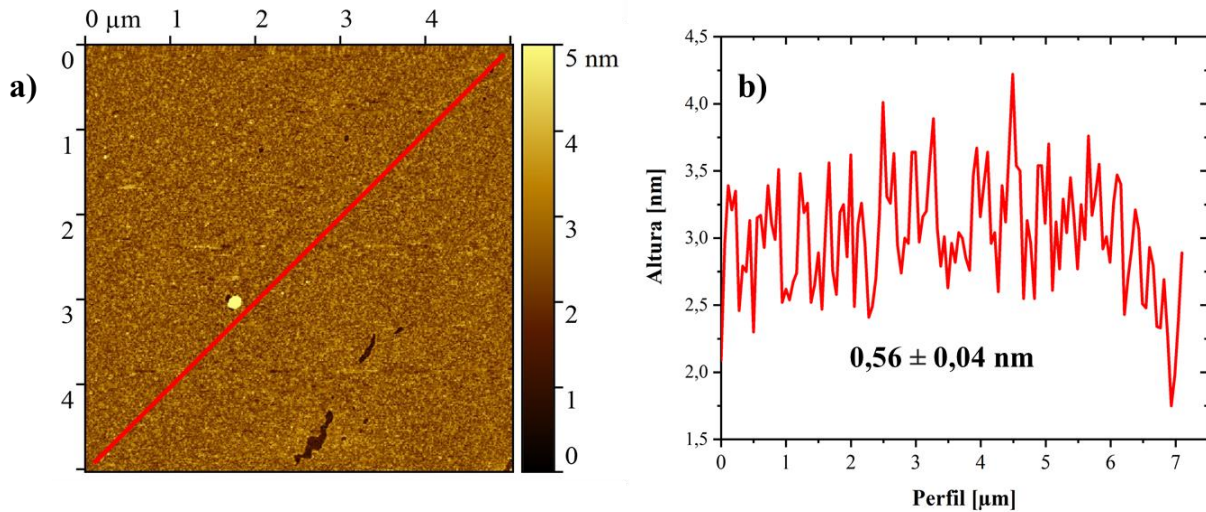
Posteriormente, se realizó un estudio sistemático de las características topográficas por medio de AFM. Para el análisis de esta sección, se tuvo en cuenta las longitudes de las moléculas de DPPC, COL y GSL, siendo 2,4 nm, 1,6 nm y 6,6 nm respectivamente. Cabe resaltar que las películas de DPPC:COL 1:1 son muy homogéneas, sin presencia de agregados tridimensionales (Ruiz-Rincón et al., 2017).

La **Figura 7.a** muestra una imagen topográfica de AFM representativa de una película LB de DPPC:COL 1:1, esta revela que la mezcla binaria es realmente homogénea y libre de defectos. Lo anterior se analiza de acuerdo con el valor de la raíz cuadrática media de la rugosidad (Rq-RMS roughness, acrónimo en inglés *root mean square*), obteniéndose un valor de $0,56 \pm 0,04$ nm para la monocapa inicial. Esto evidencia la buena miscibilidad entre el DPPC y COL en una proporción molar 1:1, presente en las células eucariotas. En la **Figura 7.b** se presenta el perfil de altura de la diagonal principal; se observan dominios que poseen una altura de 1,5 nm

aproximadamente con respecto a la región menos profunda de la monocapa, dos parches de zonas oscuras correspondientes a mica sin recubrir.

Figura 7.

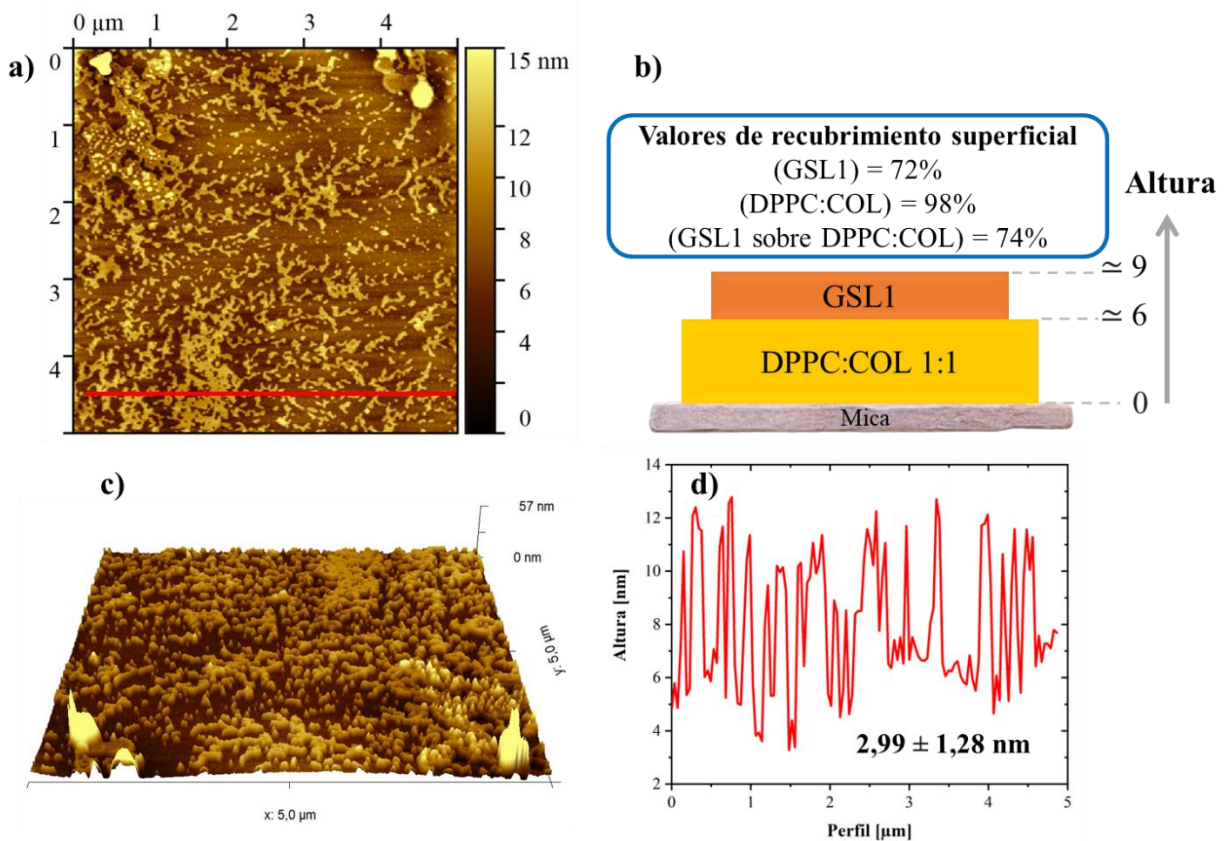
Mezcla binaria DPPC-COL 1:1 transferida a $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$: (a) imagen topográfica de AFM de la película LB y (b) perfil de altura de la sección transversal (línea roja) y su R_q -RMS roughness



Se analizó la topografía de la transferencia de los glicosfingolípidos sobre la monocapa de DPPC:COL 1:1 tal y como se observa en la **Figura 8**, la cual muestra la imagen topográfica de AFM en zona rica de GSL; se observa una tonalidad más oscura correspondiente a la monocapa de DPPC:COL, regiones claras cubiertas con el GSL1 y parches o agregados sin interactuar con otro compuesto. Estimando el nivel de recubrimiento superficial obtenido, se evidencia que toda la superficie está cubierta con DPPC:COL, con un 98% y en torno al 72% de la superficie esta recubierta con GSL1, correspondientes a las zonas más claras del AFM. Si se determina la relación entre ambos porcentajes, se obtiene que un 74% de la muestra contiene el GSL1 sobre la bicapa base del DPPC: COL. En la **Figura 8.d** se muestra las diferentes alturas obtenidas y el perfil de sección transversal.

Figura 8.

Película de GSL1 transferida a $8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ sobre la monocapa de DPPC:COL 1:1 por LS: (a) imagen topográfica de AFM, (b) esquema de las alturas y valores del recubrimiento extraídos del AFM, (c) vista 3D de las monocapas y (d) perfil de altura de la sección transversal (línea roja) y su R_q -RMS roughness



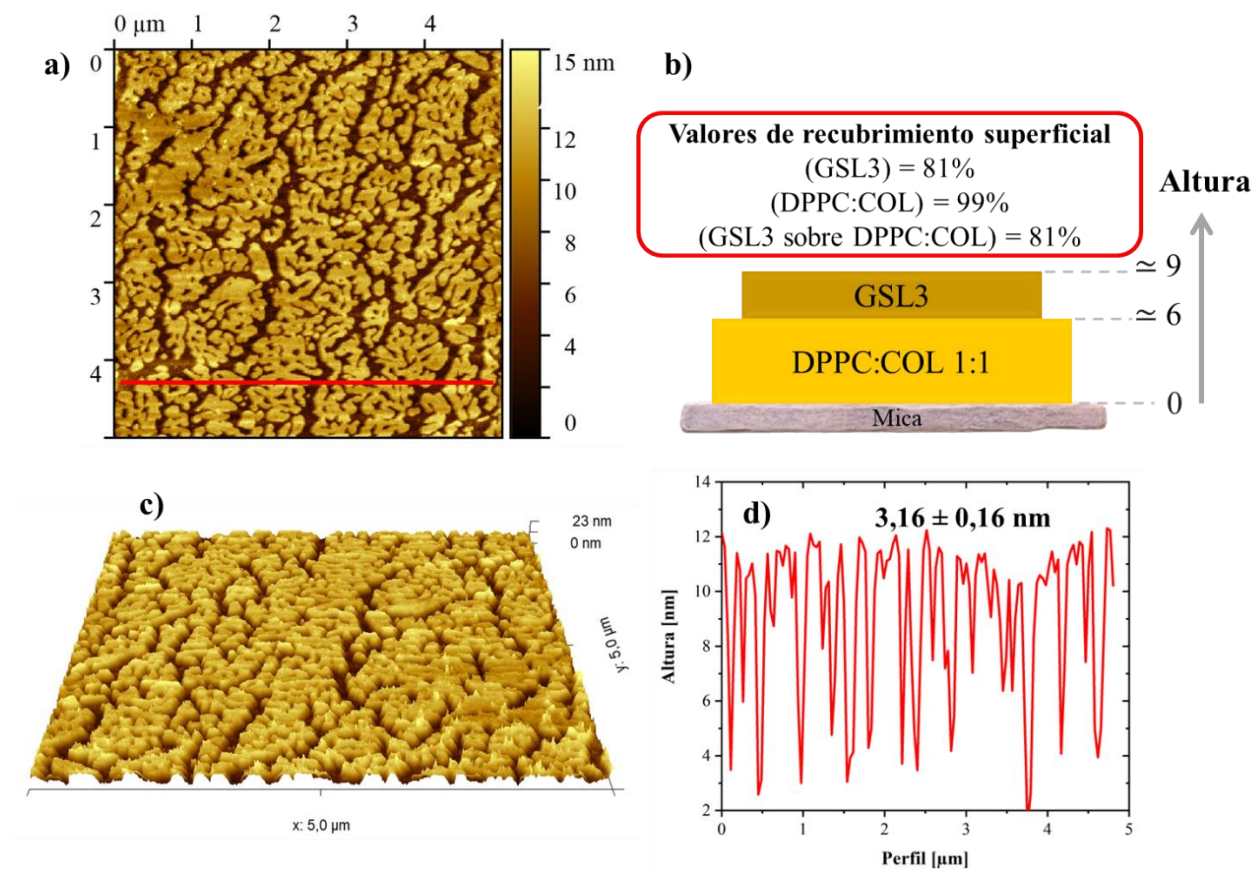
Por otro lado, para el caso del GSL3 (ver **Figura 9**), se observan zonas claras con mayor deposición sobre la bicapa del DPPC:COL, obteniéndose un porcentaje de recubrimiento del 99% para el DPPC:COL y un 81% para el GSL3. Haciendo la relación entre ambos porcentajes, se obtiene que un 81% de las muestras abarcan el GSL3 sobre el DPPC:COL.

Con la incorporación de los glicosfingolípidos, los modelos de membranas celulares alcanzaron alturas promedio entre 8 - 9 nm, de los cuales $\approx 5 - 6$ nm corresponden a la bicapa del

DPPC-COL formada por el reordenamiento espontaneo de las moléculas al ponerse en contacto con el medio acuoso de la transferencia de los GSL; y $\approx 3 - 4$ nm de los GSL.

Figura 9.

Película de GSL3 transferida a $8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ sobre la monocapa de DPPC:COL 1:1 por LS: (a) imagen topográfica de AFM, (b) esquema de las alturas y valores del recubrimiento extraídos del AFM, (c) vista 3D de las monocapas y (d) perfil de altura de la sección transversal (línea roja) y su Rq -RMS roughness

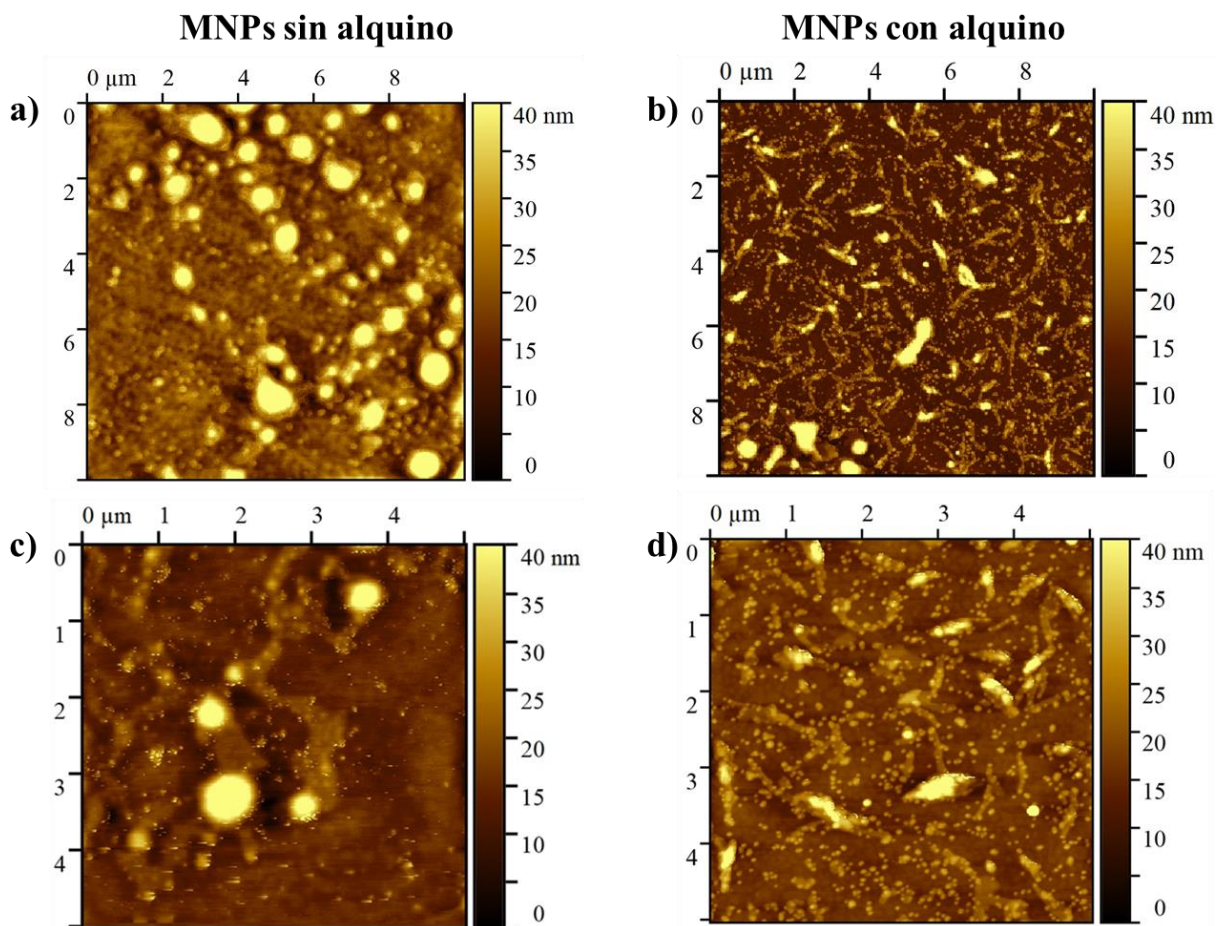


Para los experimentos de control, se incubaron NPs con y sin alquino por 1 h sobre las membranas simuladas. Para ello, se han seleccionado imágenes de AFM de dimensiones de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ y $10 \times 10 \mu\text{m}^2$. En la **Figura 10** y **Figura 11** se presentan las comparativas entre las muestras DPPC:COL 1:1 + GSL1 y DPPC:COL 1:1 + GSL3.

En la **Figura 10**, se evidencia que la deposición de las MNPs es el resultado de una adsorción inespecífica en la superficie de ambos casos en cuestión. La **Figura 10.b-d** corresponde a las MNPs con alquino, en este plano se esperaba la NO unión covalente de las mismas con el GSL1 puesto que no posee el grupo funcional (azida). Además, se observa que la interacción de las NPs genera aglomerados en la membrana con alturas aproximadas de 40 – 50 nm.

Figura 10.

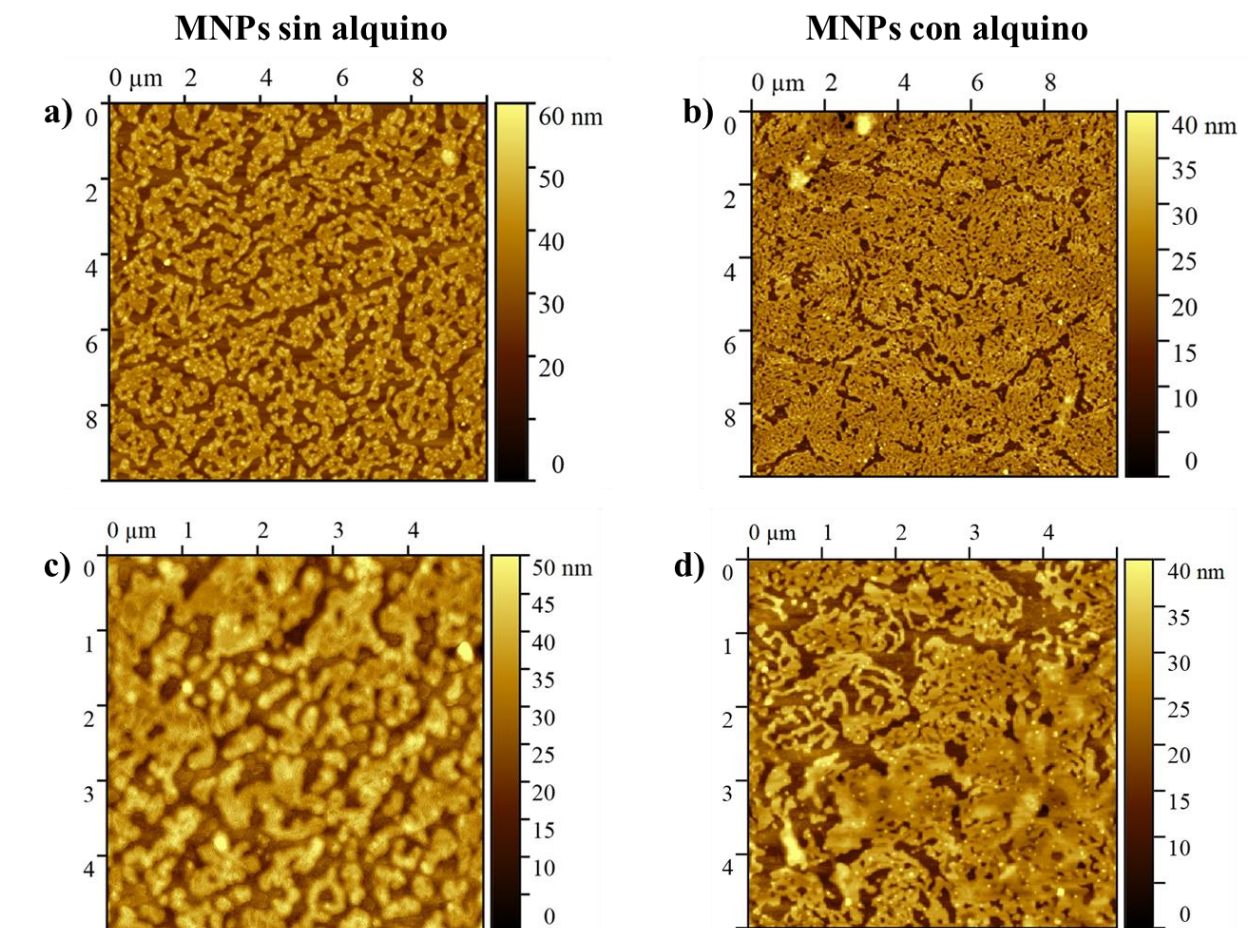
Comparación de las películas DPPC:COL 1:1 + GSL1 tras el proceso de incubación: (a y c) imagen topográfica de AFM con MNPs sin alquino sobre la película DPPC:COL 1:1 + GSL1 y (b y d) imagen topográfica de AFM con MNPs con alquino sobre la película de DPPC:COL 1:1 + GSL1



Mientras que las MNPs con alquino (ver **Figura 11.b-d**) y sin alquino (ver **Figura 11.a-c**) presentan una mejor quimisorción sobre la superficie de la película DPPC:COL:GSL3, NO se puede afirmar que las NPs se depositan selectivamente al no tener suficiente información. Cabe recordar que la química *click bioortogonal* se produce entre el azida presente del GSL3 con el grupo alquino de la MNPs (DBCO), por ende, se esperaba poca o nula presencia de NPs como se evidencia en la **Figura 11.a-c**.

Figura 11.

Comparación de las películas DPPC:COL 1:1 + GSL3 tras el proceso de incubación: (a y c) imagen topográfica de AFM con MNPs sin alquino sobre la película de DPPC:COL 1:1 + GSL3 y (b y d) imagen topográfica de AFM con MNPs con alquino sobre la película de DPPC:COL 1:1 + GSL3



La comparación de las imágenes topográficas en distintas zonas y tamaños de las películas DDPC-COL-GSL1 y DPPC-COL-GSL3 con la interacción de nanopartículas funcionalizadas con alquino y sin alquino se muestran en el **Apéndice G**.

En paralelo a la fabricación de películas de Langmuir soportadas sobre mica se prepararon también monocapas sobre sustratos de QCM con el objetivo de verificar si se cumple cuantitativamente lo observado cualitativamente en las imágenes topográficas de AFM y dar seguimiento a las interacciones entre las moléculas y el sustrato; mediante la ecuación de Sauerbrey que relaciona un cambio en la frecuencia del piezoeléctrico con una variación de masa causada por la deposición en curso de las moléculas sobre el cuarzo (Sauerbrey, 1959) (ver **Ec. 3**):

$$\phi = - N \cdot C_f \cdot \Delta f \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde ϕ es el cambio de masa por unidad de área ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$), C_f es un factor de sensibilidad del cristal ($56,6 \text{ Hz} \cdot \text{cm}^2 \cdot \mu\text{g}^{-1}$), N es el número de caras recubiertas y Δf es la variación de la frecuencia antes y después del proceso de deposición. Para evaluar si la deposición se había completado, se midieron los cambios de frecuencia en función del tiempo hasta no observar ninguna variación. En la **Tabla 1** se presenta los cambios de masa para cada una de las transferencias de los GSL. Los cálculos completos se especifican en el **Apéndice H**.

Tabla 1.

Variación de la masa por medio de la microbalanza de cuarzo.

No. Sustrato QCM	Langmuir-Blodgett DPPC:COL 1:1	ϕ ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)			
		Langmuir-Schaefer GSL3	GSL1	SAM MNPs	
				Sin alquino	Con alquino
1	0,353	0,442	-	-	0,088
2	0,256	0,548	-	0,027	-

No. Sustrato QCM	Langmuir-Blodgett DPPC:COL 1:1	ϕ ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)			
		Langmuir-Schaefer GSL		SAM MNPs	
		GSL3	GSL1	Sin alquino	Con alquino
3	0,265	-	0,512	-	-0,777
4	0,274	-	0,512	-0,415	-

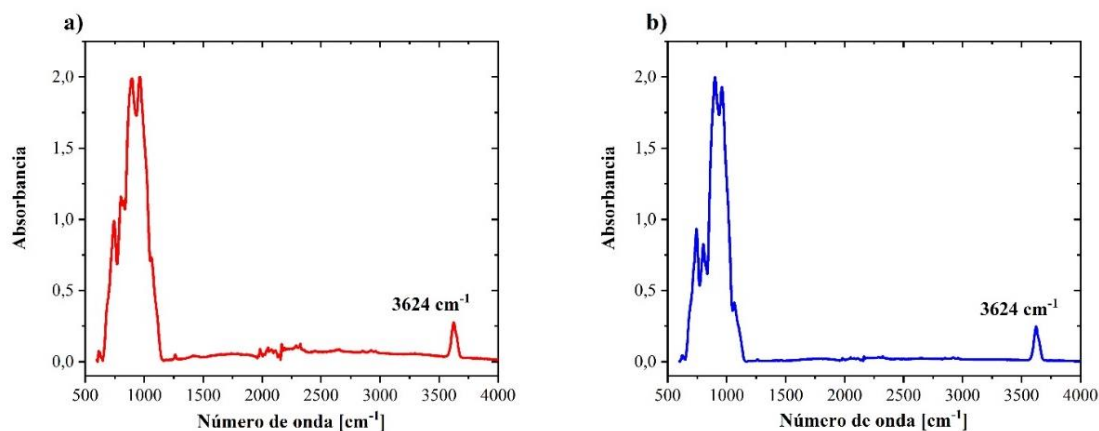
Nota. ϕ : Diferencia de masa, MNPs sin alquino (@PMAO@PEG), MNPs con alquino (@PMAO@PEG@DBCO).

En los experimentos se obtiene que aproximadamente el cuádruple de MNPs con alquino se depositan sobre la membrana celular (con el grupo azida) que para MNPs sin alquino. El resultado indica que la posición del átomo de carbono con el grupo azida tiene un efecto en la adsorción de las MNPs con alquino. En la interacción de las MNPs sin/con alquino con el GSL1 se obtuvieron deposiciones negativas de -0,415 y -0,777 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ respectivamente. Lo anterior indica que las NPs generan cambios en la estructura de la membrana ocasionando la desorción y pérdida de la monocapa; confirmando lo visto con la **Figura 10**.

Para comprobar una posible unión covalente entre las MNPs y las películas, se realizaron pruebas de espectroscopia FTIR-ATR. En la **Figura 12** se muestran los espectros de las películas DPPC-COL-GSL1 y su cambio después de la incubación con MNPs funcionalizadas con alquino.

Figura 12.

Espectro de FTIR-ATR de DPPC-COL-GSL1 (a) antes y (b) después de la incubación con MNPs con alquino

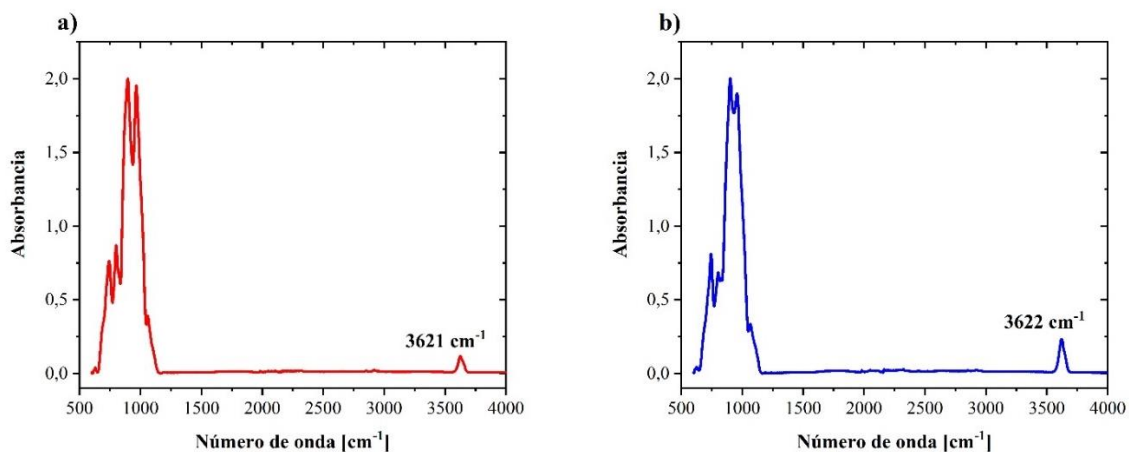


Teniendo en cuenta que los grupos funcionales como el -OH se presentan en números de onda de 3670 a 3580 cm^{-1} y el alquino en números de onda de 2140 a 2100 cm^{-1} (Long, 2004), en el espectro del DPPC-COL-GSL1 (**Figura 12.a**) se evidencia la banda del grupo funcional -OH con un número de onda de 3624 cm^{-1} , de igual manera se percibe en la película DPPC-COL-GSL1 incubada con las MNPs con alquino (**Figura 12.b**). Según los rangos donde la literatura expresa la ubicación de una señal de alquino no se denota ningún cambio para los espectros en cuestión, siendo acorde a los análisis anteriores.

En el caso de las muestras con GSL3 (ver **Figura 13**) y MNPs sin alquino, se observa la aparición de la banda característica del grupo -OH a un número de onda de 3622 cm^{-1} . El número de onda del -OH cumple con el rango de banda según la literatura y no se presentan picos para el azida que contiene este glicosfingolípido.

Figura 13.

Espectro de FTIR-ATR de DPPC-COL-GSL3 (a) antes y (b) después de la incubación con MNPs sin alquino

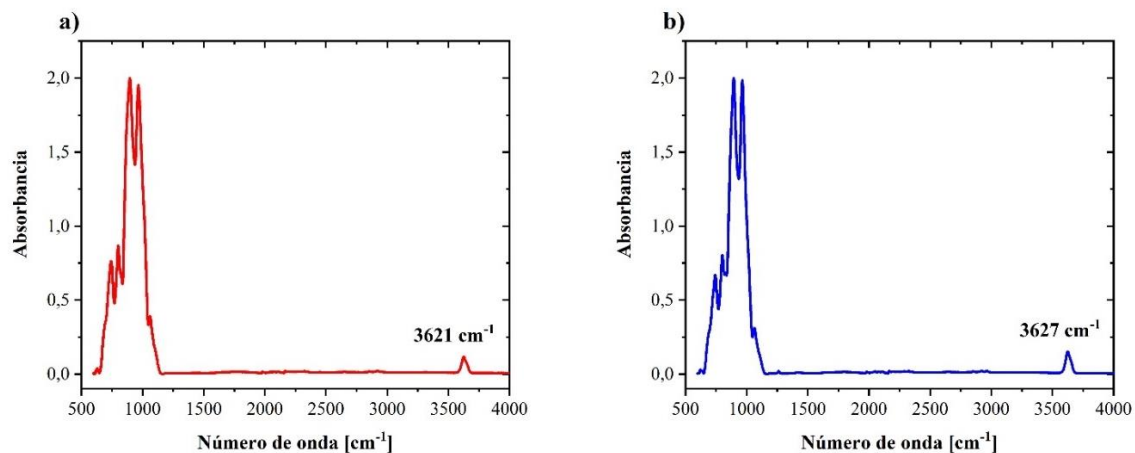


En la **Figura 14** se presentan dos espectros de ATR con la película ternaria de DPPC-COL-GSL3 y otro de la misma película con MNPs funcionalizadas con alquino incubadas durante 1 h.

Se logra ver un cambio en los espectros para el número de onda del grupo funcional -OH y no se evidencia el rango de banda del grupo alquino y el azida de este glicosfingolípido. Por lo cual, análogo a los espectros de la **Figura 13**, se podría asumir que la interrelación del grupo azida con las MNPs, ocasiona que el grupo funcional se ordene perpendicular a la superficie, y por tal motivo, al interactuar su vector momento dipolar de transición (μ_{mn}) con el vector del campo eléctrico (\vec{E}) queden perpendicular uno del otro y no se logre apreciar la banda característica del grupo funcional azida. Es por esto que, en las pruebas de absorbancia no fue fidedigna la presencia de los grupos funcionales, sólo se observaron los hidroxilos (-OH) pero no las uniones del carbono (C-C).

Figura 14.

Espectro de FTIR-ATR de DPPC-COL-GSL3 (a) antes y (b) después de la incubación con MNPs con alquino



En ambos casos, se observó que la interacción de la membrana mimética con MNPs con/sin alquino no fue fehaciente para poder afirmar la deposición selectiva de las NPs sobre la superficie de la membrana. Por todo ello, estos experimentos de ATR no permiten concluir si se da, o no, la química bioortogonal. Los rangos del número de onda de los grupos funcionales analizados en el ATR se muestran en el **Apéndice J**.

5. Conclusiones

Este trabajo de investigación presenta una nueva perspectiva para el estudio de la interacción entre MNPs funcionalizadas y modelos de membranas que contienen GSL en su superficie. Las mediciones topográficas de AFM de las películas transferidas indican la formación de bicapas y en algunas zonas multicapas que señalan que la presencia del glicosfingolípido resulta en una perturbación de las películas homogéneas de DPPC-COL formándose nuevas fases y existiendo la posible formación de balsas lipídicas inducidas por la presencia del GSL1.

Por otro lado, el autoensamblaje de las MNPs se ha estudiado anteriormente por el grupo de investigación Platón, demostrándose que la cinética de reacción entre el ciclooctino y las moléculas derivatizadas con un grupo azida, tenían lugar en menos de una hora. En este caso en cuestión, se evidenció que implementar NPs funcionalizadas con DBCO y PEG generaban una organización poco homogénea sobre la superficie de la membrana. Estas últimas, al ser las NPs de control, se autoensamblan en la membrana en igual proporción que las que poseen el grupo funcional alquino; por lo que el estudio por AFM deja el interrogante de la selectividad del proceso al no observarse en mayor detalle la deposición de las MNPs.

A lo anterior se suman las observaciones en la QCM, donde las monocapas de SA revelan que la adsorción de las MNPs con alquino se ve favorecida en comparación con las MNPs sin alquino del GSL3, esto indica que se logra una cierta especificidad con el azida de la membrana quimisorbida sobre el sustrato; mientras que para el caso del GSL1 se observó desorción o pérdida de las películas al obtener valores de recubrimiento superficial de $-0,415 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ y $-0,777 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ con MNPs con/sin alquino respectivamente.

En los análisis de espectroscopia FTIR-ATR no se demostró con claridad la reacción química que ocurre al momento de incubar por autoensamblaje las MNPs con grupo funcional alquino. Los experimentos de espectroscopia no resultan óptimos debido a que solo se pueden observar los hidroxilos (-OH) presentes en la muestra y no, su composición total y la banda del grupo azida. Por lo que estos experimentos de ATR no son concluyentes en si se da, o no, la química bioortogonal.

Con estos resultados preliminares no se puede concluir que sea posible realizar la química *click bioortogonal* en las membranas simuladas con DPPC-COL-GSL, consiguiendo la incorporación de las MNPs funcionalizadas con DBCO en los grupos azidas de la misma, por lo que deja de por medio un abanico de posibilidades de experimentos por seguir.

6. Recomendaciones

El siguiente paso en esta investigación sería estudiar por medio del AFM el anclaje de las MNPs por SA a diferentes tiempos de incubación con el objeto de determinar un tiempo de deposición óptimo entre las MNPs y las membranas celulares para lograr la especificidad del proceso.

Se recomienda la caracterización de las películas mediante otras técnicas, como la espectroscopia RAMAN, la IR combinadas con AFM, la Resonancia de Plasmones Superficiales (RPS) y la Elipsometría, con el fin de obtener información composicional a medida que se inspecciona la topografía, la masa desorbida o adsorbida y las propiedades fisicoquímicas de las muestras.

Por otra parte, sería conveniente evaluar la interacción de estas mismas nanopartículas con otros fosfolípidos para imitar la membrana celular (GSL2 y GSL4) y otros compuestos, como proteínas y carbohidratos.

Teniendo en cuenta que el estudio de espectroscopia FTIR-ATR no fue el deseado debido a la ausencia de datos que confirman la composición de los grupos funcionales presentes en las películas de Langmuir sobre sustratos de mica, se recomienda repetir los análisis cambiando el modo de absorbancia a transmitancia, además se proponen pruebas alternas de Espectroscopia de Fotoelectrones de Rayos X (XPS).

Referencias Bibliográficas

- Adamson, A. W. (1997). *Physical chemistry of surfaces* (6th ed.). Chichester : John Wiley & Sons.
- Agard, N. J., Prescher, J. A., & Bertozzi, C. R. (2004). A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *Journal of the American Chemical Society*, 126(46), 15046–15047. <https://doi.org/10.1021/ja044996f>
- Anariba, F., DuVall, S. H., & McCreery, R. L. (2003). Mono-and multilayer formation by diazonium reduction on carbon surfaces monitored with atomic force microscopy “scratching.” *Analytical Chemistry*, 75(15), 3837–3844. <https://doi.org/10.1021/ac034026v>
- Armenta Ruiz, E., Varela Echavarría, A., & Martínez de la Escalera, G. (2006). Transfeccion de células por medio de ondas de choque. *REVISTA MEXICANA DE FISICA*, 52(4), 352–358.
- Aroti, A., Leontidis, E., Dubois, M., & Zemby, T. (2007). Effects of monovalent anions of the Hofmeister series on DPPC lipid bilayers part I: Swelling and in-plane equations of state. *Biophysical Journal*, 93(5), 1580–1590. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.094482>
- Arseneault, M., Wafer, C., & Morin, J. F. (2015). Recent Advances in Click Chemistry Applied to Dendrimer Synthesis. In *Molecules* (Vol. 20, Issue 5, pp. 9263–9294). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules20059263>
- Ballesteros R, L. M. (2012). *Ensamblaje de Moléculas Orgánicas Altamente Conjugadas con Potenciales Aplicaciones en Electrónica Molecular*. <https://zaguan.unizar.es/record/10025>
- Batty, S. V., Richardson, T., Pocock, P., & Rahman, L. (1995). A novel technique for the preparation of Langmuir-Blodgett films. *Thin Solid Films*, 266(2), 96–98. [https://doi.org/10.1016/0040-6090\(95\)06693-4](https://doi.org/10.1016/0040-6090(95)06693-4)

- Binnig, G., Gerber, C., Stoll, E., Albrecht, T. R., & Quate, C. F. (1993). *Atomic Resolution with Atomic Force Microscope* (pp. 213–218). https://doi.org/10.1007/978-94-011-1812-5_33
- Biolin Scientific. (2004). *Software Manual Langmuir and Langmuir-Blodgett devices All Models Table of Contents*. https://www.ccmr.cornell.edu/wp-content/uploads/sites/2/2015/11/KSV-NIMA-LB-Software-Manual_v1.4.pdf
- Biolin Scientific. (2020). *KSV NIMA Langmuir and Langmuir-Blodgett Deposition Troughs Modules and Accessories*. <https://www.biolinscientific.com/ksvnima/fabrication-and-deposition-of-thin-films/langmuir-and-langmuir-blodgett-troughs>
- Bruker Optics. (2013). *Vertex 70 User Manual*. www.brukeroptics.com
- Bruker Optics. (2021). *Vertex 70v FT-IR Spectrometer Specifications*. www.bruker.com/optics
- Carpick, R. W., & Salmeron, M. (1997). Scratching the Surface: Fundamental Investigations of Tribology with Atomic Force Microscopy. *Chemical Reviews*, 97(4), 1163–1194. <https://doi.org/10.1021/cr960068q>
- Carrión, P. (2016). *Trabajo Fin de Master: Preparación de películas de LB de nanopartículas de oro funcionalizadas con dodecanotiol y su aplicación como sensores electroquímicos*.
- Černiukė, I., Tamulevičius, S., Prosyčėvas, I., Puišo, J., Guobienė, A., & Andrulevičius, M. (2006). Formation of Metalorganic Multilayer Structures by Langmuir-Blodgett Technique. In *MEDŽIAGOTYRA* (Vol. 12, Issue 4).
- Chapman, D. (1988). Phospholipid bilayers physical principles and models. *Cell Biochemistry and Function*, 6(2), 147–148. <https://doi.org/10.1002/cbf.290060221>

- Chiodini, S., Ruiz-Rincón, S., Garcia, P. D., Martin, S., Kettelhoit, K., Armenia, I., Werz, D. B., & Cea, P. (2020). Bottom Effect in Atomic Force Microscopy Nanomechanics. *Small*, 16(35), 2000269. <https://doi.org/10.1002/sml.202000269>
- Clemons, T. D., Kerr, R. H., & Joos, A. (2019). Multifunctional Magnetic Nanoparticles: Design, Synthesis, and Biomedical Applications. In *Comprehensive Nanoscience and Nanotechnology* (pp. 193–210). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.10462-X>
- Cortés C., L. J., & Ojeda G., P. A. (2020). *Preparación de modelos de membrana celular y su interacción con nanopartículas magnéticas*. Universidad Industrial de Santander.
- Cunill Semanat, E. (2017). *Actividad en Membranas Modelo de Péptidos Apoptóticos*. Universitat de València.
- Davies, J. T. ; R. E. K. (1963). Interfacial Phenomena. In *Handbook of Chemistry and Physics* (pp. 490–491). Academic Press Inc.
- de Oliveira, R. F., de Barros, A., & Ferreira, M. (2017). Nanostructured Films: Langmuir–Blodgett (LB) and Layer-by-Layer (LbL) Techniques. In *Nanostructures* (pp. 105–123). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-49782-4.00004-8>
- Deamer, D. (2017). The Role of Lipid Membranes in Life's Origin. In *Life* (Vol. 7, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/life7010005>
- Diaz, C. (2011). *Tesis Doctoral: Adherencia y colonización de Pseudomonas Fluorescens sobre Sustratos Sólidos: Influencia de la Topografía y Composición Química de la Superficie*. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/2685?show=full>

- Dotor Delgado, L. (2020). *Final Master's Thesis Mimic cell membranes. Thermodynamic and Atomic Force Microscopy studies*. <https://zaguan.unizar.es/record/108668>
- Dotor, L., García-Pinilla, J. M., Martín, S., & Cea, P. (2023). Langmuir and Langmuir–Blodgett technologies as nanoarchitectonic tools for the incorporation of curcumin in membrane systems. *Nanoscale*. <https://doi.org/10.1039/D2NR06631A>
- Dufrêne, Y. F., Ando, T., Garcia, R., Alsteens, D., Martinez-Martin, D., Engel, A., Gerber, C., & Müller, D. J. (2017). Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. *Nature Nanotechnology*, *12*(4), 295–307. <https://doi.org/10.1038/nnano.2017.45>
- Dynarowicz-Łatka, P., Dhanabalan, A., & Oliveira, O. N. (2001). *Modern physicochemical research on Langmuir monolayers*.
- Fitts, C. A., Ji, N., Li, Y., & Tan, C. (2019). Exploiting Exosomes in Cancer Liquid Biopsies and Drug Delivery. In *Advanced Healthcare Materials* (Vol. 8, Issue 6). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/adhm.201801268>
- Garcia-Manyes, S., & Sanz, F. (2010). Nanomechanics of lipid bilayers by force spectroscopy with AFM: A perspective. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1798, Issue 4, pp. 741–749). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.12.019>
- Gawali, S. L., Shelar, S. B., Gupta, J., Barick, K. C., & Hassan, P. A. (2021). Immobilization of protein on Fe₃O₄ nanoparticles for magnetic hyperthermia application. *International Journal of Biological Macromolecules*, *166*, 851–860. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.241>

- Gerick, A., & Huhnerfuss, H. (1995). The Conformational Order and Headgroup Structure of Long-Chain Alkanoic Acid Ester Monolayers at the Air/Water Interface. *BERICHTE DER BUNSEN-GESELLSCHAFT-PHYSICAL CHEMISTRY CHEMICAL PHYSICS*, 4, 641–650.
- Grage, S. L., Afonin, S., Ieronimo, M., Berditsch, M., Wadhwani, P., & Ulrich, A. S. (2022). Probing and Manipulating the Lateral Pressure Profile in Lipid Bilayers Using Membrane-Active Peptides—A Solid-State ^{19}F NMR Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 4544. <https://doi.org/10.3390/ijms23094544>
- Grazú Bonavía, V., Raluca M. Fratila, Jesús M. de la Fuente, Laura Asín Palacios, María Moros Caballero, Javier Idiago López, Eduardo Moreno Antolín, Lilianne Beola Guibert, Pilar Cea Mínguez, Santiago Martín Solans, Silvia Ruiz Rincón, Stefano Chiodini, Pedro Viana Baptista, & Alexandra Fernandes. (2017). *MagicCellGene*. <https://magiccellgene.wixsite.com/magiccellgene>
- Hane, F., Moores, B., Amrein, M., & Leonenko, Z. (2009). Effect of SP-C on surface potential distribution in pulmonary surfactant: Atomic force microscopy and Kelvin probe force microscopy study. *Ultramicroscopy*, 109(8), 968–973. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2009.03.046>
- Haro, M., Giner, B., Lafuente, C., López, M. C., Royo, F. M., & Cea, P. (2005). Proton sponge and fatty acid interactions at the air-water interface. Thermodynamic, spectroscopic, and microscopic study. *Langmuir*, 21(7), 2796–2803. <https://doi.org/10.1021/la047171s>
- Herrer, L. (2018). *Conectado Moléculas: De la Síntesis Orgánica a la Fabricación de Dispositivos Electrónicos Moleculares* [Universidad de Zaragoza]. <https://zagan.unizar.es/record/86986>

Herrera, J., & Coronado, S. (2020). *Estado del arte sobre modelado de sistema membranales celulares y su extensión a sistemas contenido bicapas lipídicas: exosomas, cuerpos vesiculares y sus aplicaciones*. [Universidad Industrial de Santander].
<http://tangara.uis.edu.co/biblioweb/tesis/2021/182139.pdf>

Herrero, V. (2018). *Tesis Doctoral: Multifuncionalización de nanopartículas magnéticas por reconocimiento molecular de ácidos nucleicos y péptidonucleicos para la liberación controlada mediante Hipertermia* [Universidad de Zaragoza].
<https://zagan.unizar.es/record/98298>

Huang, X., Bai, Q., Hu, J., & Hou, D. (2017). A Practical Model of Quartz Crystal Microbalance in Actual Applications. *Sensors*, *17*(8), 1785. <https://doi.org/10.3390/s17081785>

Hung, W.-C., Lee, M.-T., Chen, F.-Y., & Huang, H. W. (2007). The Condensing Effect of Cholesterol in Lipid Bilayers. *Biophysical Journal*, *92*(11), 3960–3967.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.106.099234>

Idiago-López, J., Moreno-Antolín, E., de la Fuente, J. M., & Fratila, R. M. (2021). Nanoparticles and bioorthogonal chemistry joining forces for improved biomedical applications. *Nanoscale Advances*, *3*(5), 1261–1292. <https://doi.org/10.1039/D0NA00873G>

Idiago-López, J., Moreno-Antolín, E., Eceiza, M., Aizpurua, J. M., Grazú, V., de la Fuente, J. M., & Fratila, R. M. (2022). From Bench to Cell: A Roadmap for Assessing the Bioorthogonal “Click” Reactivity of Magnetic Nanoparticles for Cell Surface Engineering. *Bioconjugate Chemistry*, *33*(9), 1620–1633. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.2c00230>

Ishii, T. (1998). Effects of Additive Spreading Solutions to make Stable Monolayers. *Thin Solid Films*, *178*, 47–52.

- Jalili, N., & Laxminarayana, K. (2004). A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences. *Mechatronics*, 14(8), 907–945. <https://doi.org/10.1016/j.mechatronics.2004.04.005>
- Jiménez-Munguía, I., Beaven, A. H., Blank, P. S., Sodt, A. J., & Zimmerberg, J. (2022). Interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3) and its antiviral activity. In *Current Opinion in Structural Biology* (Vol. 77). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102467>
- Kolb, H. C., Finn, M. G., & Sharpless, K. B. (2001). Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. In *Angewandte Chemie - International Edition* (Vol. 40, Issue 11, pp. 2004–2021). [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5)
- Kossi, C. N., & Leblanc, R. M. (1981). Rhodopsin in a new model bilayer membrane. *Journal of Colloid and Interface Science*, 80(2), 426–436. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(81\)90201-0](https://doi.org/10.1016/0021-9797(81)90201-0)
- Kurniawan, J., Ventrici de Souza, J. F., Dang, A. T., Liu, G., & Kuhl, T. L. (2018). Preparation and Characterization of Solid-Supported Lipid Bilayers Formed by Langmuir–Blodgett Deposition: A Tutorial. *Langmuir*, 34(51), 15622–15639. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03504>
- Lee, A. G. (2003). Lipid-protein interactions in biological membranes: A structural perspective. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1612, Issue 1, pp. 1–40). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00056-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00056-7)

- Long, D. A. (2004). Infrared and Raman characteristic group frequencies. Tables and charts George Socrates John Wiley and Sons, Ltd, Chichester, Third Edition, 2001. *Journal of Raman Spectroscopy*, 35(10), 905–905. <https://doi.org/10.1002/jrs.1238>
- Lozano Ocaña, Y., Tubón-Usca, I., Vaca-Altamirano, G., & Tubón-Usca, G. (2022). Métodos de obtención y aplicación de nanopartículas magnéticas en el tratamiento y diagnóstico del cáncer: una revisión. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.1560>
- Małgorzata, J. (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>
- 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>
- Materón, E. M., Miyazaki, C. M., Carr, O., Joshi, N., Picciani, P. H. S., Dalmaschio, C. J., Davis, F., & Shimizu, F. M. (2021). Magnetic nanoparticles in biomedical applications: A review. *Applied Surface Science Advances*, 6, 100163. <https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2021.100163>
- Mecea, V. M. (2006). Is quartz crystal microbalance really a mass sensor? *Sensors and Actuators, A: Physical*, 128(2), 270–277. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2006.01.023>
- Miyoshi, T., & Kato, S. (2015). Detailed Analysis of the Surface Area and Elasticity in the Saturated 1,2-Diacylphosphatidylcholine/Cholesterol Binary Monolayer System. *Langmuir*, 31(33), 9086–9096. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b01775>

- Montero, A., Hervás, A., Morera, R., Sancho, S., Córdoba, S., Corona, J. A., Rodríguez, I., Chajón, E., & Ramos, A. (2005). *Control de síntomas crónicos. Efectos secundarios del tratamiento con Radioterapia y Quimioterapia*. <https://doi.org/10.4321/s0378-48352005000300008>
- Morawski, I., Spiegelberg, R., Korte, S., & Voigtländer, B. (2015). Combined frequency modulated atomic force microscopy and scanning tunneling microscopy detection for multi-tip scanning probe microscopy applications. *Review of Scientific Instruments*, 86(12), 123703. <https://doi.org/10.1063/1.4936975>
- Moreno, E. (2017). *Nanopartículas Magnéticas para Reacciones Bioortogonales in vitro* [Universidad de Zaragoza]. <https://zaguan.unizar.es/record/65170>
- Mosayebi, J., Kiyasatfar, M., & Laurent, S. (2017). Synthesis, Functionalization, and Design of Magnetic Nanoparticles for Theranostic Applications. *Advanced Healthcare Materials*, 6(23), 1700306. <https://doi.org/10.1002/adhm.201700306>
- National Center for Biotechnology Information. (2022a). *PubChem Compound Summary for CID 304*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/304>.
- National Center for Biotechnology Information. (2022b, December 9). *PubChem Compound Summary for CID 5997, Cholesterol*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cholesterol>.
- Patterson, D. M., Nazarova, L. A., & Prescher, J. A. (2014). Finding the Right (Bioorthogonal) Chemistry. In *ACS Chemical Biology* (Vol. 9, Issue 3, pp. 592–605). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/cb400828a>

- Peetla, C., Stine, A., & Labhasetwar, V. (2009). Biophysical interactions with model lipid membranes: Applications in drug discovery and drug delivery. *Molecular Pharmaceutics*, 6(5), 1264–1276. <https://doi.org/10.1021/mp9000662>
- Penkauskas, T., & Preta, G. (2019). Biological applications of tethered bilayer lipid membranes. In *Biochimie* (Vol. 157, pp. 131–141). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.11.011>
- Perez Mayen, L. (2010). *Preparación de substratos con nanopartículas de plata mediante la técnica Langmuir-Blodgett (L-B) para SERS*. <https://cio.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1002/672/1/14631.pdf>
- Redondo-Morata, L., Giannotti, M. I., & Sanz, F. (2012). Influence of Cholesterol on the Phase Transition of Lipid Bilayers: A Temperature-Controlled Force Spectroscopy Study. *Langmuir*, 28(35), 12851–12860. <https://doi.org/10.1021/la302620t>
- Reis, O., Winter, R., & Zerda, T. W. (1996). The effect of high external pressure on DPPC-cholesterol multilamellar vesicles: a pressure-tuning Fourier transform infrared spectroscopy study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1279(1), 5–16. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(95\)00233-2](https://doi.org/10.1016/0005-2736(95)00233-2)
- Roberts, G., & Swalen, J. (1990). *LANGMUIR-BLODGETT-FILMS*.
- Roca, A. G., Costo, R., Rebolledo, A. F., Veintemillas-Verdaguer, S., Tartaj, P., González-Carreño, T., Morales, M. P., & Serna, C. J. (2009). Progress in the preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 42(22), 224002. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/42/22/224002>

- Róg, T., Pasenkiewicz-Gierula, M., Vattulainen, I., & Karttunen, M. (2009). Ordering effects of cholesterol and its analogues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(1), 97–121. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.08.022>
- Ruiz-Rincón, S. (2015). *Final Master's Thesis: Formation and characterization of model cell membranes and their interaction with Magnetic Nanoparticles* [Universidad de Zaragoza]. <https://zaguan.unizar.es/record/36781>
- Ruiz-Rincón, S. (2021). Tesis Doctoral: Modelos de membranas celulares y su interacción con nanopartículas magnéticas. *Universidad de Zaragoza*, 1–268. <https://docplayer.es/77540368-Tesis-doctoral-tesis-doctoral.html>
- 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>
- Ruiz-Rincón, S., González-Orive, A., Grazú, V., Fratila, R. M., Fuente, J. M. de la, & Cea, P. (2020). Altering model cell membranes by means of localized magnetic heating. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 196. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111315>
- Santos, F. S. F. dos, Rodrigues, J. F. B., da Silva, M. C., Barreto, M. E. V., da Silva, H. N., de Lima Silva, S. M., & Fook, M. V. L. (2022). Use of Piranha Solution as An Alternative Route to Promote Bioactivation of PEEK Surface with Low Functionalization Times. *Molecules*, 28(1), 74. <https://doi.org/10.3390/molecules28010074>
- Sauerbrey, G. (1959). Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift Für Physik*, 155(2), 206–222. <https://doi.org/10.1007/BF01337937>

Schütte, O. M., Ries, A., Orth, A., Patalag, L. J., Römer, W., Steinem, C., & Werz, D. B. (2014).

Influence of Gb3 glycosphingolipids differing in their fatty acid chain on the phase behaviour of solid supported membranes: chemical syntheses and impact of Shiga toxin binding. *Chemical Science*, 5(8), 3104. <https://doi.org/10.1039/c4sc01290a>

Shan, Y., & Wang, H. (2015). The structure and function of cell membranes examined by atomic

force microscopy and single-molecule force spectroscopy. In *Chemical Society Reviews* (Vol. 44, Issue 11, pp. 3617–3638). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c4cs00508b>

Stanford Research Systems. (2018). *Operation and Service Manual QCM200 Quartz Crystal*

Microbalance Digital Controller QCM25 5 MHz Crystal Oscillator. <https://www.thinksrs.com/products/qcm200.html>

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>

Van Meer Gerrit, Voelker Dennis R., & Feigenson, G. W. (2008). *Membrane lipids where they*

are and how they behave. <https://doi.org/10.1038/nfm2330>

Veeco Instruments Inc. (2004). *MultiMode SPM Instruction Manual*.

Vilan, A., Aswal, D., & Cahen, D. (2017). Large-Area, Ensemble Molecular Electronics:

Motivation and Challenges. *Chemical Reviews*, 117(5), 4248–4286. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00595>

- Vist, M. R., & Davis, J. H. (1990). Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: deuterium nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry. *Biochemistry*, 29(2), 451–464. <https://doi.org/10.1021/bi00454a021>
- Wang, L., Liu, Y., & Liu, G. (2017). Hydrophobic coating of mica by piranha solution activation, silanization grafting, and copolymerization with acrylate monomers. *Journal of Applied Polymer Science*, 134(25), app.44985. <https://doi.org/10.1002/app.44985>
- Watson, H. (2015). Biological Membranes. *Essays in Biochemistry*, 59, 43–70. <https://doi.org/10.1042/BSE0590043>
- Wilhelmy, L. (1863). *Ueber die Abhängigkeit der Capillaritäts-Constanten des Alkohols von Substanz und Gestalt des benetzten festen Körpers.* <https://doi.org/10.1002/andp.18631950602>
- Wydro, P., Knapczyk, S., & Łapczyńska, M. (2011). Variations in the condensing effect of cholesterol on saturated versus unsaturated phosphatidylcholines at low and high sterol concentration. *Langmuir*, 27(9), 5433–5444. <https://doi.org/10.1021/la105142w>
- 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)
- Zhao, L., Feng, 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. Propiedades físicas y químicas de los compuestos

En la **Tabla A1** se describen las propiedades químicas y físicas del DPPC y COL (datos resumidos de la base de datos *PubChem*).

Tabla A1.

Propiedades fisicoquímicas del DPPC y COL

Compuesto	DPPC	Colesterol
Formula	C ₄₀ H ₈₀ NO ₈ P	C ₂₇ H ₄₆ O
Peso molecular (g·mol ⁻¹)	734,0	386,7
Punto de ebullición	60,5-61,5°C a 760 mmHg	360°C
Punto de fusión	-63°C	148.5°C
Densidad	-	1.067 a 20°C/4°C
Apariencia	Sólido cristalino blanco	Gránulos o cristales nacarados blancos o ligeramente amarillos
Olor	Inodoro	Inodoro
Solubilidad	Poca solubilidad en agua. Soluble en solvente orgánicos (cloroformo)	Poca solubilidad en agua. Moderadamente solubles en alcohol caliente; soluble en aceites, grasas y soluciones acuosas de sales biliares
Estabilidad	Estable. Incompatible con agentes oxidantes fuertes.	Estable
Estructura	Lípido. Fosfatidilcolina 32:0, 1-acil-2-hexadecanoil snglicero-3-fosfolina, deriva de un ácido hexadecanoico	Esterol (lípido). Esterano (ciclopentanoperhidrofenantrenos). Grupo hidroxilo, C3. 8 estereocentros → 256 estereoisómeros, aunque sólo dos son de importancia bioquímica (nat-colesterol y ent-colesterol).
Aceptor de enlaces de H	0	1
Dador de enlaces de H	8	1
Enlaces rotables	40	5

Compuesto	DPPC	Colesterol
Carga formal	0	0
Otros	Surfactante pulmonar. Comportamiento anfipático: cabeza hidrofílica, compuesta del grupo polar fosfatidilcolina, y colas hidrofóbicas, formadas por dos cadenas de ácido no polares de ácido palmítico (C16). Formación de micelas, monocapas, bicapas y liposomas en disolventes polares.	Esterol de los tejidos corporales. Rotación específica: -34° a 38° a 25°C . El grupo hidroxilo interactúa con las moléculas de agua y las cabezas de los fosfolípidos, mientras que el esteroide voluminoso está incrustado en la membrana, junto a las cadenas de ácidos grasos no polares.
Peligro	No clasificado	No clasificado

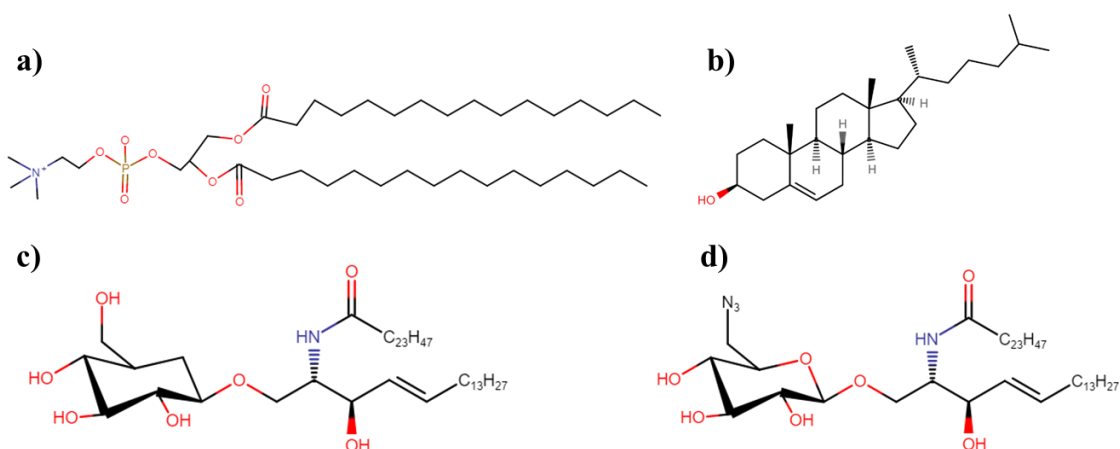
Nota. Adaptado de (National Center for Biotechnology Information, 2022a, 2022b)

A continuación, se presentan las estructuras químicas de los compuestos empleados en esta pasantía de investigación:

- Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC).
- Colesterol (COL)
- Glicosfingolípido 1 (GSL1).
- Glicosfingolípido 3 (GSL3).

Figura A1.

Estructura química de los compuestos: (a) DPPC, (b) COL, (c) GSL1 y (d) GSL3



Apéndice B. Sustratos, reactivos y disolventes

A. Reactivos y disolventes

La **Tabla B1** recoge un listado de los reactivos y disolventes empleados en este trabajo indicándose su CAS, proveedor y pureza.

Tabla B1.

Especificaciones de los reactivos y disolventes

Compuesto	CAS	Pureza	Proveedor
DPPC	63-89-8	≥99%	Sigma-Aldrich®
Colesterol	57-88-5	≥99%	Sigma-Aldrich®
Agua Milli-Q	-	Resistividad 18,2 M Ω·cm	Obtenido de un sistema de purificación de agua Millipore en el INMA
Cloroformo	67-66-3	≥99.8%	Macron Fine Chemicals™
Ácido sulfúrico	7664-93-9	≥98%	Panreac Applichem
Etanol	64-17-5	≥99.5%	Panreac Applichem
Acetona	200-662-2	≥99.8%	Fisher Scientific
Peróxido de hidrogeno	7722-84-1	≥98%	Fisher Scientific

B. Sustratos

B.1. Sustratos de mica

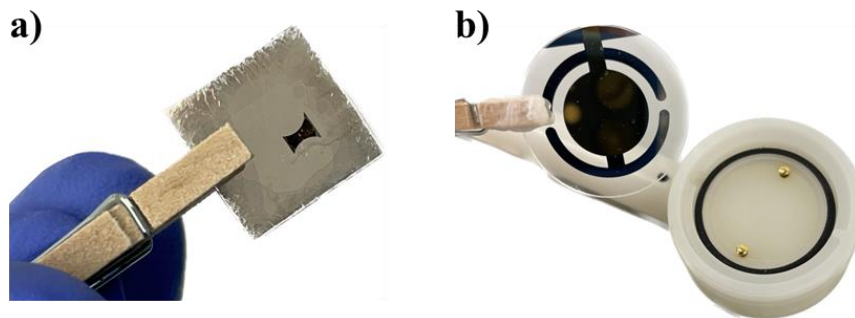
Se usan láminas de mica de la casa comercial *Ted Pella, Inc.*, de calidad V1, con un espesor de 0,15-0,177 mm. Las dimensiones cortadas de estas laminas son de 10 mm x 10 mm para facilidad en la caracterización con el AFM y la marcación con PVD. Previamente a su utilización se realiza un proceso de exfoliación.

B.2. Sustratos QCM.

Los sustratos utilizados en la microbalanza de cuarzo se adquieren en la casa comercial QCM25, *Standford Research Systems*. Son discos de α -cuarzo con electrodos de oro circulares en ambas caras. Su frecuencia fundamental de resonancia es de 5 MHz y su área efectiva es de $0,8\text{cm}^2$. Antes de su uso, se dejan en EtOH/H₂O durante 24 horas, se lavan con CHCl₃ por 12 horas y se secan con N₂.

Figura B1.

Imágenes de los distintos sustratos empleados en este trabajo: (a) mica y (b) QCM



Apéndice C. Cuba KSV NIMA 2003

El trabajo experimental de este trabajo de grado se ha desarrollado prácticamente en su totalidad en una cuba de tipo comercial KSV NIMA modelo 2003 del grupo de investigación Platón de la Universidad de Zaragoza en los laboratorios del Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA).

Este equipo comercial se usó principalmente para registrar isothermas de $(\pi - A)$ y efectuar la transferencia de las películas de Langmuir a sustratos sólidos. El equipo y sus componentes se pueden observar en la **Figura C2**. La cuba posee un recipiente de teflón de dimensiones 580 x 145 mm² reforzado por una estructura metálica. La profundidad de la cubeta es de 4 mm a excepción del pozo de transferencia que tiene una profundidad de 110 mm ubicada en la zona céntrica del recipiente de teflón, además posee dos barreras móviles de teflón, que se mueven por un sistema de poleas controlado por un motor, 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 y se apoyan sobre una mesa que amortigua las vibraciones.

Figura C1.

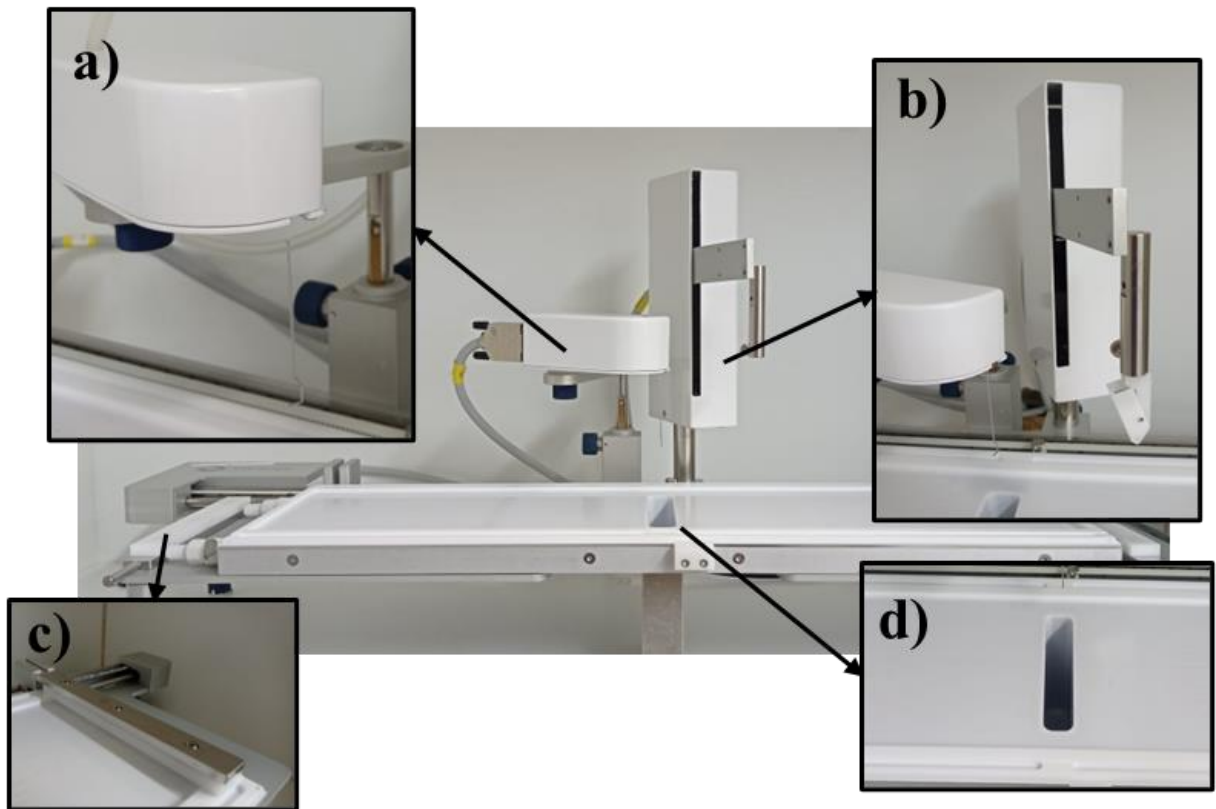
Cabina protectora de la Cuba KSV NIMA 2003



La presión superficial es medida mediante una balanza de Wilhelmy, empleándose como sensor una lámina de papel de filtro comercial de 10,3 mm de ancho, que se encuentra sumergido parcialmente en la subfase acuosa y conectado a un sensor magnético (ver **Figura C2.a**), que registra la diferencia de potencial generada en el sensor, que tras una calibración de las fuerzas que actúan sobre el platillo (ver **Figura C3**), se traduce en la medida de la presión superficial (π).

Figura C2.

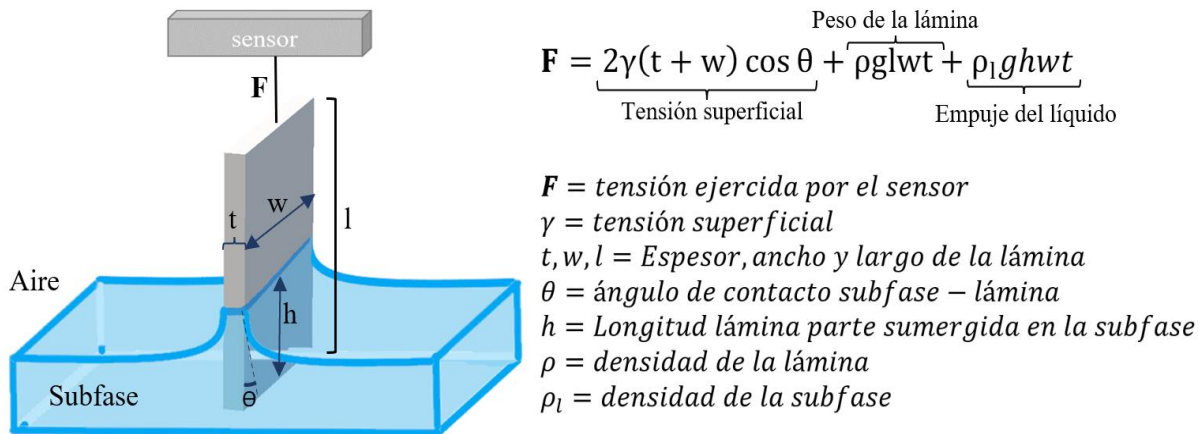
Cuba KSV NIMA modelo 2003



Nota. Equipamiento estándar para la KSV NIMA 2003 donde: (a) balanza de *Wilhelmy* para la medida de la presión superficial en la interfase aire-agua, (b) mecanismo o brazo de transferencia que contiene una pinza que sujeta al sustrato, (c) barreras móviles de teflón (PTFE), una a cada lado de la cuba, y (d) pozo de transferencia.

Figura C3.

Esquema del método de Wilhelmy para medir la presión superficial

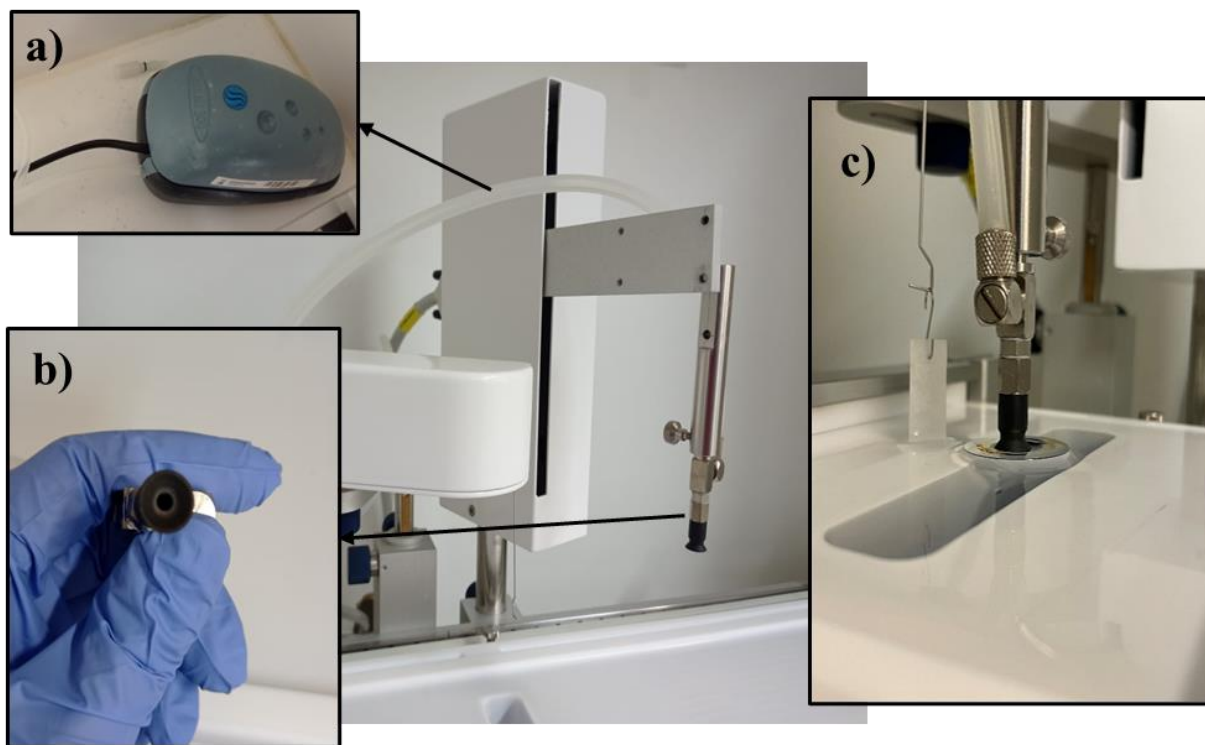


Nota. Adaptado de (Ballesteros R, 2012; Herrero, 2018).

Para realizar las transferencias a soportes sólidos, primero se ensambla una monocapa del material que se desea estudiar sobre la superficie acuosa o subfase mediante las barreras móviles; la monocapa formada se le conoce como película de Langmuir. El segundo paso sería transferir sobre el sustrato mediante la inmersión o emersión de este en posición vertical en la subfase acuosa para formar la película de Langmuir-Blodgett (LB). En la realización de este tipo de transferencia, la Cuba KSV NIMA 2003 posee un brazo de transferencia donde en la parte inferior tiene una pinza que sirve como soporte del sustrato sólido (ver **Figura C2.b**). Si el sustrato está ubicado de forma horizontal o paralela a la subfase, la película de Langmuir se transfiere por contacto directo sobre él formando una película de Langmuir-Schaefer. Para hacer esta última transferencia, se adapta una ventosa de una bomba de vacío a la pinza del brazo de transferencia tal como lo muestra la **Figura C4**.

Figura C4.

Soporte de Langmuir-Schaefer en la Cuba KSV NIMA 2003



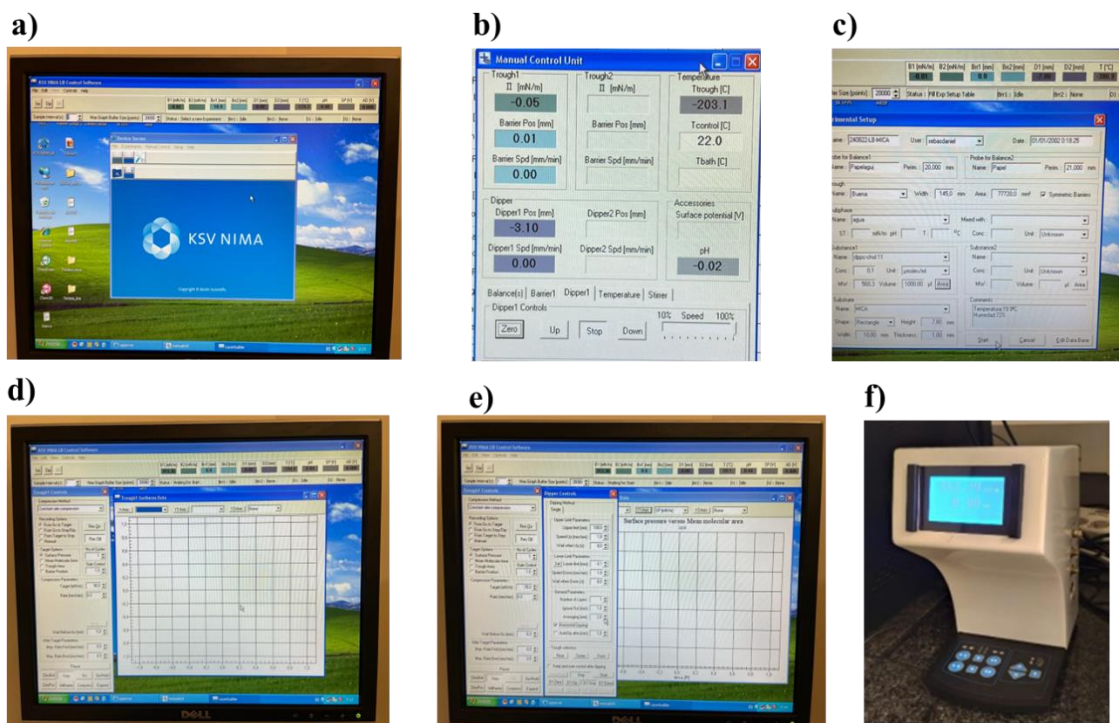
Nota. Pinza de inmersión horizontal en la cubeta de Langmuir siendo: (a) bomba de vacío conectada con un tubo flexible a una varilla porta-muestra, (b) ventosa circular de goma blanda conectada al extremo del porta-muestra y (c) transferencia Langmuir-Schaefer.

Los motores de la cuba y del brazo de transferencia están conectados a un ordenador con el que se pueden controlar de forma automática el movimiento horizontal y la velocidad de las barreras, así como detenerla cuando se alcance el valor de área por molécula o la presión deseada. Cuando se llega a la presión deseada, el ordenador da la orden de accionar el motor para el desplazamiento vertical del brazo de transferencia. La velocidad de transferencia y el número de estas son programados y controlados por un software instalado en el ordenador. El software (ver **Figura C5**) permite la acción de la cuba desde la compresión de las barreras hasta el brazo de transferencia, este es proporcionado por la casa comercial KSV NIMA LB Software de *Biolin*

Scientific. Además, permite la recolección de datos experimentales para análisis posteriores y la visualización en tiempo real (cada instante) conforme se vaya comprimiendo las barreras y formado la monocapa. Si desea conocer más información sobre la instalación y configuración del software, en la referencia (Biolin Scientific, 2004) podrá encontrar el manual de instalación.

Figura C5.

Software KSV NIMA 2003 LB



Nota. (a) Menú principal del software KSV NIMA LB, (b) ventana de la unidad de control manual, (c) pantalla de configuración del experimento, (d) Ventana de control “Trough1” para isoterms de Langmuir, (e) Ventana de control “Trough1” y del “Dipper” para transferencias y (f) Unidad de interfase NIMA.

Apéndice D. Limpieza de la cuba

Para la elaboración de monocapas de Langmuir, Langmuir-Blodgett y Langmuir-Schaefer es indispensable realizar una limpieza exhaustiva de la cuba teflón. Para ello el usuario debe usar guantes látex y tapabocas con el fin de minimizar una contaminación por la grasa de la piel y la respiración. La limpieza se debe efectuar sobre todo en el área del teflón y las barreras contenedoras que regulan la tensión superficial del agua (Patterson et al., 2014), se inicia limpiando con papel impregnado de acetona y cloroformo; cerciorándose de arrastrar cualquier residuo y trazas de contaminación. Primero se pasa la acetona, ya que tiene la capacidad retirar pequeñas cantidades de agua que hubiesen quedado en el teflón, además al ser menos volátil que el cloroformo permite la adhesión de polvo y pequeñas partículas sólidas (Dotor Delgado, 2020). Después de esperar un tiempo aproximado de 15 minutos (que permita la evaporación de la acetona), se limpia sucesivamente con cloroformo, este al ser miscible con la acetona permite retirar los restos de esta y al ser un disolvente orgánico apolar favorece la hidrofobicidad del material. Se deja esperar otros 15 minutos para la evaporación del disolvente. Seguidamente se prepara la lámina de papel de filtro para la balanza de Wilhelmy, limpiándolo con etanol, y una vez seco se sumerge parcialmente en un vaso precipitado que contiene agua Milli-Q por unos 15 minutos para que se humedezca completamente y así evitar que una vez comenzados los barridos el papel continúe absorbiendo agua y registre presiones erróneas. A continuación, se aclara la cuba mediante ciclos de llenado/vaciado con agua Milli-Q, entre 3 a 5 veces. Para lo anterior empleamos un succionador de trompa de vacío que nos permite succionar el agua durante los lavados.

Terminado los lavados, se llena nuevamente la cuba y se coloca la lámina de papel de filtro sobre el sensor magnético; se verifica el nivel de la subfase, observando que el menisco convexo formado esté a la misma altura del canal. El paso anterior es crucial debido a que, si el nivel es

demasiado bajo, el surfactante podría deslizarse debajo de las barreras y si el nivel es muy alto podría desbordarse, obteniéndose datos erróneos de isothermas ($\pi - A$). Es conveniente realizar un barrido en blanco, con el fin de confirmar la ausencia de surfactantes en la interfase aire-agua que pudiesen generar un aumento en la presión superficial, si al comprimir las barreras se mantiene por debajo de $1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ nos indica que la cuba está limpia (Biolin Scientific, 2004), si ocurre lo contrario, se limpia la superficie de la subfase y se repite; si vuelve a suceder lo mismo en un par de ocasiones, se comienza de nuevo todo el proceso de limpieza.

Apéndice E. Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)

AFM es la técnica de análisis utilizada en este trabajo, que permite conocer con gran precisión la superficie de los materiales obteniendo imágenes a nanoescala de alta resolución. El interés en la topografía de los materiales ha estado siempre presente en numerosas ramas de las ciencias, debido a que las propiedades superficiales de un material influyen directamente en su aplicabilidad. La técnica AFM se presentó en el año 1986 por G. Binnig y C. F. Quate; como una herramienta versátil, no destructiva, capaz de trabajar eficazmente en la ciencia de los materiales, desde el punto de vista químico, físico o biológico (Binnig et al., 1993). Además, su importancia se incrementó al permitir realizar el estudio cuantitativo de la estructura tridimensional de la superficie y de sus propiedades mecánicas, electrónicas, magnéticas y químicas. Así mismo, destacó su uso en ambientes de vacío o líquidos, permitiendo incluso evaluar los cambios en las propiedades superficiales de un material cuando está dándose una reacción química en su superficie (Diaz, 2011).

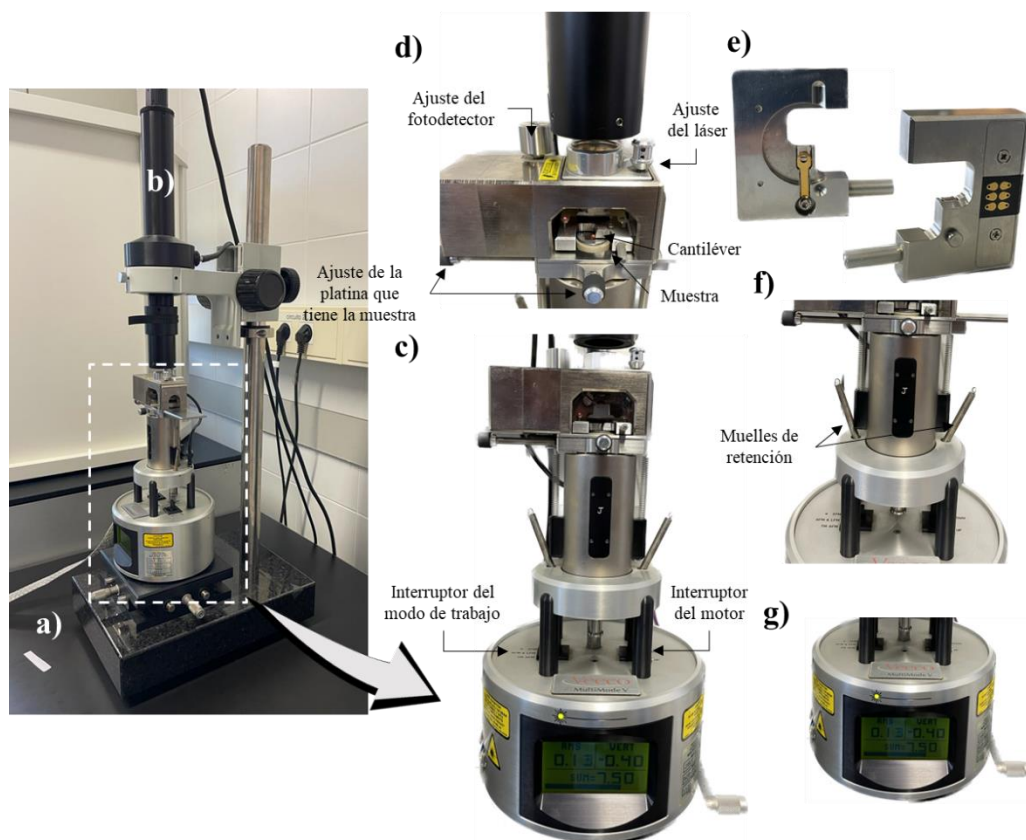
A diferencia de otras técnicas de análisis como SEM o TEM que obtienen la señal mediante lentes ópticos que interaccionan con electrones, el AFM utiliza una sonda de barrido, es decir, en realidad, analiza la superficie de la muestra punto por punto con una sonda fina (idealmente acabada en un átomo) (Shan & Wang, 2015). En esta microscopia se puede controlar la posición tridimensional de la sonda o punta respecto a la muestra que se quiere caracterizar mediante un sistema de piezoeléctrico (Herrero, 2018).

El equipo utilizado para la caracterización morfológica de las monocapas ensambladas sobre sustratos sólidos ha sido un Multimode 8 ambiental de la empresa *Veeco-Bruker* perteneciente al Laboratorio de Microscopía Avanzada (LMA) del Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA). Este es un microscopio SPM equipado con una unidad de control

Nanoscope V (Bruker), 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°C hasta 200°C), medidas de Torsion-mode y QNM (*Quantitative Nonomechanical Property Mapping*), opción Peak Force y escáner SPM Multimodo con capacidades de alcance J (125µm x 125µm x 5µm), E (10µm x 10µm x 2,5µm) A (0,4µm x 0,4µm x 0,4µm) y AS-200 (200µm x 200µm x 8µm) respectivamente (Veeco Instruments Inc, 2004). En la **Figura E1** se especifican las partes del equipo.

Figura E1.

Microscopio de Fuerza Atómica (AFM)



Nota. Partes y elementos principales del Microscopio de fuerza atómica donde: (a) mesa amortiguadora anti-vibraciones, (b) microscopio óptico, (c) cuerpo controlador Multimode AFM/SPM, (d) cabezal SPM, (e) vista superior e inferior del porta-puntas, (f) escáner J y (g) base.

En el caso del AFM la sonda o punta, de un par de micras de largo y menos de 100\AA de diámetro se coloca en un *cantiléver* o palanca *Scanasyt-air*, de 100 a 200 micras de largo de la casa comercial *Bruker*, con una constante elástica, para nuestro caso, de $6\text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ y una frecuencia nominal de 150 kHz, que dependiendo de la interacción existente entre la punta y la superficie de la muestra provoca que el *cantiléver* se doble o flexione. La interacción punta-muestra se basa en la medida de varias fuerzas atómicas de corto y largo alcance que contribuyen a la flexión del *cantiléver*, siendo las más comunes las fuerzas de Van der Waals (atractivas), o fuerzas electrostáticas y/o magnéticas (atractivas y repulsivas). El valor de esta fuerza de interacción punta-muestra se encuentra típicamente entre 10^{-7} y 10^{-9} N siendo dependiente de la distancia (Carpick & Salmeron, 1997; Jalili & Laxminarayana, 2004). Por lo tanto, seleccionando de manera correcta la punta a utilizar para cada muestra es posible obtener mapas de la topografía superficial a una resolución de escala nanométrica, así como también permite caracterizar otras propiedades fisicoquímicas.

Figura E2.

Especificaciones y montaje del cantiléver



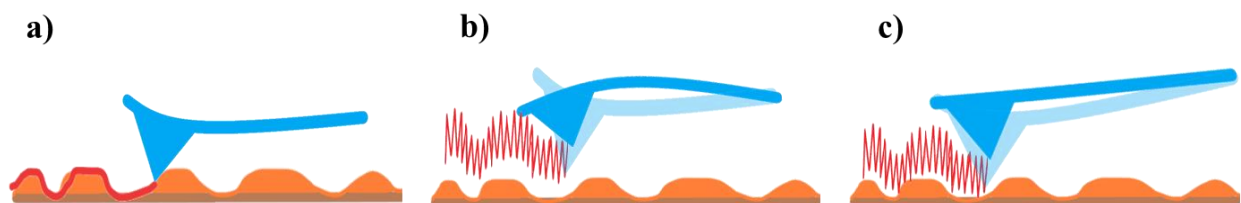
Nota. Detalles del cantiléver empleado siendo: (a) referencia de las puntas empleadas, (b) ubicación del cantiléver en el porta-puntas y (c) punta vista desde la cámara conectada al lente óptico.

El principio básico del AFM consiste primero en el correcto posicionamiento de la punta o sonda, gracias al piezoeléctrico (movimiento en el eje Z) y a los tornillos presentes en el equipo (movimiento X-Y) y segundo, en la deflexión del cantiléver (Carpick & Salmeron, 1997; Morawski et al., 2015). Para ello, un láser se dispone sobre la sonda; esta luz es reflejada sobre un fotodetector sensible a la posición que proporciona señal de retroalimentación a los escáneres piezoeléctricos que mantienen la sonda a una altura o fuerza constante, creando finalmente una imagen de todos los puntos medidos y obteniendo así información sobre la rugosidad de la superficie o la fuerza de interacción entre la muestra y la punta (Dufrière et al., 2017; Marrese et al., 2017).

La medición de AFM se puede llevar a cabo en tres modos dependiendo del tipo de interacción de la punta con la superficie (ver **Figura E3**): (a) contacto, en presencia de fuerzas constantemente repulsivas; (b) No contacto, en presencia de fuerzas atractivas sobre la punta y (c) modo *tapping*, en presencia de fuerzas atractivas y repulsivas (Diaz, 2011; Morawski et al., 2015).

Figura E3.

Modos de trabajo del AFM: (a) contacto, (b) no contacto e (c) intermitente o tapping.



Modo contacto

El extremo de la punta está en contacto físico suave con la muestra. La punta barre la superficie, la fuerza de contacto origina la deflexión del cantiléver de modo que este se adapta a la superficie topográfica de la muestra. La fuerza total que ejerce la punta sobre la muestra es la suma

de las fuerzas de capilaridad y del cantiléver, y se debe equilibrar a la fuerza repulsiva de van der Waals. Sobre la muestra se ejerce una magnitud de fuerza entre 10^{-8} a 10^{-6} N (Morawski et al., 2015). Se puede trabajar en modo de fuerza constante o modo de altura constante. En este modo de contacto se pueden realizar medidas de elasticidad y aplicarse en una amplia gama de muestras duras. Si bien es cierto, que al escanear la superficie de la muestra se produce la deflexión vertical del cantiléver que da lugar a la topografía, también se produce una deflexión lateral del mismo debido a las propiedades de fricción de la muestra, como consecuencia, el contacto continuo de la punta y muestra hace que este modo resulte invasivo o incluso destructivo en el caso de analizar muestras compuestas por materiales blandos, puesto que puede modificar la superficie al arrastrar material o incluso obstaculizar la medida al partirse la punta.

Modo No-contacto o sin contacto

Se excita el *cantiléver* cerca de su frecuencia de resonancia de tal manera que vibra cerca de la superficie de la muestra en un rango de 10 a 100 Å. Se ejerce una fuerza muy baja, alrededor de los 10-12 N, en este caso se pueden medir distintos gradientes de fuerza (magnética y electrostática); sin embargo, las resoluciones suelen ser bajas (Jalili & Laxminarayana, 2004).

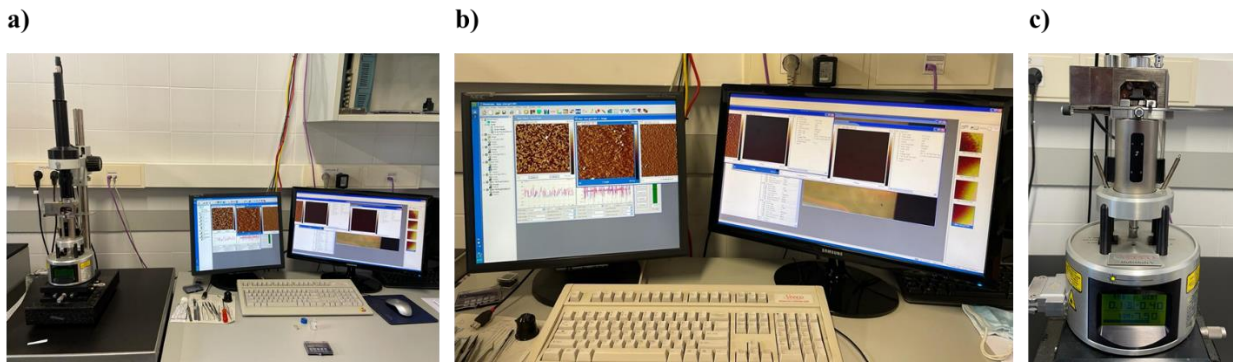
Modo Contacto Intermitente (*Tapping-Mode*)

En el caso de esta tesis de pregrado, se ha utilizado el modo *tapping* para las medidas realizadas en aire, ya que es más adecuado para muestras blandas. En este modo la punta está en intermitente contacto con la superficie a la vez que la escanea. Como señal de control utiliza la variación de la amplitud de la oscilación de la punta, debida a la amortiguación sobre la superficie. Con esta técnica se obtienen medidas muy estables con resolución elevada.

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, propiedades mecánicas de la membrana artificial constituida y visualizar las interacciones entre esta y las nanopartículas depositadas sobre ella (Marrese et al., 2017). El tratamiento de las imágenes registradas se realizó con el software *Gwyddion V2.59*.

Figura E4.

Componentes del sistema SPM Multimode



Nota. (a) Montaje completo del sistema operativo del AFM, (b) monitor de control y visualización (el mouse mueve el cursor entre ambos monitores), y (c) SPM Multimode.

Apéndice F. Microbalanza de Cuarzo (QCM)

La microbalanza de cuarzo (*Quartz Crystal Microbalance*) es una técnica muy sensible que permitió determinar cambios de masa de hasta 10^{-9} gramos por unidad de área. El principio de funcionamiento se basa en la deformación que se produce en el cuarzo al aplicar una diferencia de potencial en cada uno de sus extremos, fenómeno físico conocido como el efecto piezoeléctrico (Mecea, 2006). El material que se utiliza para realizar estas medidas es un cristal de cuarzo con dos electrodos de oro depositado en ambas caras. La deformación se transmite en forma de onda aplicando un voltaje apropiado a través de los electrodos metálicos, de manera que la microbalanza determina la frecuencia a la que la onda reflejada entra en resonancia con la deformación inicial, o lo que es lo mismo con la frecuencia de resonancia fundamental del cuarzo (f_0). Esta frecuencia puede verse afectada por la adición o eliminación de pequeñas cantidades de masa sobre la superficie del electrodo. El cambio de frecuencia se denomina (Δf); ya que se monitorea en tiempo real para obtener información útil sobre las interacciones moleculares o las reacciones que tienen lugar en la superficie del electrodo, como la formación de la película, la oxidación, la corrosión, entre otras (Huang et al., 2017).

Es así como la relación entre la masa de compuesto depositada (Δm) y la variación de la frecuencia fundamental viene dada por la ecuación general de Sauerbrey (Sauerbrey, 1959):

$$\Delta f = -N \cdot \frac{2f_0^2}{\rho_q^{1/2} \cdot \mu_q^{1/2}} \cdot \frac{\Delta m}{A} \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde Δf es la variación de la frecuencia antes y después del proceso de deposición, Δm , es la masa depositada sobre el sustrato, A , el área del sensor, N el número de caras recubiertas, ρ_q es la densidad del cuarzo y μ_q es el módulo de rigidez de este.

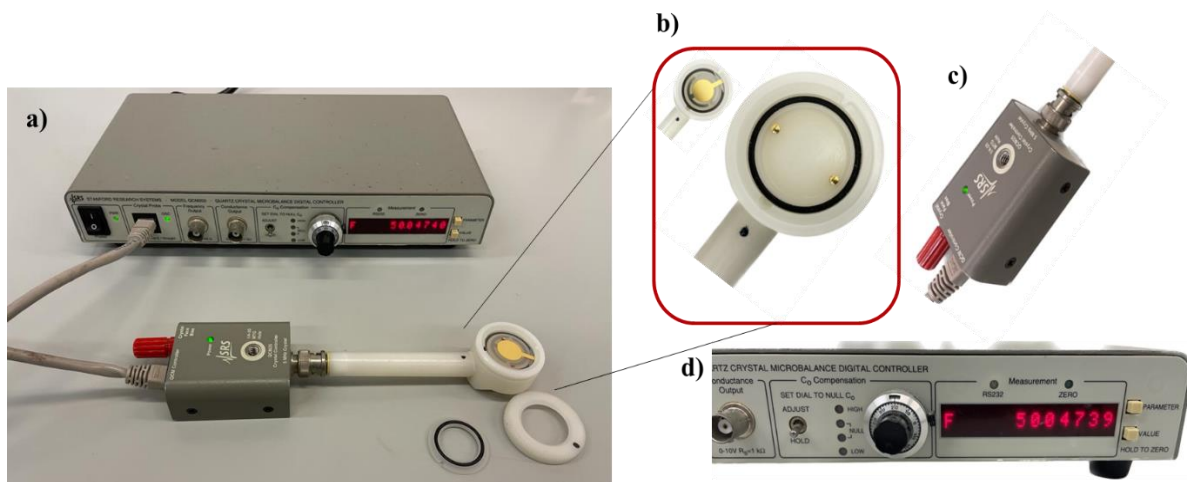
Dado que f_0 , A , ρ_q y μ_q son constantes referidas al cuarzo, es posible englobarlas en un factor de sensibilidad del cristal C_f y el cambio de masa por unidad de área ϕ simplificándose la (Ec. 4) en la siguiente:

$$\phi = - N \cdot C_f \cdot \Delta f \quad (\text{Ec. 3})$$

El equipo usado fue una microbalanza de la marca *Stanford Research Systems* modelo QCM200, con sensor de disco fino QCM25 de α -cuarzo cortado en la dirección AT ($35^\circ 15'$) y electrodos de oro circulares en ambas caras (Stanford Research Systems, 2018).

Figura E5.

Microbalanza de Cuarzo (QCM)



Nota. Configuración QCM completa compuesta por: (a) equipo QCM200, (b) soporte de cristal, (c) controlador de cristal QCM25 (vista superior), y (d) panel frontal del controlador digital.

Experimentalmente, lo que se realiza es un lavado del sustrato/sensor que va a utilizarse y se toma el valor de frecuencia medido como valor inicial f_0 . Posteriormente, se realiza la transferencia de la monocapa y se registran valores de frecuencia a distintos tiempos hasta observar que prácticamente no hay cambio en el valor de la frecuencia. Finalmente, aplicando la (Ec. 2), se

puede determinar el cambio de masa por unidad de superficie, es decir, el recubrimiento superficial. El proceso de medición con esta técnica se ilustra mejor en la **Figura F1**.

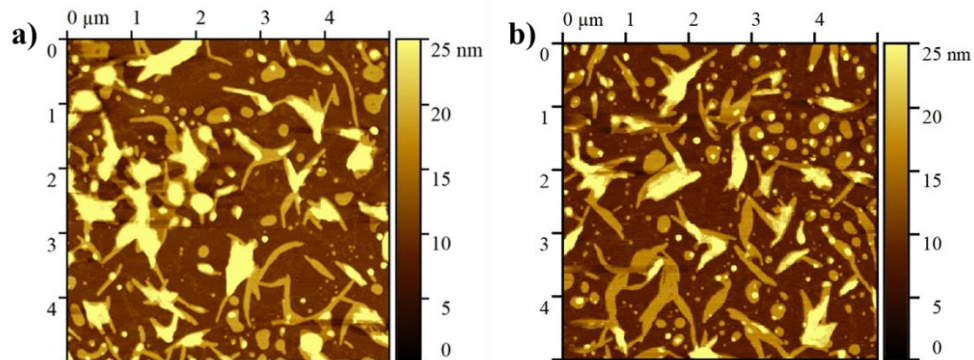
Figura F1.

Esquema del proceso de preparación y medición de la QCM



Apéndice G. Imágenes de AFM de DPPC:COL 1:1 + GSL y su interacción con MNPs**Figura G1.**

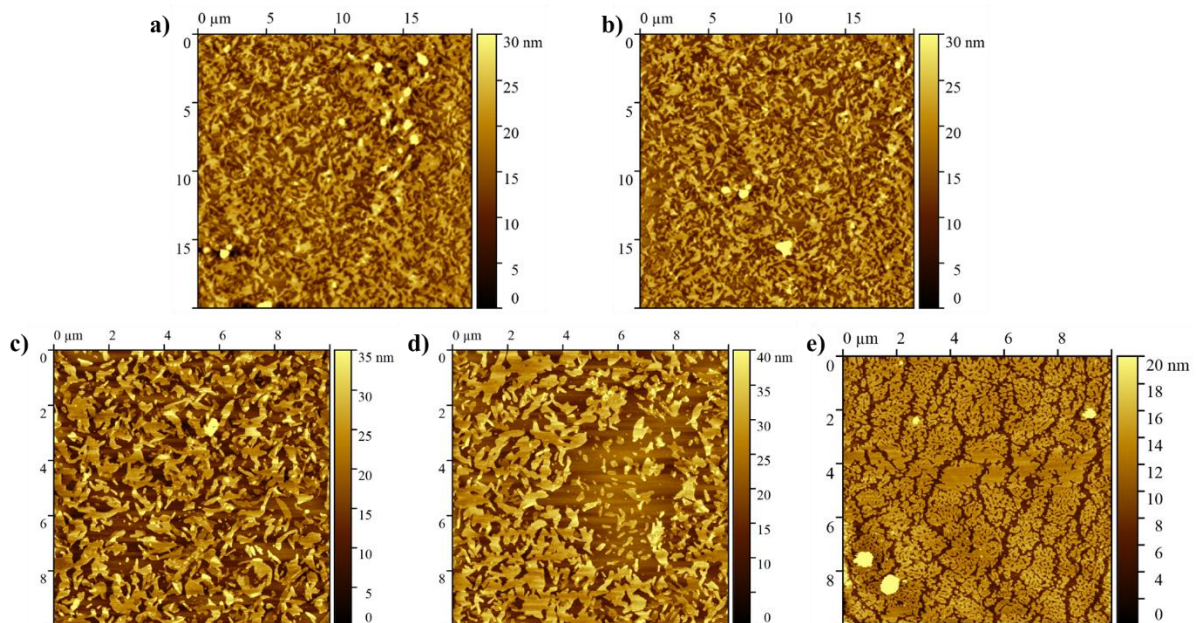
Imágenes de AFM de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ de la película DDPC-COL-GSL1



Nota. (a y b) Imágenes AFM sin tratamiento alguno en distintas zonas de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ de una monocapa LS de GSL1 sobre DPPC:COL 1:1 a una presión superficial de $8 \text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

Figura G2.

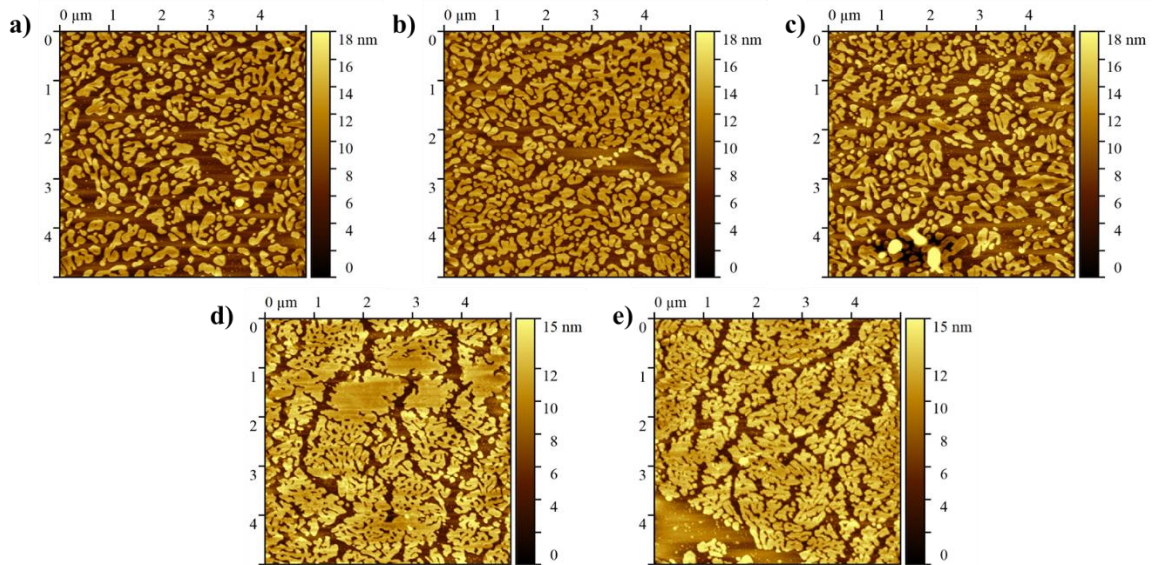
Imágenes de AFM de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ y $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ de la película DDPC-COL-GSL3



Nota. (a y b) Imágenes AFM sin tratamiento alguno en distintas zonas de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ y (c,d y e) de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ de una monocapa LS de GSL3 sobre DPPC:COL 1:1 a una presión superficial de $8 \text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

Figura G3.

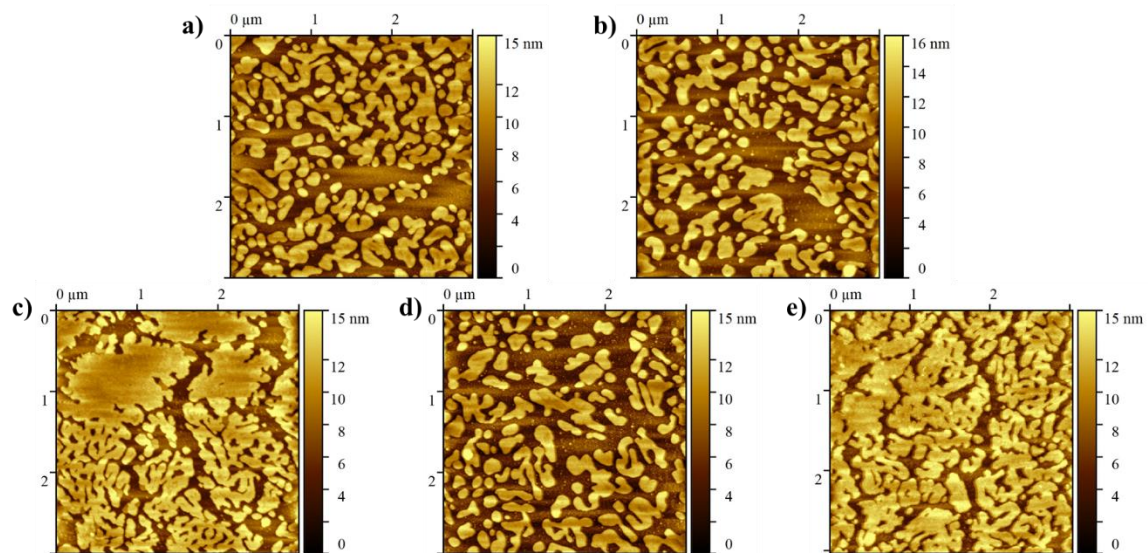
Imágenes de AFM de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ de la película DDPC-COL-GSL3



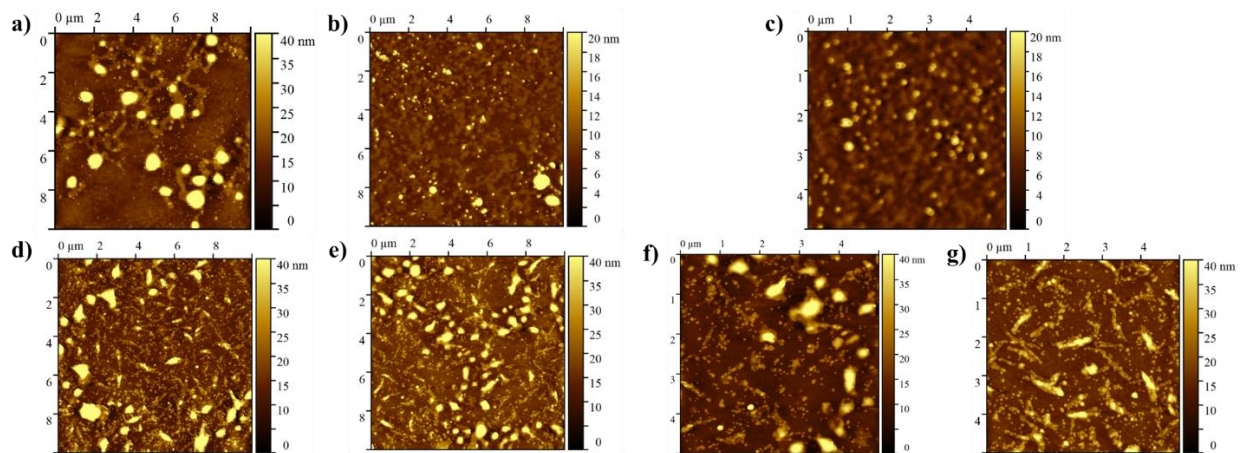
Nota. (a, b, c, d y e) Imágenes AFM sin tratamiento alguno en distintas zonas de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ de una monocapa LS de GSL3 sobre DDPC:COL 1:1 a una presión superficial de $8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

Figura G4.

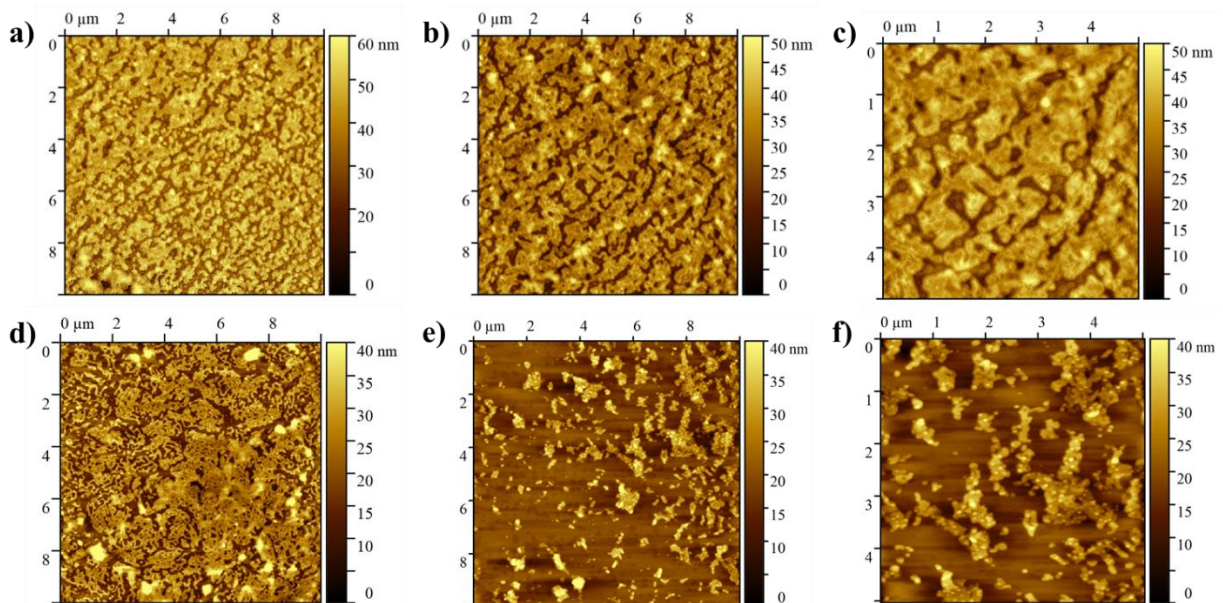
Imágenes de AFM de $3 \times 3 \mu\text{m}^2$ de la película DDPC-COL-GSL3



Nota. (a, b, c, d y e) Imágenes AFM sin tratamiento alguno en distintas zonas de $3 \times 3 \mu\text{m}^2$ de una monocapa LS de GSL3 sobre DDPC:COL 1:1 a una presión superficial de $8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

Figura G5.*Comparación de la película de DPPC-COL-GSL1 incubada con MNPs*

Nota. Imágenes AFM sin tratamiento alguno de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ y $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ de la película de DPPC-COL-GSL1 incubada por 1 h con (a, b y c) MNPs sin alquino y (d,e,f y g) MNPs con alquino.

Figura G6.*Comparación de la película de DPPC-COL-GSL3 incubada con MNPs*

Nota. Imágenes AFM sin tratamiento alguno de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ y $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ de la película de DPPC-COL-GSL3 incubada por 1 h con (a,b y c) MNPs sin alquino y (d,e y f) MNPs con alquino.

Apéndice H. Cálculos de la Microbalanza de Cuarzo (QCM)**Tabla H1.***Parámetros constantes de los sustratos de QCM*

Parámetro	f ₀ (Hz)	ρ _q (g·cm ⁻³)	μ _q (din·cm ⁻²)	N _A (mlc·mol ⁻¹)	PM (g·mol ⁻¹)		
					DPPC:COL	GSL1	GSL3
Valor	5e ⁺⁶	2,648	2,95e ⁺¹¹	6,02 e ⁺²³	560,345	812,27	837,29

Nota. f₀: resonancia fundamental, ρ_q: densidad, μ_q: módulo de rigidez, N_A: número de Avogadro, PM: peso molecular de los compuestos.

Tabla H2.*Masa de las MNPs*

Tipo de MNP	Masa (g)				Masa total (g)	Masa total (μg)
	Inorgánica	PMAO	PEG	DBCO		
PMAO@PEG	6,03e ⁻¹⁸	1,28e ⁻¹⁸	1,56e ⁻¹⁸	-	8,87e ⁻¹⁸	8,87e ⁻¹²
PMAO@PEG@DBCO	6,03e ⁻¹⁸	1,28e ⁻¹⁸	1,56e ⁻¹⁸	2,62e ⁻¹⁹	9,13e ⁻¹⁸	9,13 ⁻¹²

Nota. PMAO@PEG: MNPs sin alquino, PMAO@PEG@DBCO: MNPs con alquino.

Se registran frecuencias iniciales del cuarzo antes de cualquier deposición (f₀) y después de realizar la primera transferencia correspondiente a la monocapa de la película de DPPC:COL 1:1 (f₁), cabe recordar que este método involucra un recubrimiento por ambas caras del sustrato; por ende para el cálculo de la masa depositada se usa un N = 2. A continuación, se expone el ejemplo del cálculo para el primer experimento (los demás se determinan con la misma metodología):

$$\Delta f = -N \cdot \frac{2f_0^2}{\rho_q^{1/2} \cdot \mu_q^{1/2}} \cdot \frac{\Delta m}{A} = -2 \cdot \frac{2f_0^2}{\rho_q^{1/2} \cdot \mu_q^{1/2}} \cdot \phi$$

Teniendo presente que el valor de sensibilidad del cuarzo es de $C_f = 56,6 \text{ Hz}\cdot\text{cm}^2\cdot\mu\text{g}^{-1}$ y despejando el cambio de masa por unidad de área (ϕ) se tiene:

$$\phi = \frac{5017103 - 5017143}{-56,6} = \frac{-40}{-56,6} = 0,35353 \frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^2}$$

Una vez calculado ϕ , se puede conocer el número de moles por unidad de área (Δn) a partir del peso molecular promedio de los compuestos DPPC y COL; con el número de Avogadro se pasa de moles por área a el número de moléculas por unidad de área (Γ). Para poder comparar los datos obtenidos experimentalmente de la QCM con los calculados por el software de la cuba NIMA KSV durante la transferencia (A_{cuba}) es necesario igualar las unidades y dimensiones, para esto se invierte el Γ , obteniendo $1/\Gamma$ y pasando de $\text{cm}^2\cdot\text{mlc}^{-1}$ a $\text{nm}^2\cdot\text{mlc}^{-1}$. Finalmente, la comparación o ratio de transferencia se realiza dividiendo el valor experimental de la cuba sobre el valor experimental de la QCM (ver **Tabla H3**).

Tabla H3.

Cálculos para la monocapa de DPPC:COL 1:1

Parámetro	No. Sustrato de QCM			
	1	2	3	4
f_0 (Hz)	5017143	5006438	5008695	5001702
f_1 (Hz)	5017103	5006409	5008664	5001672
Δf (Hz)	-40	-29	-31	-30
ϕ ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	0,353	0,256	0,274	0,265
Δn ($\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$)	$6,31\text{e}^{-4}$	$4,57\text{e}^{-4}$	$4,89\text{e}^{-4}$	$4,73\text{e}^{-4}$
Γ ($\text{mlc}\cdot\text{cm}^{-2}$)	$3,78 \text{e}^{+14}$	$2,75 \text{e}^{+14}$	$2,94\text{e}^{+14}$	$2,85\text{e}^{+14}$
$1/\Gamma$ ($\text{nm}^2\cdot\text{mlc}^{-1}$)	0,263	0,363	0,339	0,351
A_{cuba} ($\text{nm}^2\cdot\text{mlc}^{-1}$)	0,462	0,409	0,395	0,378
TR	1,756	1,127	1,163	1,078

Nota. Δf : delta de frecuencia de resonancia, ϕ : cambio de masa por unidad de área, Γ : número de moléculas por unidad de área, $1/\Gamma$: área por molécula experimental, A_{cuba} : área por molécula calculado por la Cuba KSV NIMA, TR: ratio de transferencia.

Sobre una cara de los sustratos se realiza la transferencia Langmuir-Schaefer de los GSL e, para ello, en la (Ec.3) se reemplaza el N=1, obteniéndose la siguiente expresión:

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2}{\rho_q^{1/2} \cdot \mu_q^{1/2}} \cdot \phi = -56,6 \cdot \phi$$

Se mide la frecuencia (f_2) de la monocapa correspondiente al LS del GSL. Se recalculan los mismos parámetros anteriores.

Tabla H4.

Cálculos para la monocapa de GSL

Langmuir-Schaefer GSL	No. Sustrato de QCM			
	GSL3			
Parámetro	1	4	2	3
f_1 (Hz)	5017103	5006409	5001672	5008664
f_2 (Hz)	5017078	5006378	5001643	5008635
Δf (Hz)	-25	-31	-29	-29
ϕ ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	0,442	0,548	0,512	0,512
Δn ($\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$)	$5,28\text{e}^{-4}$	$6,54\text{e}^{-4}$	$6,31\text{e}^{-4}$	$6,31\text{e}^{-4}$
Γ ($\text{mlc}\cdot\text{cm}^{-2}$)	$3,18\text{e}^{+14}$	$3,94\text{e}^{+14}$	$3,79\text{e}^{+14}$	$3,79\text{e}^{+14}$
$1/\Gamma$ ($\text{nm}^2\cdot\text{mlc}^{-1}$)	0,315	0,253	0,263	0,263
A_{cuba} ($\text{nm}^2\cdot\text{mlc}^{-1}$)	0,238	0,276	0,2963	0,2929
TR	0,759	1,086	1,126	1,113

Se determinó además la cantidad teórica de MNPs (asumiendo que toda la superficie del GSL3 reaccione con estas) al dividir la masa del GSL depositada sobre el sustrato(ϕ) por la masa total de las NPs. Se obtuvieron valores de $4,98\text{e}^{+10}$ y $6,00\text{e}^{+10}$ $\text{MNP}\cdot\text{cm}^{-2}$ para los sustratos 1 y 4 respectivamente. Previo a las incubaciones con MNPs se registra un nuevo valor de frecuencia (f_2') de las deposiciones de GLS con el fin de estimar el valor real de la masa antes del SAM. Se mide la frecuencia (f_3) posterior a la incubación de las NPs, se cuantificó la cantidad de masa depositada por unidad de área de las mismas.

Tabla H5.*Masa depositada de MNPs sobre los modelos de membrana celular*

Langmuir-Schaefer GSL	No. Sustrato de QCM			
	GSL3		GSL1	
	Tipo de MNPs	Sin alquino	Con alquino	Sin alquino
Parámetro	1	4	2	3
f_2' (Hz)	5017086	5006384	5001643	5008635
f_3 (Hz)	5017083	5006374	5001690	5008723
Δf (Hz)	-3	-10	47	88
ϕ ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	0,027	0,088	-0,415	-0,777

Debido a que se obtuvieron deposiciones negativas de MNPs sobre los modelos membranales con GSL1, se omitió el cálculo experimental de la cantidad de MNPs por unidad de área, este se determina dividiendo el valor ϕ sobre la masa de las MNPs para cada caso (con/sin alquino) y la diferencia de estos (desorción). Se **aclara** y **enfatisa** que este es un dato adicional que no es analizado al no ser comparable con los experimentos de las MNPs de control (sin alquino + GSL1).

Tabla H6.*Recubrimiento de MNPs sobre los modelos de membrana con GSL3*

Tipo de MNPs	Cantidad de MNP – área (MNP·cm ⁻²)			Recubrimiento
	Experimental	Teórico	Desorción	
Con alquino	1,06e ⁺¹⁰	6,00e ⁺¹⁰	4,94e ⁺¹⁰	17,74%
Sin alquino	5,98e ⁺⁰⁹	4,98e ⁺¹⁰	4,38e ⁺¹⁰	12,00 %

Apéndice I. Espectrómetro de Infrarrojo por Transformada de Fourier en modo ATR (FTIR-ATR)

La espectroscopia de infrarrojo es una técnica química que permite obtención de 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: Transmisión, Reflexión y modo ATR (Attenuated Total Reflection), donde este último es un modo de muestreo en que un haz de 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 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 (Vilan et al., 2017).

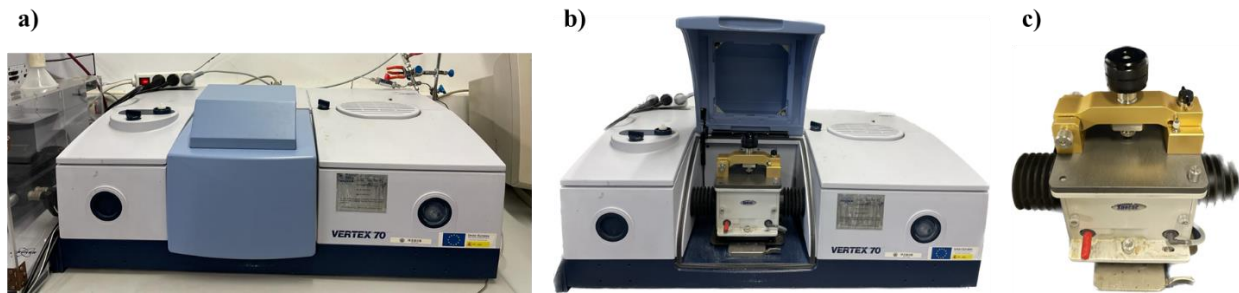
Para los experimentos de espectroscopia de infrarrojo el Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragon (INMA) cuenta con un Espectrómetro de Infrarrojo por Transformada de Fourier Vertex 70 modelo Tensor 27 de la casa comercial *Bruker*, con una fuente MIR y con el accesorio de ATR modelo *Platinum ATR, Bruker* con cristal de diamante. Con el cual se pueden obtener espectros en la región del infrarrojo entre 4000 cm^{-1} y 400 cm^{-1} (Bruker Optics, 2013, 2021). La **Figura II.** describe las componentes importantes del FTIR.

El modo de ATR que se utiliza es el Avanzado Golden Gata_C2_XPM, con una velocidad de barrido de 2 cm^{-1} y 256 scans. Para cada experimento, se limpia meticulosamente el cristal de alto índice de refracción (donde se coloca la muestra) con etanol, esto con el fin de que no afecte los espectros infrarrojos de la muestra analizar. El uso de esta técnica nos permitió resolver la

estructura de enlace entre la molécula y el sustrato, y estudiar la orientación de los compuestos y los grupos de anclaje mediante la reacción *click* bioortogonal.

Figura II.

Espectrómetro de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR-ATR)



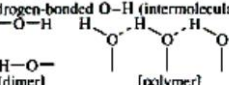
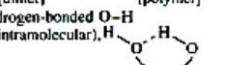
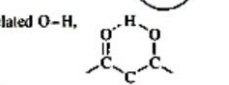


Nota. Componentes externos e internos del FTIR siendo: (a) parte frontal del espectrofotómetro, (b) compartimiento de muestras con dimensiones de 25,5 x 27 x 16 cm y (c) accesorio ATR con cristal de diamante modelo *Bruker Platinum*.

Apéndice J. Número de onda de los grupos funcionales
Tabla J1.
Rangos de número de onda de grupos funcionales alquino
Table 4.1 Alkyne C≡C stretching vibrations

Functional Groups	Region		Intensity		Comments
	cm ⁻¹	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 ⁻¹
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 ⁻¹
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 ₂ 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 ⁻¹
-C≡C-Br	2250–2150	4.44–4.65	m	s, p	Strong band due to C-Br str 690–350 cm ⁻¹
-C≡C-I	2220–2120	4.50–4.72	m	s, p	C-I str 660–310 cm ⁻¹
M-C≡C-H, M=P, As, Sb, Ge, Sn, SiH ₃	2055–2015	4.87–4.96	w–m	s, p	
M-C≡C-CH ₃ , (M as above)	2200–2170	4.55–4.61	s	s, p	

Nota. Tabla 4,1 de los rangos de número de onda de grupos funcionales alquino. Tomado de (Long, 2004).

Tabla J2.
Rangos de número de onda de grupos funcionales hidroxilo (-OH)
Table 6.1 Hydroxyl group O-H stretching vibrations

Functional Groups	Region		Intensity		Comments
	cm ⁻¹	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 ⁻¹
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 ⁻¹ . 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 de los rangos de número de onda de grupos funcionales hidroxilo. Tomado de (Long, 2004).

Tabla J3.

Rango de número de onda de grupos funcionales azida

Table 5.2 (continued)

Functional Groups	Region		Intensity		Comments
	cm ⁻¹	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 ₂ ⁺ , ~2150 cm ⁻¹)
	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 >C=N=N-	2050-2000	4.88-5.00	vs	v	bc, asym str CNN
	1390-1330	7.19-7.52	s	m-s	sym str CNN
Diazoketones and diazoesters, -CO-C=N ⁺ =N ⁻	2075-2050	4.82-4.88	s	m-s	(Ketones: C=O str, 1650-1600 cm ⁻¹ and strong band, 1390-1330 cm ⁻¹ - may be doublet; alkylketones: C=O str, ~1645 cm ⁻¹)
	2300-2230	4.35-4.69	m-s	m-s	N=N str, see refs: 31 and 32
Ketenes, >C=C=O	2200-2080	4.45-4.81	m-s	v	often found near 2150 cm ⁻¹
R ₃ SiCH=C=O	~1130	~8.85	v	m-s, p	sym C=C=O str. Range 1420-1120 cm ⁻¹ usually s-m (Aromatics: IR intensity w, Raman s, p).
	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
Ketenimines, >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 ⁻¹ usually being the stronger
Thionylamines -N=S=O	2115-2105	4.73-4.75	vs	m-s, p	NSO asym str NSO sym str
	1300-1230	7.69-8.13	v	s, p	
	1180-1100	8.48-9.09	v	s	

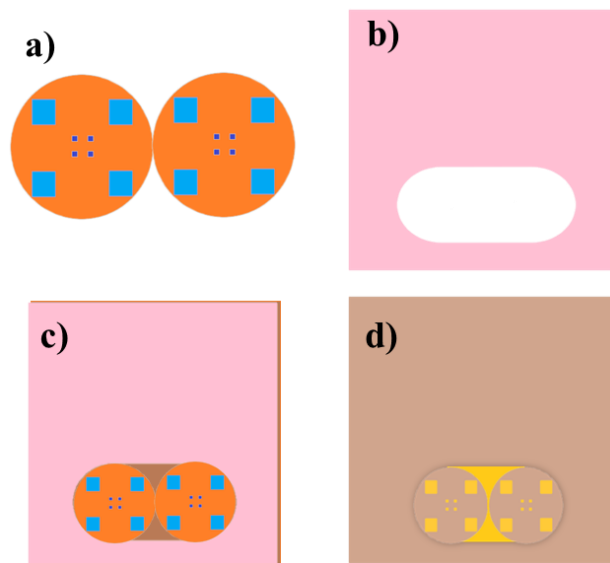
Nota. Tabla 5.2 de los rangos de número de onda de grupos funcionales hidroxilo. Tomado de (Long, 2004).

Apéndice K. Marcación de la mica

Las marcas sobre la mica 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 son 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 75 nm de material.

Figura K1.

Etapas de marcación del sustrato de mica



Nota. (a) Molde de color naranja donde las marcas azules son los agujeros, (b) plástico de protección de la mica, (c) mica preparada para PVD y (d) resultado final de la mica una vez hechas las marcas.