

Caracterización de sistemas membranales simulados con potencial aplicación en nanotecnología mediante microscopía de fuerza atómica

Camila Andrea Cristancho Veloza y Kevin Andrés Pinzón Chapeta

Trabajo de Grado para optar por el título de Ingeniero Químico

Pasantía de investigación

Directora:

Luz Marina Ballesteros Rueda

Ingeniera Química, MSc, Ph. D

Codirectora:

Pilar Cea Mingueza

Doctora en Ciencias Universidad de Zaragoza

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2026

Dedicatoria

Dedico este trabajo, en primer lugar, a mis padres, Deicy y Ernesto, por haber creído siempre en mí y por brindarme todo lo necesario para mi educación y crecimiento. Gracias por su apoyo incondicional, por su esfuerzo constante y por ser el pilar fundamental en mi formación personal y profesional.

A mis talentosas hermanas, Sara, Angie y Dayana, por ser mi motor y motivación diaria. Por recordarme que la ternura y la inocencia no deben perderse, y por ser ese amor en envase pequeño que llena de alegría y energía mi vida.

A mis abuelas, tíos, tías, primos y primas, por su apoyo, sus palabras de aliento y por acompañarme en cada etapa de este proceso.

A mi prima Karol, compañera de aventuras, confidente y una de las personas más importantes en mi vida.

A mis nuevos amigos internacionales, Magaly, July, Yess, Scarleth y Carlos, con quienes compartí gran parte de esta experiencia y momentos inolvidables. Espero que la vida nos permita reencontrarnos y continuar todas esas chocoaventuras que quedaron pendientes.

A mis amigos de toda la vida, Jon, Felipe, por acompañarme en tantos momentos significativos, por su apoyo en los momentos difíciles y por recordarme siempre de dónde vengo. Gracias por su amistad sincera e incondicional.

Kevin Andrés Pinzón

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo, en primer lugar, a mis padres, Alfonso y Jaqueline, por su amor incondicional y permanente, por su apoyo constante y por los innumerables sacrificios que han realizado a lo largo de mi vida. Su ejemplo, sus valores y sus enseñanzas han sido fundamentales para alcanzar este logro, que les pertenece tanto como a mí.

A mis queridos hermanos, Karol y Juan, por ser una fuente constante de inspiración y motivación, y por acompañarme con su apoyo y afecto en cada etapa de este camino, siempre lleno de aprendizaje y amor.

A Dios, por brindarme la fortaleza, la sabiduría y la perseverancia necesarias para superar cada desafío y culminar esta importante meta.

A mis amigos Aura, Daniela, Leidy, Juan Diego y Julián, quienes han sido parte esencial de mi vida desde el inicio de este camino profesional, por su compañía, su apoyo incondicional y su constante motivación a lo largo de este proceso.

Finalmente, a todas las personas que, de una u otra manera, contribuyeron a la realización de este trabajo y a mi formación integral.

Me dedico también este trabajo a mí misma, como reconocimiento al esfuerzo, la constancia y la disciplina invertidos durante este proceso. Cada desafío enfrentado representó una oportunidad de aprendizaje y crecimiento, y cada meta alcanzada refleja la perseverancia y el compromiso asumidos desde el inicio.

Este logro simboliza no solo la culminación de una etapa académica, sino también la capacidad de superar obstáculos con determinación y convicción. Que este resultado sea un recordatorio permanente de que, con dedicación y trabajo continuo, es posible alcanzar los objetivos propuestos y abrir camino a nuevos desafíos.

¡Los quiero mucho a todos, con amor, Camila!

Agradecimientos

Expresamos nuestros más sinceros agradecimientos a la UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER y a la UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA por la formación académica brindada y por hacer posible el desarrollo de este trabajo de grado.

Agradezco especialmente al INSTITUTO DE NANOCIENCIA Y MATERIALES DE ARAGÓN (INMA) y a todo su personal de trabajo, en particular al LABORATORIO DE MICROSCOPIA AVANZADA, por facilitarnos el acceso a sus instalaciones y equipos, los cuales fueron fundamentales para la realización de esta investigación.

A la profesora LUZ MARINA BALLESTEROS RUEDA, directora de este trabajo, por su acompañamiento constante, orientación y compromiso durante todo el proceso. Por facilitar el enlace académico entre las universidades y por su apoyo incondicional, estando siempre pendiente del desarrollo de este proyecto.

A la profesora PILAR CEA MINGUEZA, codirectora de este trabajo, por recibarnos en la UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA, brindarnos la oportunidad de desarrollar esta investigación en su grupo de trabajo y por su paciencia, apoyo y guía en los momentos de mayor dificultad.

A MARTEN PIANTEK, por su disposición para enseñarnos los fundamentos teóricos del trabajo y guiarnos en el uso de los equipos experimentales.

A MARI CARMEN PALLARÉS, encargada del laboratorio de microscopía, por su constante apoyo, su energía y alegría, y por motivarnos día a día a dar lo mejor en el laboratorio.

A LAURA DOTOR, por su disposición y acompañamiento en las etapas iniciales, así como por los entrenamientos brindados para el adecuado uso de los equipos.

Finalmente, agradecemos a todas las personas que, de una u otra manera, hicieron parte de este proceso y contribuyeron a la realización de este trabajo

Tabla de contenido

Introducción	11
1. Objetivos	13
1.1 Objetivo general	13
1.2 Objetivos específicos	13
2. Estado del arte.....	14
3. Metodología	18
3.1 Materiales, reactivos y sustratos	19
3.2 Técnicas y equipos.....	21
3.2.1 Películas Langmuir-Blodgett (LB)	21
3.2.2 Películas de Langmuir-Schaefer (LS).....	23
3.2.3 Deposición de nanopartículas magnéticas (MNPs).	24
3.2.4 Caracterización mediante microscopía de fuerza atómica.....	25
3.2.5 Aplicación de campo magnético	27
4. Resultados y discusión.....	28
5. Conclusiones	41
6. Referencias bibliográficas.....	43

Lista de tablas

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de los compuestos DPPC y CHOL. 19

Lista de figuras

Figura 1. Fases de transición de la bicapa lipídica	14
Figura 2. Comportamiento termotrópico de los lípidos.....	16
Figura 3. Unión covalente mediante química click bioortogonal de NPs magnéticas	17
Figura 4. Diagrama metodológico del proceso.....	18
Figura 5. Sustrato de mica.	21
Figura 6. Película de Langmuir.....	22
Figura 7. Transferencia Langmuir-Blodgett.....	22
Figura 8. Transferencia Langmuir-Schaefer (LS).....	23
Figura 9. Microscopio de fuerza atómica y cantiléver.....	26
Figura 10. Modo de trabajo del AFM.....	26
Figura 11. Isotherma de presión superficial-área π -A de la monocapa DPPC:CHOL (1:1).....	30
Figura 12 Imágenes AFM y perfiles de altura de la monocapa DPPC:CHOL (1:1) transferida a distintas presiones superficiales: (a) $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, (b) $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ y (c) $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$	31
Figura 13 Estructura de los glicoesfingolípidos	33
Figura 14 Caracterización AFM de la bicapa DPPC:CHOL (1:1) y GSL1: (a) imagen topográfica, (b) esquema del recubrimiento con los valores de cobertura obtenidos mediante Gwyddion, y (c) perfil de altura correspondiente a la línea roja de la imagen.	35
Figura 15 Caracterización AFM de la bicapa DPPC:CHOL (1:1) y GSL3: (a) imagen topográfica, (b) esquema del recubrimiento con los valores de cobertura obtenidos mediante Gwyddion, y (c) perfil de altura correspondiente a la línea roja de la imagen.	36
Figura 16. Sistema caracterizado con AFM de la bicapa DPPC:CHOL (1:1) y GSL3. (a) Sistema antes de incubación de MNPs, (b) Sistema después de incubación de MNPs.	37

- Figura 17.** Sistema caracterizado con AFM de la bicapa DPPC:CHOL (1:1) y GSL3 con deposición de MNPs. (a) imagen topográfica antes de la deposición de MNPs, (b) imagen topográfica después de la deposición de MNPs, (c) perfil de altura correspondiente a la línea roja de la Figura 17. (a), (d) perfil de altura correspondiente a la línea roja de la Figura 17. (b). 38
- Figura 18.** Distribución de alturas de la bicapa DPPC:CHOL/GSL3 (a) Distribución antes de la adición de nanopartículas, (b) Distribución después de la adición de nanopartículas . 39
- Figura 19.** Sistema caracterizado con AFM de la bicapa DPPC:CHOL (1:1) y GSL3 con deposición de MNPs y aplicación de hipertermia. (a) imagen topográfica antes de la aplicación de hipertermia, (b) imagen topográfica después de la aplicación de hipertermia, (c) perfil de altura correspondiente a la línea roja de la Figura 18. (a), (d) perfil de altura correspondiente a la línea roja de la Figura 18. (b). 40
- Figura 20.** Distribución de alturas de la película después de realizar hipertermia magnética. 41

Resumen

Título: Caracterización de sistemas membranales simulados con potencial aplicación en nanotecnología mediante microscopía de fuerza atómica *

Autor: Camila Andrea Cristancho Veloza, Kevin Andrés Pinzón Chapeta **

Palabras clave: Langmuir-Blodgett, Langmuir-Schaefer, Nanopartículas Magnéticas, Membrana Celular, Glicosfingolípidos, Microscopía de Fuerza Atómica, Clic Bioortogonal.

Descripción: La nanociencia es considerada una disciplina clave para abordar diversas incógnitas en campos como la medicina, la biología, la química y la ingeniería, entre otros. En este contexto, la modelización y optimización de estructuras biológicas, como las membranas celulares, resultan fundamentales para comprender mejor su funcionamiento. El presente trabajo de investigación fue desarrollado en el Instituto de Investigación Universitario de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA) y contribuye al avance en el conocimiento sobre las interacciones que ocurren a nivel de membrana celular. En particular, se enfoca en la simulación y caracterización de membranas celulares construidas a partir de tres componentes esenciales: colesterol, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y glicosfingolípidos (GSL1 y GSL3). Para ello, se emplean las técnicas de Langmuir-Blodgett (LB) y Langmuir-Schaefer (LS) como mecanismos de transferencia para generar monocapas de DPPC:CHOL de ratio 1:1 y bicapas de DPPC:CHOL:GSL1 y DPPC:CHOL:GSL3. Estas estructuras son posteriormente caracterizadas mediante microscopía de fuerza atómica (AFM). Finalmente, se analiza la interacción de nanopartículas de óxido de hierro con estas membranas, analizando su distribución antes y después de aplicar hipertermia magnética. A futuro, este tipo de estudios puede contribuir al desarrollo de estrategias para modificar propiedades de la membrana celular, como la fluidez y la permeabilidad, lo que facilitaría la introducción de sustancias, fármacos, en el interior de la célula.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Luz Marina Ballesteros Rueda, Doctora en Ingeniería Química. Co-directora: Pilar Cea Mínguez, Doctora en Ciencias

Abstract

Title: Characterization of simulated membrane systems with potential application in nanotechnology by atomic force microscopy*

Author: Camila Andrea Cristancho Veloza, Kevin Andrés Pinzón Chapeta**

Keywords: Langmuir-Blodgett, Langmuir-Schaefer, Magnetic Nanoparticles, Cell Membrane, Glycosphingolipids, Atomic Force Microscopy, Bioorthogonal Click.

Description: Nanoscience is considered a key discipline for addressing various unknowns in fields such as medicine, biology, chemistry, and engineering, among others. In this context, the modeling and optimization of biological structures, such as cell membranes, are fundamental for better understanding their functioning. The present research work was developed at the University Institute for Research in Nanoscience and Materials of Aragón (INMA), and contributes to advancing knowledge about the interactions that occur at the cell membrane level. In particular, it focuses on the simulation and characterization of cell membranes constructed from three essential components: cholesterol, dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), and glycosphingolipids (GSL1 and GSL3). To achieve this, the Langmuir–Blodgett (LB) and Langmuir–Schaefer (LS) techniques are used as transfer mechanisms to generate DPPC:CHOL monolayers with a 1:1 ratio and DPPC:CHOL:GSL1 and DPPC:CHOL:GSL3 bilayers. These structures are subsequently characterized using atomic force microscopy (AFM). Finally, the interaction of iron oxide nanoparticles with these membranes is analyzed, examining their distribution before and after applying magnetic hyperthermia. In the future, this type of study may contribute to the development of strategies to modify cell membrane properties, such as fluidity and permeability, which would facilitate the introduction of substances and drugs into the interior of the cell.

* Degree work

** Faculty of Physicochemical Engineering. School of Chemical Engineering. Director: Luz Marina Ballesteros Rueda, PhD in Chemical Engineering. Co-director: Pilar Cea Minguez, Doctor of Science.

Introducción

La nanociencia continúa expandiendo sus fronteras. En las últimas décadas este campo ha impulsado importantes avances en el estudio de las propiedades de los materiales a escala nanométrica, generando un impacto significativo en diversas disciplinas que abarcan desde la física, la ingeniería y la ciencia de los materiales hasta la biología, la medicina y la química (Hulla, Sahu & Hayes, 2015).

La búsqueda de nuevos métodos de administración de fármacos para el tratamiento del cáncer constituye un área prioritaria en la biomedicina moderna. En este contexto, la membrana celular, al actuar como principal barrera de interacción entre los entornos extracelular e intracelular, representa una plataforma clave para el desarrollo de estrategias terapéuticas innovadoras. (Zhang et al., 2021).

En particular, el estudio de las membranas celulares ha despertado gran interés, debido a que su estructura y función son esenciales para el mantenimiento de la vida celular. Estas pueden modelarse mediante sistemas compuestos por fosfolípidos y colesterol, lo que permite comprender procesos biológicos fundamentales, como el transporte de moléculas y la interacción con fármacos (Ahern & Rajagopal, 2015). En este contexto surge el presente proyecto de investigación, el cual se orienta a la simulación y caracterización de sistemas membranales modelo.

Este trabajo de investigación fue desarrollado en el Instituto de Investigación Universitario de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA) y se enfoca en la fabricación de sistemas membranales modelados a partir de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) y colesterol, con el objetivo de evaluar su potencial para facilitar la transferencia controlada de componentes bioactivos, como azúcares y nanopartículas. Estos sistemas modelo de membrana permiten reproducir algunas propiedades fisicoquímicas de la membrana celular, proporcionando un marco

experimental adecuado para estudiar interacciones moleculares y explorar posibles aplicaciones biomédicas. La preparación de estos sistemas se llevó a cabo mediante las técnicas de Langmuir-Blodgett (LB) y Langmuir-Schaefer (LS).

Los sistemas membranales basados en DPPC y colesterol son especialmente útiles para estudiar cómo interactúan diferentes moléculas, como fármacos, proteínas o péptidos, con la membrana (Ingólfsson et al., 2016). La caracterización de estos modelos se realiza mediante la técnica de microscopía de fuerza atómica (AFM) la cual ha resultado ser particularmente valiosa en esta investigación.

La técnica de caracterización AFM permite analizar la topografía y morfología de muestras con resolución nanométrica, lo que la convierte en una herramienta idónea para examinar las características físicas y estructurales de las membranas (Pérez et al., 2023). Además, no sólo proporciona imágenes tridimensionales detalladas, sino que también permite evaluar propiedades mecánicas como la rigidez, la elasticidad y la adherencia.

Asimismo, esta técnica permite detectar cambios locales en la organización de los lípidos o en la distribución del colesterol dentro de la bicapa. Estas capacidades convierten al AFM en una herramienta fundamental para el diseño y análisis de modelos de membrana, así como para la comprensión de los procesos biológicos que ocurren en estas estructuras. En consecuencia, el AFM facilita el estudio de las interacciones biomoleculares en la membrana y su influencia sobre la función y estabilidad de estos sistemas. Con base en lo anterior, este trabajo de investigación se centra en la simulación y caracterización de membranas celulares utilizando las técnicas de LB y LS. Asimismo, se estudia la interacción de estas membranas con nanopartículas magnéticas de óxido de hierro funcionalizadas, con el objetivo de favorecer procesos de química clic bioortogonal entre las nanopartículas magnéticas (MNPs) y los componentes de la membrana celular.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Caracterizar los sistemas de bicapas lipídicas soportadas (SLB), fabricadas a partir de fosfolípidos (Dimetilfosfatidilcolina y colesterol), usando la técnica de microscopía de fuerza atómica (AFM).

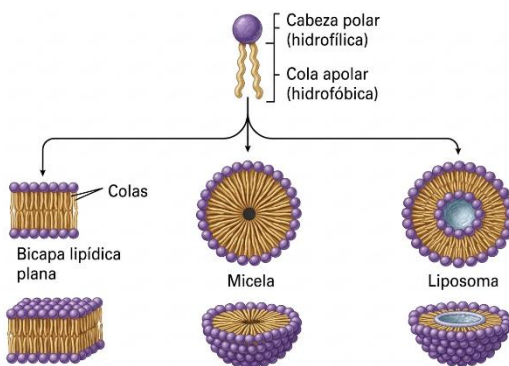
1.2 Objetivos específicos

- Determinar las condiciones experimentales y los parámetros fisicoquímicos óptimos de la mezcla lipídica DPPC:CHOL (1:1) para la formación y transferencia de bicapas lipídicas DPPC:CHOL:GSLs sobre sustratos de mica, empleando las técnicas Langmuir-Blodgett y Langmuir-Schaefer.
- Evaluar la incorporación de nanopartículas magnéticas en bicapas lipídicas modelo DPPC:CHOL:GSLs mediante su caracterización topográfica por microscopía de fuerza atómica (AFM).

2. Estado del arte

Las membranas modelo basadas de fosfolípidos han recibido una atención considerable en la investigación científica, debido a que los fosfolípidos constituyen uno de los principales componentes de las membranas celulares de organismos procariontas y eucariotas (Balleza et al., 2020). Por esta razón, se han desarrollado diversos sistemas de membranas lipídicas artificiales, también conocidas como membranas sintéticas o modelos de membrana, que permiten estudiar de manera controlada su estructura, propiedades y comportamiento (Navarro Tovar et al., 2018). Entre los modelos de membrana más ampliamente estudiados se encuentran las micelas y los liposomas (Figura 1), estructuras que se forman a partir de fosfolípidos cuyo carácter anfipático favorece su autoensamblaje en medios acuosos, dando lugar a organizaciones supramoleculares estable (Uria Canseco & Pérez Casas, 2019).

Figura 1. *Fases de transición de la bicapa lipídica*



Nota. Fuente Chen et al., 2010

El amplio repertorio de fosfolípidos presentes en las membranas biológicas resulta complejo y diverso; sin embargo, solo algunas moléculas de lípidos saturados han sido ampliamente utilizadas en la construcción de modelos de membranas lipídicas sintéticas. Entre ellas se encuentran el DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina), DMPC (1,2-dimiristoil-sn-glicero3-

fosfocolina), DLPE (dilauroilfosfatidiletanolamina), DSPC (diestearoil fosfatidilcolina), entre otras (Jovanović et al., 2018; Khakbaz & Klauda, 2018; Rappolt, 2019).

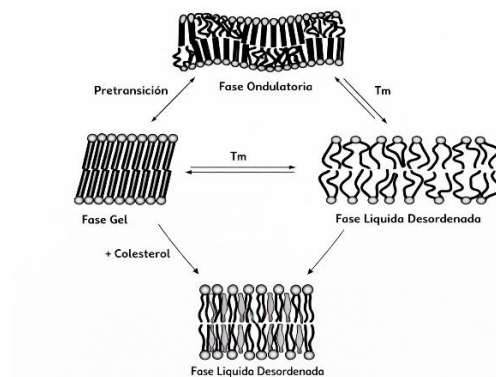
La bicapa lipídica, ser sometida a variaciones de temperatura, puede experimentar cambios conformacionales en las moléculas que la componen, particularmente en los fosfolípidos, que constituyen sus principales componentes estructurales. Estos cambios estructurales, que ocurren a determinadas temperaturas, se conocen como transiciones de fase (Ver Figura 2).

La fase gel se caracteriza por interacciones de Van der Waals más fuertes entre las cadenas hidrocarbonadas, lo que favorece un empaquetamiento más compacto y ordenado de los lípidos, limitando el movimiento lateral de los fosfolípidos a lo largo de la membrana (Moraga, 2020).

La fase líquida desordenada indica un estado altamente fluido, en donde los lípidos individuales tienen la capacidad de moverse lateralmente a través de la superficie de la membrana relativamente sin obstáculos. Se caracteriza por un empaquetamiento irregular y presencia de torceduras en los ácidos grasos insaturados, que reducen el área de superficie accesible a otras cadenas de ácidos grasos, debilitando las interacciones de Van der Waals.

La fase líquida ordenada se considera como un híbrido entre las fases desordenada y gel, pero con una tasa de difusión lateral más alta que en fase gel.

Finalmente, la fase ondulatoria se caracteriza por la aparición de ondulaciones periódicas en la superficie de la membrana cuando aumenta la temperatura. Estas ondulaciones se asocian principalmente con la organización de las cabezas polares de los fosfolípidos, lo que permite clasificar a los lípidos formadores y no formadores de ondulaciones según la naturaleza de sus grupos de cabeza. Entre los lípidos formadores de ondulaciones se encuentran las fosfatidilcolinas (Davis, 2021).

Figura 2. Comportamiento termotrópico de los lípidos

Nota. Fuente, Davis, 2021.

Las membranas celulares modelo empleadas en este trabajo de grado fueron fabricadas a partir de una mezcla de fosfolípido 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) y colesterol (COL) en una relación molar 1:1. El DPPC fue seleccionado debido a que es uno de los fosfolípidos más representativos en estudios de membranas modelo, además de ser un componente importante de las membranas celulares y del surfactante pulmonar, lo que lo convierte en un sistema ampliamente utilizado para investigar propiedades estructurales y dinámicas de bicapas lipídicas.

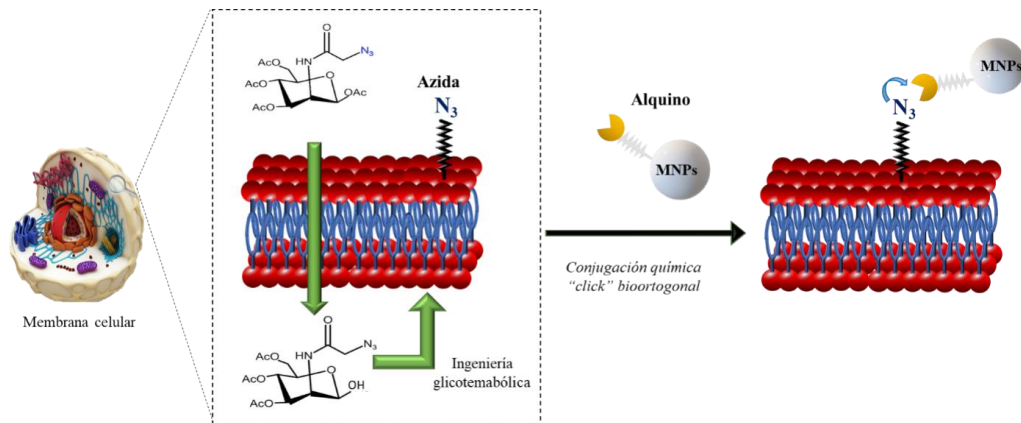
Por otro lado, el colesterol fue incorporado debido a su papel fundamental en la organización y regulación de las membranas celulares (F. Dufrêne et al., 1999). Este lípido actúa como modulador de la fluidez de la membrana (Garcia-Manyes et al., 2005) y de las transiciones de fase de las bicapas lipídicas. Además, el colesterol puede aumentar el orden estructural de las cadenas de fosfolípidos en la fase fluida ((Redondo Morata et al., 2012), mientras que en la fase gel puede inducir un efecto opuesto al disminuir el grado de empaquetamiento lipídico. Asimismo, se ha reportado que el colesterol participa en la regulación de los mecanismos responsables de la asimetría de fosfolípidos en la membrana celular (Garcia-Manyes et al., 2010).

Diversos estudios han demostrado que una proporción equimolar de DPPC y colesterol (1:1) permite obtener monocapas *Langmuir-Blodgett* altamente homogéneas, las cuales se

caracterizan por la ausencia de defectos tridimensionales y agregados de los componentes. Estas propiedades las hacen particularmente adecuadas para su análisis mediante microscopía de fuerza atómica (AFM).

En consecuencia, en el presente estudio se empleó la mezcla DPPC :CHOL en relación 1:1 para la formación de películas de *Langmuir*, las cuales posteriormente fueron transferidas a un sustrato sólido de mica. Los resultados más significativos obtenidos durante este trabajo de grado se centran en la caracterización de estas membranas celulares modelo, así como en la evaluación de la funcionalización mediante química *click* bioortogonal (ver Figura 3) con el fin de favorecer la unión covalente de nanopartículas magnéticas a la superficie de la membrana.

Figura 3. Unión covalente mediante química *click* bioortogonal de NPs magnéticas



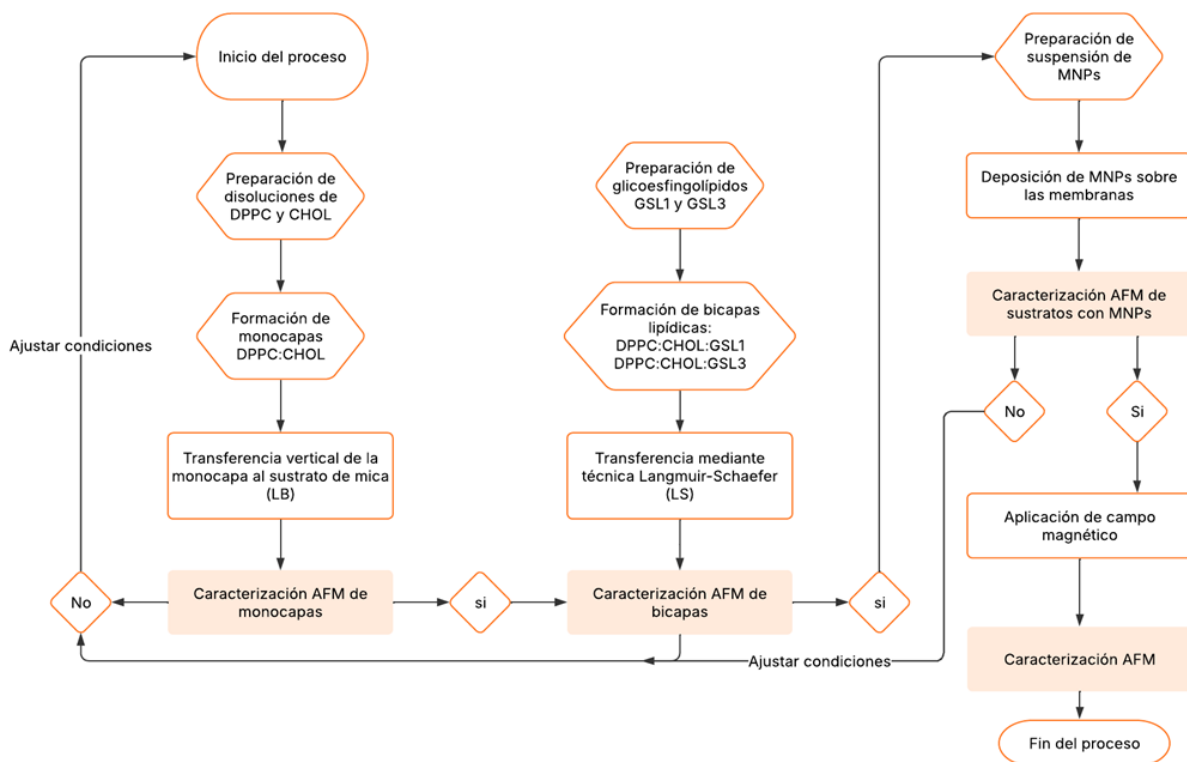
Nota. Unión covalente de MNPs magnéticas a la superficie de membranas celulares mediante química *click* bioortogonal. Adaptado de (Herrero, 2018).

3. Metodología

Los valores de presión superficial y velocidad de transferencia utilizados en este trabajo de investigación se establecieron con base en estudios previos realizados y presentados en la tesis doctoral “Modelos de membranas celulares y su interacción con nanopartículas magnéticas”, elaborada por Silvia Ruiz Rincón. En los estudios termodinámicos realizados se observó que, a una presión de $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, se obtuvo el valor máximo del módulo de Young y las monocapas formadas fueron altamente homogéneas sobre los sustratos de mica.

La metodología del proceso se desarrolla en un diagrama de flujo (Ver Figura 4), el cual corresponde a un diseño conceptual basado en las etapas de la investigación. Cada paso está organizado secuencialmente, reflejando el desarrollo del trabajo experimental.

Figura 4. Diagrama metodológico del proceso



Nota: Diagrama elaborado por el autor.

3.1 Materiales, reactivos y sustratos

En este estudio se han utilizado soluciones de Dimetilfosfatidilcolina (DPPC), colesterol (CHOL), y glicosfingolípidos (GSLs), específicamente GSL1 (C₄₈H₉₃NO₈) y GSL3 (C₄₈H₉₂N₄O₇), para la fabricación de modelos de membranas celulares. La concentración de las soluciones preparadas fue de 10⁻⁴ M, elección basada en el estudio realizado por el grupo Platón (Rincón et al., 2017) quienes demostraron que esta concentración ofrece condiciones óptimas.

Todos los reactivos empleados se encuentran en estado sólido y se mantienen refrigerados. Para preparar las soluciones, es necesario atemperarlos para evitar que el cambio de temperatura altere el peso y provoque un cambio en la concentración.

Se pesó la cantidad adecuada de cada reactivo en una balanza para preparar 50 ml de soluciones de DPPC y CHOL (ver propiedades físicas y químicas en la **Tabla 1**), y 25 ml de soluciones de GSL1 y GSL3, todas a una concentración de 10⁻⁴ M.

Tabla 1. *Propiedades físicas y químicas de los compuestos DPPC y CHOL.*

PROPIEDAD	DPPC	COLESTEROL
Fórmula molecular	C ₄₀ H ₈₀ NO ₈ P	C ₂₇ H ₄₆ O
Masa molecular (g/mol)	734,0	386,7
Aspecto	Sólido blanco	Cristales nacarados blancos
Log Poctanol/agua	13,5	8,7
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
Olor	Sin olor	Sin olor
Solubilidad	Poca solubilidad en agua. Soluble en solventes orgánicos.	Poca solubilidad en agua. Soluble en aceites, grasas y soluciones acuosas de sales biliares. Moderadamente soluble en alcohol caliente.
Estructura	Lípido. Fosfatidilcolina 32:0, 1-acil-2-hexadecanoil snglicero-3- fosfocolina, 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
Donador de enlaces de H	8	1

Enlaces rotables	40	5
Carga formal	0	0
Peligro	No clasificado	No clasificado

El cloroformo se utiliza como disolvente para la preparación de estas soluciones, ya que es un compuesto orgánico que no se mezcla con agua y se evapora rápidamente debido a su alta volatilidad.

Las transferencias se realizan en una cuba, la cual se limpia previamente con acetona (C_3H_6O) y cloroformo ($CHCl_3$). Como subfase en la cuba, para todos los experimentos, se utiliza agua ultrapura *Millipore* Milli-Q proveniente del destilador del edificio I+D+I del campus Río Ebro, con una resistividad de $18,2 M \Omega \cdot cm$. El platón de la cuba se limpia únicamente con cloroformo, mientras las barreras de la cuba se limpian con acetona y agua.

La relación molar de la mezcla del fosfolípido DPPC y CHOL fue de 1:1 para la fabricación de las membranas celulares. Este parámetro se seleccionó con base en el estudio sobre el modelo de Young y el área de exceso en función de la presión superficial y las fracciones molares (Chiodini et al., 2020).

El DPPC es un fosfolípido clave en la estructura de las membranas celulares, siendo el principal componente de los surfactantes pulmonares. En este trabajo, se ha seleccionado el DPPC debido a su relevancia como fosfolípido predominante en la fabricación de modelos de membranas celulares, gracias a su naturaleza inerte y su carga neutra (Toimil et al., 2010). Por otro lado, el colesterol también desempeña un papel fundamental en la membrana celular, regulando tanto la fluidez como el orden de esta. Específicamente, el colesterol influye en la organización lateral de los lípidos en la membrana, contribuyendo a la estabilidad y funcionalidad de la bicapa lipídica (Krause et al., 2014).

Como sustrato se emplearon láminas de mica (ver figura 5) de la marca *MUSCOVITE MICA*, calidad V5, con un espesor de entre 0,26 y 0,31 mm, para la deposición de las membranas celulares. En esta investigación, las láminas de mica tuvieron un tamaño de 1 cm x por 1 cm, dimensiones adecuadas para la caracterización en el AFM y para la aplicación de un campo magnético.

Previo a su uso, las micas fueron limpiadas mediante exfoliación con cinta adhesiva y lavadas con etanol.

Figura 5. *Sustrato de mica.*



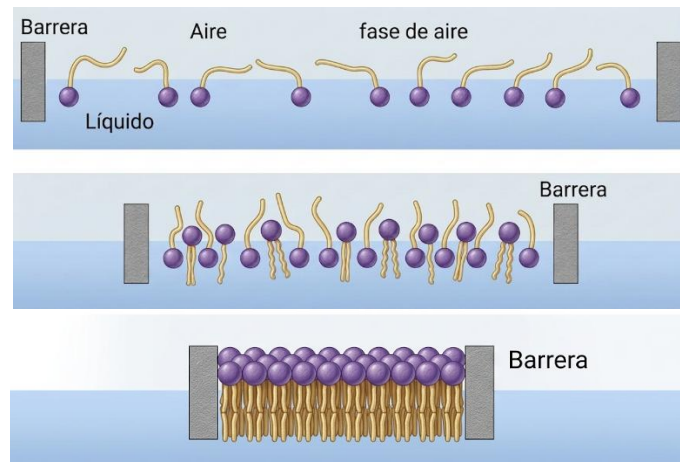
3.2 Técnicas y equipos

3.2.1 Películas Langmuir-Blodgett (LB)

Estas películas se fabrican usando la técnica de *Langmuir-Blodgett*, método utilizado para la fabricación de monocapas organizadas de membranas simuladas a partir de fosfolípidos. Esta permite depositar monocapas de material sobre una superficie sólida de manera controlada, lo que es crucial para la creación de películas muy finas y homogéneas (Petty., 2019).

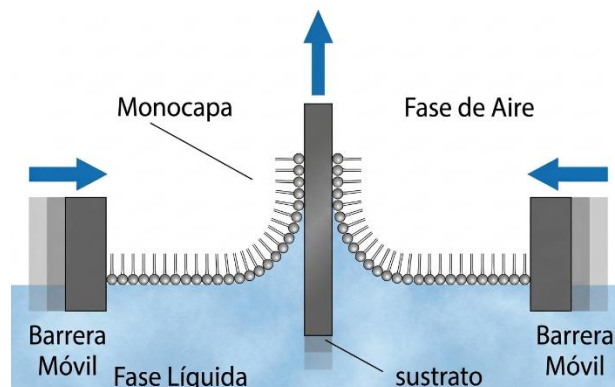
En esta investigación, la técnica *LB* se implementó para la creación de una monocapa en la interfase aire-agua, donde las moléculas anfifílicas (con una parte hidrofílica y otra hidrofóbica) se disuelven en un solvente volátil (cloroformo) y se dispersan sobre la superficie del agua con ayuda de una jeringa.

Al evaporarse el solvente, las moléculas anfifílicas se orientan con sus cabezas hidrofílicas hacia el agua y las colas hidrofóbicas hacia el aire, formando una monocapa (ver figura 6), conocida también como película de *Langmuir* (Langmuir et al., 1938).

Figura 6. *Película de Langmuir.*

Nota: Tomada de Langmuir & Langmuir Blodgett | Measurements (biolinscientific.com).

Para la fabricación de estas películas, primero fue necesario ensamblar una monocapa formada por los fosfolípidos que constituyen la membrana, en este caso DPPC y CHOL, sobre una superficie acuosa o una subfase, (ver figura 6). En este trabajo de investigación, la disolución que forma la monocapa de DPPC:CHOL se dispersó sobre la subfase (agua Milli-Q) y se transfirió sobre un sustrato de mica a una presión de $35 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$, mediante la técnica *de Langmuir-Blodgett* (ver figura 7), utilizando una velocidad de compresión de barreras de $6 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$. Las muestras obtenidas se dejaron secar durante 24 h y posteriormente fueron almacenadas en viales para su caracterización mediante AFM.

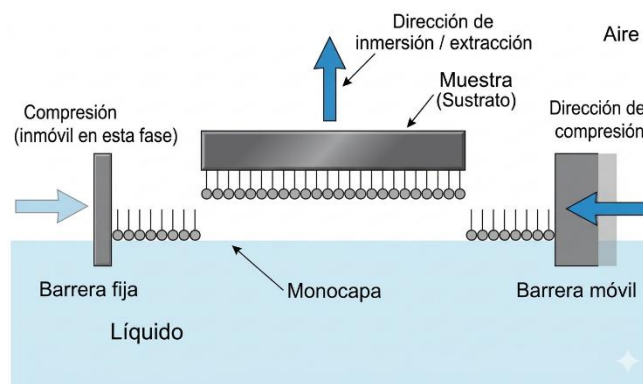
Figura 7. *Transferencia Langmuir-Blodgett.*

3.2.2 Películas de Langmuir-Schaefer (LS)

La técnica de transferencia *Langmuir-Schaefer* (LS) es un método utilizado para la preparación de monocapas y bicapas de materiales anfifílicos como fosfolípidos y otras moléculas de interés biológico. Esta técnica posibilita la transferencia controlada de monocapas autoensambladas desde una interfase aire-agua hacia un sustrato sólido, permitiendo la formación de películas delgadas con una organización molecular precisa.

A diferencia de la técnica *Langmuir-Blodgett* (LB), en la que la monocapa se transfiere mediante inmersión vertical del sustrato, en la técnica LS el sustrato se aproxima de manera paralela a la superficie de la monocapa (ver figura 8), permitiendo una transferencia más controlada y menos invasiva. Esta metodología es particularmente útil cuando es esencial preservar la estructura de la monocapa en su estado natural, como ocurre en estudios sobre membranas biológicas simuladas y materiales moleculares (Choucair & Eisenberg, 2003; Watanabe et al., 2004).

Figura 8. *Transferencia Langmuir-Schaefer (LS).*



La técnica LS se utilizó para transferir glicosfingolípidos (GSL1 y GSL3) sobre una de las caras de los sustratos de mica, que previamente contenían una monocapa de DPPC:CHOL depositada mediante la técnica LB. La transferencia se realizó a una presión superficial de $8 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ y a una velocidad de $1 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$. Posteriormente, las muestras obtenidas se dejaron secar

a temperatura ambiente durante 24 horas y fueron almacenadas en viales para su posterior caracterización mediante microscopía de fuerza atómica (AFM).

3.2.3 Deposición de nanopartículas magnéticas (MNPs).

En las películas de *Langmuir-Blodgett* (LB), se busca lograr una deposición controlada de nanopartículas magnéticas (MNPs) compuestas por magnetita (Fe_3O_4) y maghemita (Fe_2O_3), con un tamaño promedio de 12 nm y propiedades hidrofílicas. Estas nanopartículas son diseñadas y funcionalizadas tanto con grupos alquinos (*PMAO@PEG@DBCO*) como sin ellos (*PMAO@PEG*), con el objetivo de facilitar una reacción química "click" biortogonal entre los alquinos y azidas presentes en la membrana celular simulada, confirmando así la especificidad de dicha interacción.

Para la incorporación de las nanopartículas magnéticas sin el grupo alquino en los sustratos de membrana, se partió de una concentración de 4,7 mg Fe/ml y se preparó una solución con estas MNPs de una concentración de 0,01 mg Fe/ml en 14 ml de agua milli-Q, la incorporación de las nanopartículas magnéticas con el grupo alquino en los sustratos de membrana, se partió de una concentración de 2,4 mg Fe/ml y se preparó una solución con estas MNPs de una concentración de 0,01 mg Fe/ml en 5 ml de agua milli-Q.

Ambas soluciones con las concentraciones finales se prepararon en un recipiente al que se le ha hecho una limpieza previa con etanol, agua Milli-Q y secado con nitrógeno.

Las soluciones con MNPs de concentración de 0.01 mg de Fe/mL se almacenan en refrigeración, por lo que es imprescindible permitir que alcancen la temperatura ambiente antes de proceder con su incubación. Es fundamental asegurarse de que toda la superficie de la mica quede completamente cubierta al sumergirla en la solución que contiene las MNPs. Para la incubación de las MNPs, la mica se manipula con una pinza y se introduce en la solución durante 30 segundos.

Una vez finalizado el tiempo de incubación, el sustrato se enjuaga con 100 mL de agua Milli-Q y se deja secar a temperatura ambiente. Para garantizar la incorporación de las nanopartículas en las membranas, se usa la caracterización AFM.

3.2.4 Caracterización mediante microscopía de fuerza atómica

Las monocapas de DPPC:CHOL transferidas a $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, la transferencia de los glicoesfingolípidos sobre las membranas simuladas y las nanopartículas depositadas sobre estos sustratos se caracterizaron mediante la técnica de microscopía de fuerza atómica (AFM).

El equipo usado para la caracterización de los diferentes sustratos ha sido el *multimode 8 Veeco-Bruker* equipado con una unidad de control *Nanoscope V* ubicado en el laboratorio de la Universidad de Zaragoza (INMA).

Mediante la microscopía de fuerza atómica se obtienen imágenes nanométricas a una alta definición mediante una sonda de barrido, la posición tridimensional de la sonda con respecto a la muestra que se desea caracterizar se controla a través de un sistema de piezoeléctricos (Voigtländer, 2015).

Para el caso de microscopio de fuerza atómica (AFM), la punta de pocas micras de longitud y un diámetro inferior a 100 \AA , se monta sobre un cantiléver de entre 100 y 200 micras de largo, fabricada por la empresa *Bruker* (ver figura 9). Dependiendo de la interacción entre la punta y la superficie de la muestra, el cantiléver puede doblarse o flexionarse (Jalili, 2004). Sobre la punta se dirige un rayo láser, cuya luz se refleja hacia un fotodetector sensible a la posición. Este fotodetector genera una señal de retroalimentación que se envía a los escáneres piezoeléctricos, los cuales mantienen la punta a una altura o fuerza constante, permitiendo así obtener un mapa topográfico de la superficie (Marrese et al., 2017). La interacción entre la punta y la muestra se basa en la medición de varias fuerzas que inducen la deflexión del cantiléver.

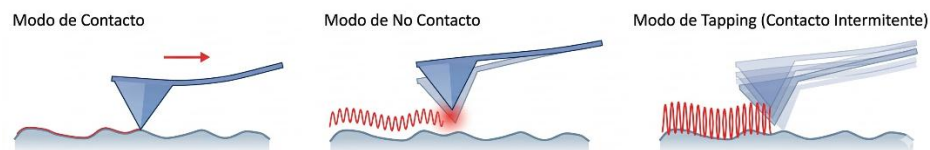
Figura 9. Microscopio de fuerza atómica y cantiléver.



Nota. Se muestra en la imagen izquierda el equipo AFM usado para la caracterización de los sustratos de mica, la imagen de la derecha es el cantiléver en donde se inserta la punta.

Para este trabajo de investigación se usó una punta ScanAsyst-Air-HR de nitruro de silicio y recubrimiento de aluminio de rango de 130-160 kHz, $0,4-0,6 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$, radio de 2 nm. Este equipo tiene tres modos de trabajo, el modo contacto o estático, el modo de no contacto o dinámico y el modo de contacto intermitente o tapping, mostrados en la figura 10.

Figura 10. Modo de trabajo del AFM.



Nota. Imagen tomada de la tesis doctoral Modelos de membranas celulares y su interacción con nanopartículas magnéticas.

El modo contacto se mide principalmente la fuerza de repulsión Van der Waals, la punta del AFM está en contacto directo con la superficie de la muestra mientras que la imagen se va generando, la punta mientras interacciona con la muestra sufre una deflexión del cantiléver, lo que hace que la imagen generada sea tridimensional. Sobre la muestra se ejerce una fuerza aproximada

entre 10^{-7} N y 10^{-6} N (Voigtländer, 2015), en este modo se pueden realizar medidas en muestras que tengan la característica de ser pegajosas o elásticas y muestras duras.

En el modo no contacto la punta no toca directamente muestra, como se muestra en la figura 10, se mantiene una distancia muy pequeña entre la muestra y la punta manteniendo un intermitente contacto con la superficie de la muestra a la vez que la escanea

El modo de contacto intermitente o tapping, es una combinación entre los dos modos anteriores en donde la punta oscila y golpea la superficie de la muestra de manera periódica tocándola en cada ciclo, este modo es apropiado en superficies blandas.

3.2.5 Aplicación de campo magnético

La aplicación de un campo magnético alterno (451,65 kHz, $20,1 \text{ kA} \cdot \text{m}^{-1}$, 90 min) a las membranas de DPPC:COL que incorporan MNPs permite inducir fenómenos de hipertermia magnética y efectos magneto-mecánicos que repercuten directamente en la organización lipídica. Las pérdidas magnéticas asociadas a los mecanismos de relajación Néel y Brownian generan calor localizado alrededor de las nanopartículas, favoreciendo transiciones de fase en la bicapa y modificando su fluidez y permeabilidad (Liu et al 2020).

De manera complementaria, las oscilaciones que se ejercen a las membranas, con las MNPs incubadas y luego de la aplicación del campo magnético, bajo AMF producen tensiones mecánicas sobre la membrana, incluso sin aumento significativo de temperatura, lo que contribuye a la formación de defectos locales y facilita la reorganización de dominios (Golovin et al 2015). Diversos estudios han reportado que estos efectos combinados potencian la liberación controlada de moléculas y la penetración de agentes activos en sistemas modelo y liposomas (Shivanna et al 2022).

En el presente trabajo, las condiciones aplicadas cumplen con valores reportados en la literatura para producir un acoplamiento eficiente de las MNPs, sin sobrepasar límites de seguridad descritos en estudios de hipertermia clínica (Hergt et al 2007). Esto refuerza la relevancia de las observaciones obtenidas por AFM y la aplicabilidad de la metodología en el desarrollo de estrategias de liberación dirigida mediante estimulación magnética.

4. Resultados y discusión

Las isothermas de presión superficial-área obtenidas (Figura 11) muestran el comportamiento característico de sistemas lipídicos organizados en monocapas de Langmuir. La isoterma presentada se construyó a partir de mediciones realizadas en distintos intervalos de presión superficial (25, 30, 35 y 40 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$), correspondientes a diferentes secciones del sustrato, lo que permitió reconstruir el comportamiento global del sistema durante el proceso de compresión.

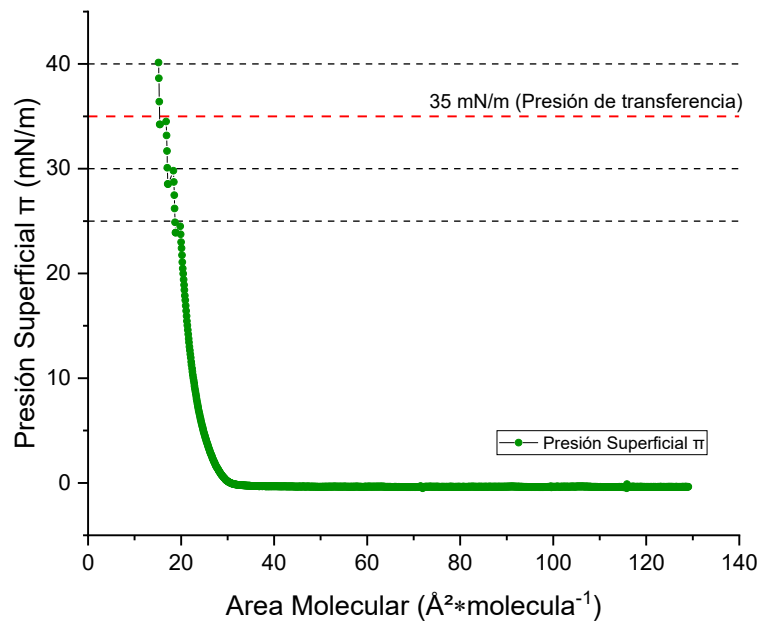
En la región inicial de la curva se observa una presión superficial cercana a cero, lo cual indica que las moléculas lipídicas se encuentran en un estado altamente expandido, con interacciones intermoleculares débiles y una elevada área disponible por molécula.

A medida que se reduce el área molecular mediante la compresión de la monocapa, la presión superficial aumenta progresivamente, lo que refleja un incremento en el grado de empaquetamiento de las moléculas lipídicas en la interfase. Este comportamiento es consistente con la transición desde una fase líquido-expandida hacia una fase más ordenada o líquido-condensada, fenómeno ampliamente descrito en monocapas lipídicas.

En la región de mayor compresión se observa un incremento más pronunciado de la pendiente de la isoterma, lo cual indica que las moléculas se encuentran altamente empaquetadas y que pequeñas reducciones adicionales del área generan aumentos significativos en la presión superficial. Este comportamiento sugiere la formación de una monocapa relativamente rígida y estructuralmente organizada, condición necesaria para realizar la transferencia de la película mediante la técnica de Langmuir-Blodgett.

Con base en estos resultados, se seleccionaron 25, 35 y 40 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ como presiones de trabajo para la transferencia de las películas sobre sustratos de mica mediante la técnica de Langmuir-Blodgett (LB). En particular, la presión de **35 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$** (indicada en la Figura 11) se ubica dentro de la región de alto empaquetamiento molecular, previa al colapso del sistema, lo que favorece la obtención de monocapas estables y homogéneas.

Este valor es particularmente relevante porque se aproxima a la presión lateral presente en bicapas lipídicas de membranas celulares, permitiendo reproducir condiciones biomiméticas durante la formación de las películas transferidas (Chapman, 1988; Grage et al., 2022). Asimismo, estudios previos realizados por el grupo de investigación Platón (Ruiz-Rincón, 2021) han demostrado que trabajar en este rango de presión superficial favorece la obtención de monocapas estables y homogéneas, adecuadas para su posterior caracterización estructural mediante microscopía de fuerza atómica (AFM).

Figura 11. *Isoterma de presión superficial-área π -A de la monocapa DPPC:CHOL (1:1).*

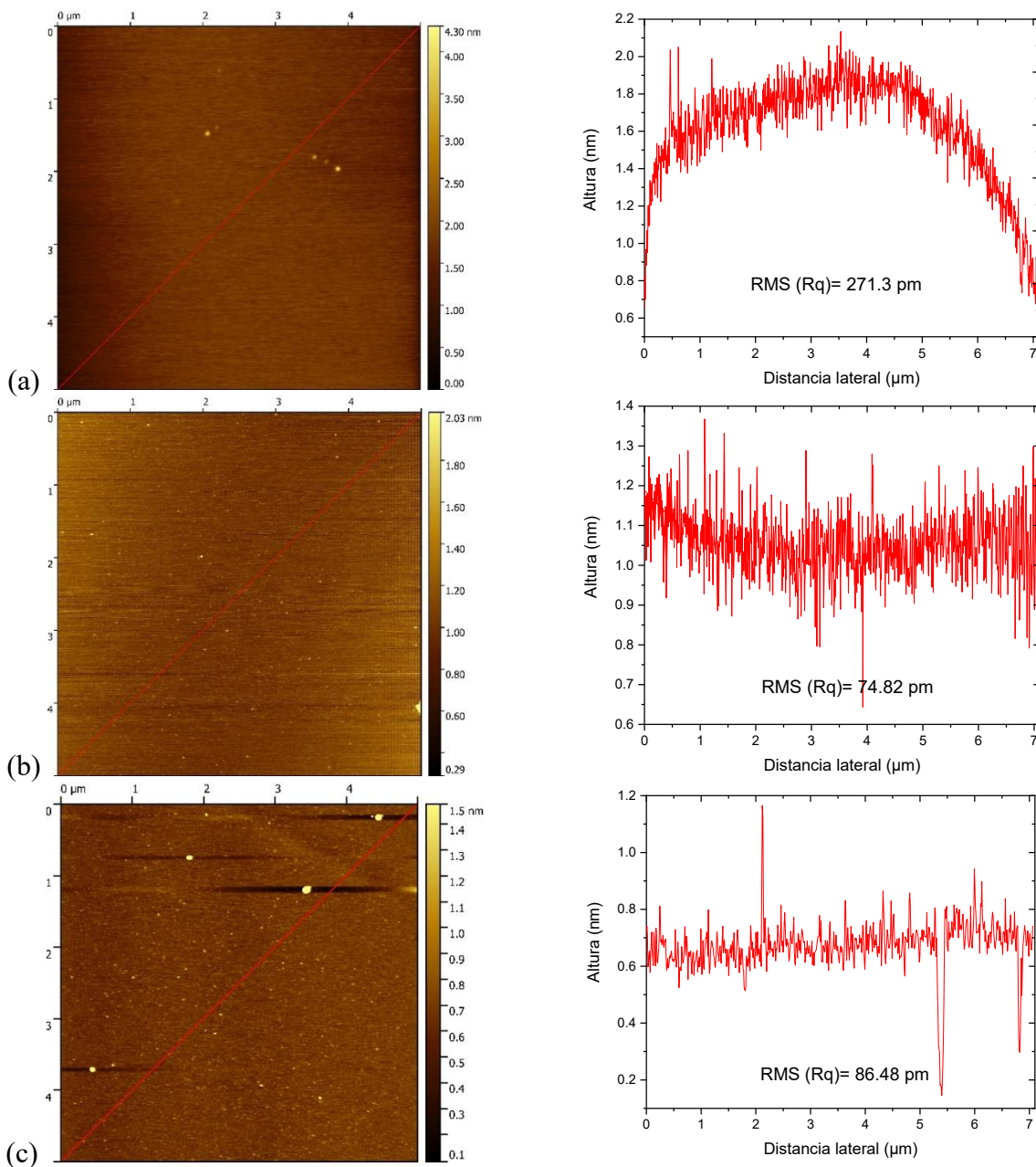
Una vez transferida la monocapa de DPPC:CHOL (1:1) sobre el sustrato de mica a una presión de $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, se procedió a su caracterización mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) en modo tapping. En la Figura 12(a) se presenta la imagen topográfica correspondiente a la transferencia realizada a esta presión, junto con el perfil de altura de una sección transversal (línea roja) y el valor de la rugosidad cuadrática media (R_q , *Root Mean Square*).

El análisis de la topografía evidenció la formación de una película homogénea, con un valor de R_q de $271,3 \text{ pm}$, lo que indica una superficie altamente plana. Con el fin de evaluar la influencia de la presión de transferencia en la organización de la monocapa, se realizaron mediciones adicionales a 25 y $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. A $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ se obtuvo un valor de R_q de $86,48 \text{ pm}$, mientras que a $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ el valor fue de $74,82 \text{ pm}$.

El incremento observado en la rugosidad a $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ sugiere la ocurrencia de procesos de reorganización molecular inducidos por la compresión de la monocapa, asociados con la transición hacia una fase más compacta.

Estos resultados son consistentes con el comportamiento observado en las isoterma π -A, donde a mayores presiones superficiales se favorece un mayor grado de empaquetamiento molecular, confirmando que $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ constituye una condición adecuada para la transferencia de monocapas estables y estructuralmente organizadas.

Figura 12 Imágenes AFM y perfiles de altura de la monocapa DPPC:CHOL (1:1) transferida a distintas presiones superficiales: (a) $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, (b) $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ y (c) $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$.



En este trabajo se emplearon glicosfingolípidos funcionalizados con el propósito de simular componentes de membrana celular y evaluar la viabilidad de reacciones de química clic en un entorno biomimético. Para ello, se contó con el apoyo del grupo de investigación liderado por el Prof. Daniel B. Werz (Technische Universität Braunschweig, Alemania), quienes proporcionaron una colección de glicosfingolípidos funcionales (GSL1 y GSL3).

Como se muestra en la Figura 12, los glicosfingolípidos utilizados presentan una estructura anfífilica compuesta por un monosacárido unido a dos cadenas hidrocarbonadas, característica que favorece su incorporación en monocapas lipídicas.

El monosacárido corresponde a una β -D-glucosa, la cual presenta modificaciones específicas en el carbono C-6 del anillo glucosídico. En el caso de GSL1 (Figura 12a), esta posición está ocupada por un grupo hidroxilo ($-\text{OH}$), mientras que en GSL3 (Figura 12b) se introduce un grupo azida ($-\text{N}_3$).

Esta modificación estructural es particularmente relevante, ya que el grupo azida constituye un grupo funcional altamente reactivo en reacciones de química clic bioortogonal, permitiendo la conjugación selectiva de moléculas sin interferir significativamente con otros componentes del sistema lipídico.

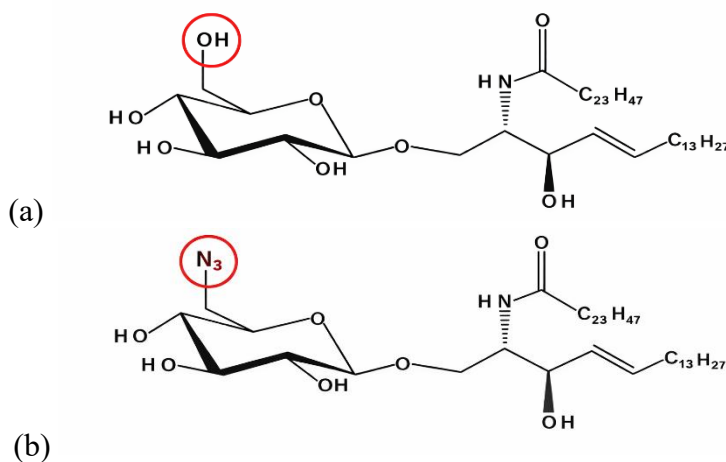
Desde el punto de vista estructural, la similitud dimensional de estos glicosfingolípidos con fosfolípidos comunes de membrana, como la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), facilita su incorporación en mezclas lipídicas junto con colesterol durante la formación de monocapas. Esta compatibilidad estructural permite introducir grupos funcionales reactivos en la superficie de la monocapa sin generar perturbaciones significativas en el empaquetamiento lipídico.

La presencia del grupo azida en GSL3 puede además influir en las interacciones intermoleculares en la región polar de la monocapa, modificando la orientación de las cabezas

glucosídicas y contribuyendo a cambios en la organización lateral del sistema lipídico. En sistemas mixtos de fosfolípidos y glicolípidos, estas variaciones estructurales pueden favorecer la formación de dominios lipídicos con diferentes grados de ordenamiento, los cuales pueden observarse posteriormente mediante AFM como regiones con diferente topografía o contraste de fase.

De esta manera, la combinación de monocapas de Langmuir, transferencia Langmuir-Blodgett y caracterización mediante AFM constituye una estrategia experimental robusta para investigar cómo modificaciones químicas específicas en glicoesfingolípidos influyen en la organización estructural de membranas modelo, así como en su potencial aplicación en estrategias de funcionalización superficial y liberación dirigida de compuestos bioactivos.

Figura 13 Estructura de los glicoesfingolípidos



Nota. El GSL1 (a) tiene un grupo OH en el carbohidrato C-6, y el GSL3 (b) tiene un grupo azida N_3 .

Una vez obtenida y caracterizada la película base de DPPC:CHOL (1:1) transferida a $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, se procedió a su modificación mediante la incorporación de glicoesfingolípidos. Estos compuestos fueron transferidos por la técnica de Langmuir-Schaefer (LS). La caracterización posterior por AFM permitió identificar nuevas estructuras con morfología y altura diferenciadas

respecto a la capa original, indicando una cobertura parcial de la película base. Estas diferencias topográficas sirvieron para el análisis de porcentaje de cobertura, permitiendo estimar la proporción de superficie ocupada por el glicosfingolípido en comparación con las regiones expuestas de DPPC:CHOL.

Al analizar la topografía de la transferencia del glicosfingolípido GSL1 sobre la monocapa, como se observa en la Figura 14, Se puede distinguir una tonalidad más oscura asociada a la monocapa base de DPPC:CHOL, mientras que las regiones más claras corresponden a áreas cubiertas por el GSL1, además de la presencia de agregados localizados sin interacción uniforme con la matriz lipídica. Del análisis de cobertura superficial se determinó que la película se encuentra cubierta en un 89,99% por DPPC:CHOL, mientras que un 10,01% corresponde a GSL1.

Estos valores se obtuvieron mediante el procesamiento de las imágenes AFM en escala de altura, mediante la herramienta “Grain Distribution”, tras aplicar una máscara de altura (threshold) que permitió discriminar las regiones correspondientes a la monocapa base de DPPC:CHOL y las áreas cubiertas por GSL1. El umbral de separación se estableció con base en el histograma de alturas de la imagen AFM, de modo que las zonas de mayor elevación fueron atribuidas al GSL1. A partir de esta segmentación, el programa calculó de forma automática los valores relativos de área proyectada, obteniéndose una cobertura del 89,99 % para DPPC:CHOL y del 10,01 % para GSL1 sobre el área total analizada.

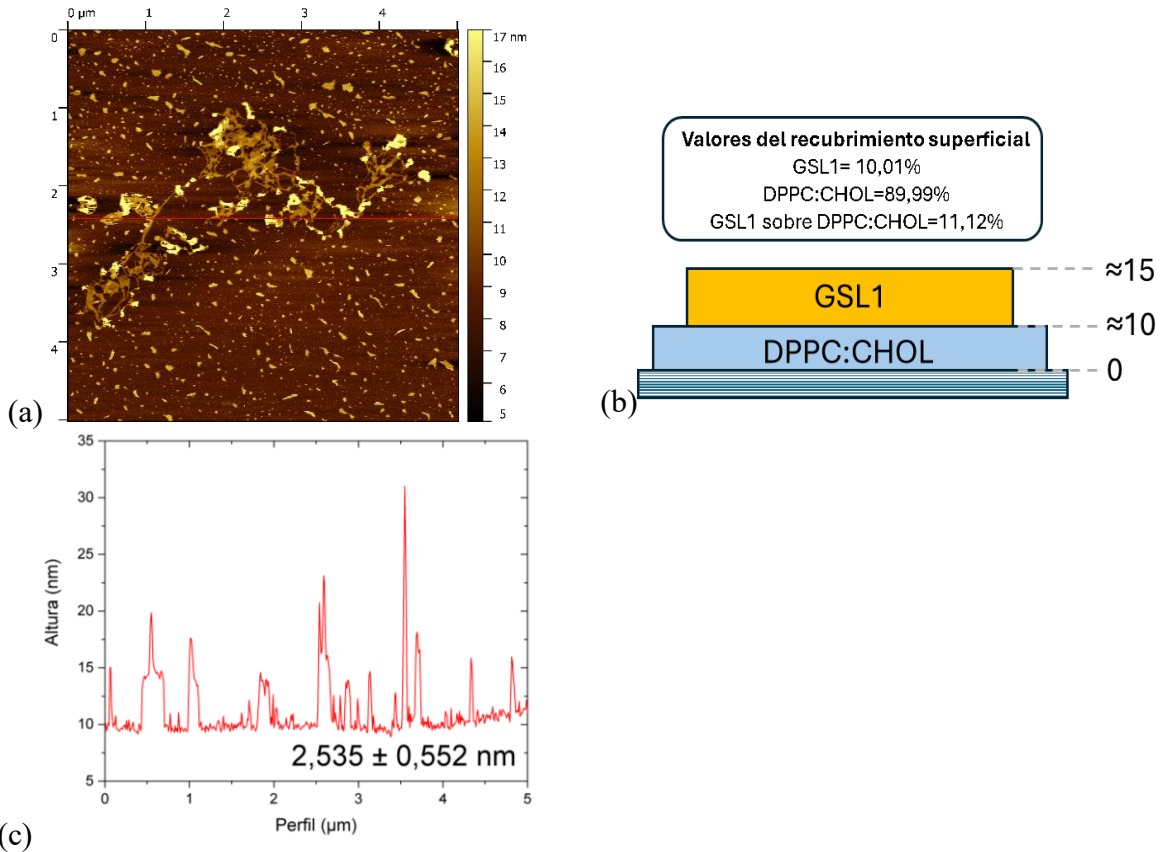
Posteriormente, se calculó la relación GSL1/DPPC:CHOL para comparar la proporción de recubrimiento entre ambas fases, aplicando la expresión:

$$\frac{A_{GSL1}}{A_{DPPC:CHOL}} * 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

Considerando la relación entre ambos porcentajes, se estimó que aproximadamente un 11,12% de la superficie contiene GSL1 depositado sobre la monocapa base de DPPC:CHOL. En

la Figura 13.(c) se presenta el perfil de sección transversal, donde se observan alturas características entre 15 y 30 nm, evidenciando la formación de dominios y cúmulos asociados al GSL1 sobre la superficie lipídica.

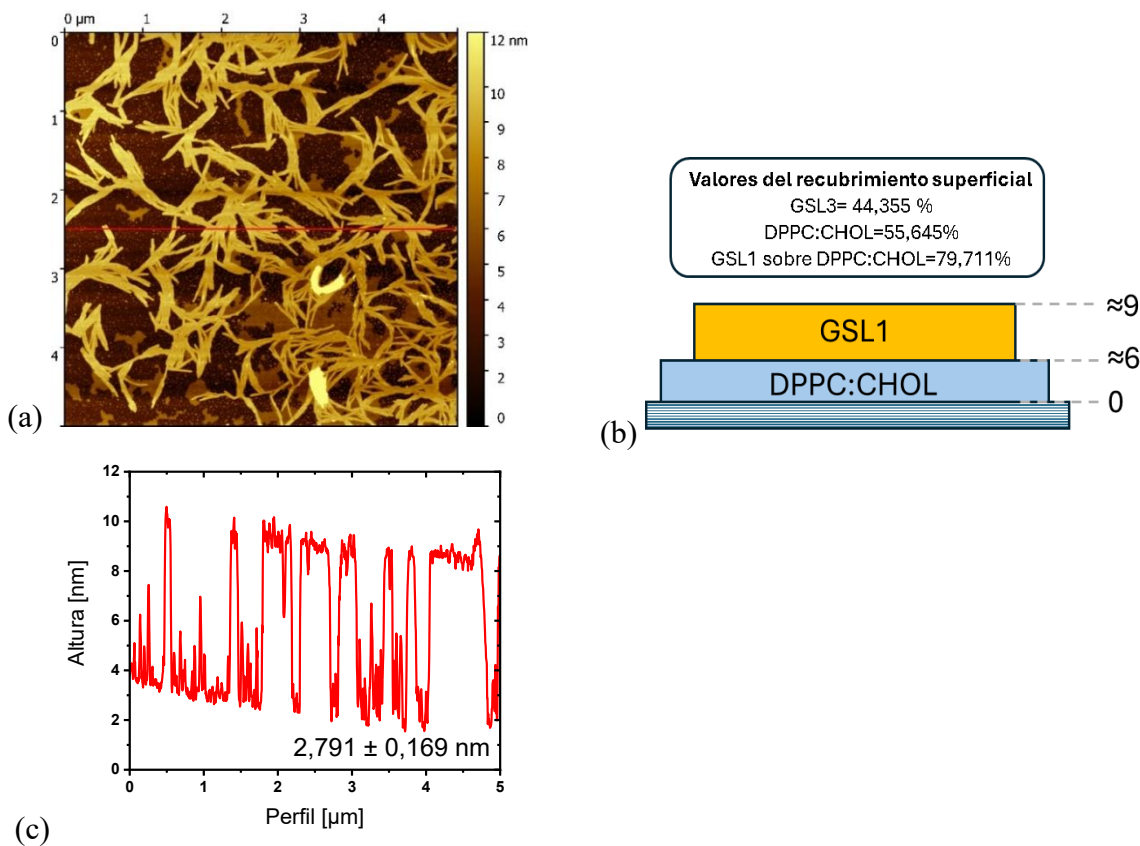
Figura 14 Caracterización AFM de la bicapa DPPC:CHOL (1:1) y GSL1: (a) imagen topográfica, (b) esquema del recubrimiento con los valores de cobertura obtenidos mediante Gwyddion, y (c) perfil de altura correspondiente a la línea roja de la imagen.



Posteriormente, se analizó la topografía de la transferencia de GSL3 sobre la monocapa, cuyos resultados se presentan en la Figura 14. Los valores del recubrimiento superficial fueron obtenidos con el mismo procedimiento realizado previamente. La imagen de AFM muestra una superficie heterogénea con dominios claros definidos que corresponden a regiones recubiertas con GSL3, mientras que las zonas más oscuras corresponden a la monocapa base de DPPC:CHOL. El análisis de recubrimiento superficial permitió determinar que un 55,65% de la superficie

corresponde a DPPC:CHOL, mientras que el 44,35% restante está ocupado por GSL3. Al considerar la relación entre ambos, se estima que cerca de un 79,71% del GSL3 se encuentra depositado directamente sobre la monocapa de DPPC:CHOL. El análisis de rugosidad superficial arrojó un valor de R_q -RMS de $2,79 \pm 0,17$ nm, de esta manera, se observa que la adición del glicosfingolipido genera un incremento significativo en la heterogeneidad de la superficie en comparación con la monocapa base.

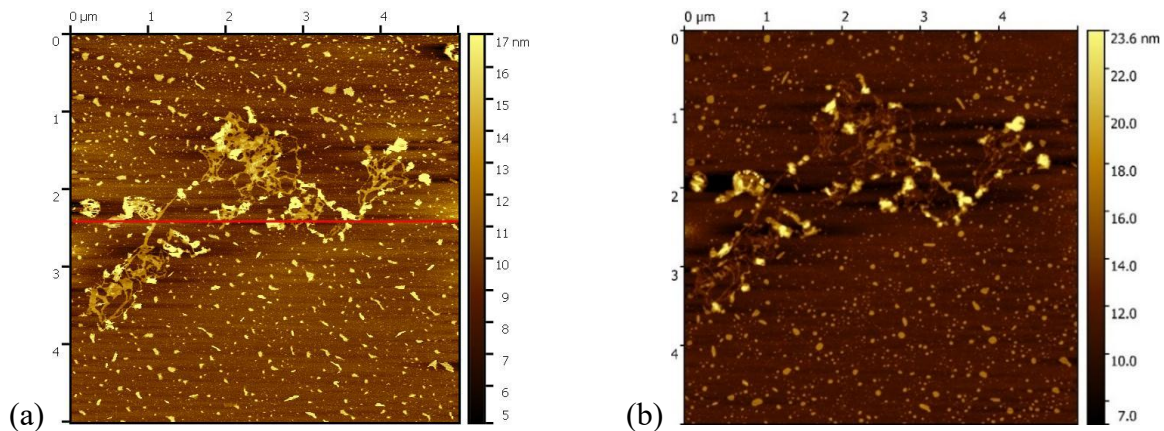
Figura 15 Caracterización AFM de la bicapa DPPC:CHOL (1:1) y GSL3: (a) imagen topográfica, (b) esquema del recubrimiento con los valores de cobertura obtenidos mediante Gwyddion, y (c) perfil de altura correspondiente a la línea roja de la imagen.



Luego de esto, se evaluó la interacción de las nanopartículas magnéticas funcionalizadas con grupo alquino (MNPs-C≡CH) con la monocapa modificada con GSL1. En este sistema no se esperaba un reconocimiento molecular específico, por lo que se planteaba que la adsorción de las

nanopartículas fuera mínima o inexistente. Las imágenes de AFM adquiridas antes y después de la incubación con MNPs muestran superficies muy similares, sin la aparición de agregados característicos ni cambios notables en la topografía. Este resultado indica que efectivamente, no se produjo una adsorción específica de las nanopartículas sobre el glicoesfingolípido.

Figura 16. Sistema caracterizado con AFM de la bicapa DPPC:CHOL (1:1) y GSL3. (a) Sistema antes de incubación de MNPs, (b) Sistema después de incubación de MNPs.

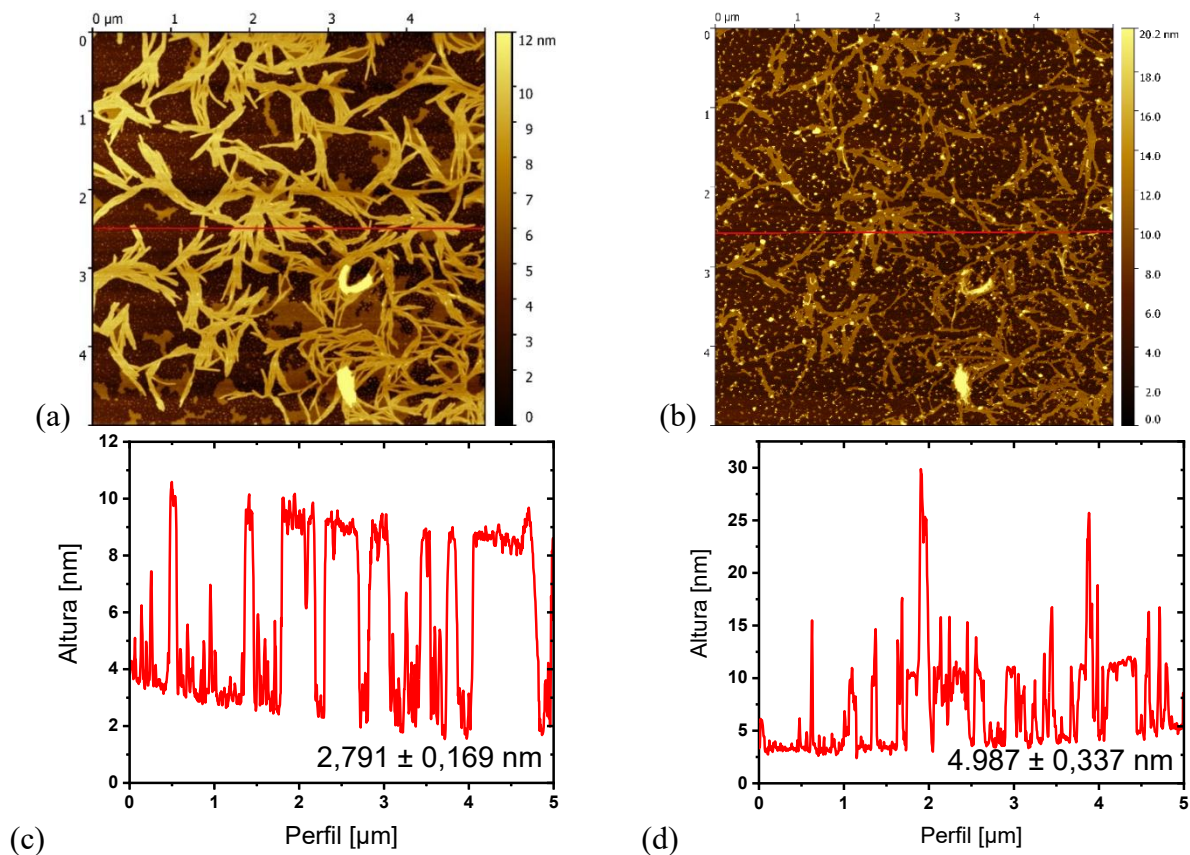


Para el sistema modificado con GSL3, se procedió igualmente a evaluar la interacción con las nanopartículas magnéticas funcionalizadas con alquino (MNPs-C≡CH). En la Figura X se presentan las imágenes de AFM antes (a) y después (b) de la incubación con MNPs. A diferencia con el caso observado para GSL1, en el sistema con GSL3 se evidenciaron cambios en la topografía. Tras la incubación con las nanopartículas, la superficie mostró la aparición de zonas brillantes y agregados puntuales, con incrementos en la altura y rugosidad en comparación con el estado inicial.

En la imagen se distinguen las ramificaciones color marrón claro, correspondientes a los dominios de GSL3, mientras que las MNPs aparecen como puntos amarillos. Se observa una mayor densidad de MNPs sobre las ramificaciones de GSL que en el resto de la superficie, donde

las partículas son más escasas y dispersas. Esto evidencia que la deposición de las MNPs no es aleatoria, sino que ocurre de manera selectiva sobre los dominios de GSL.

Figura 17. Sistema caracterizado con AFM de la bicapa DPPC:CHOL (1:1) y GSL3 con deposición de MNPs. (a) imagen topográfica antes de la deposición de MNPs, (b) imagen topográfica después de la deposición de MNPs, (c) perfil de altura correspondiente a la línea roja de la Figura 17. (a), (d) perfil de altura correspondiente a la línea roja de la Figura 17. (b).

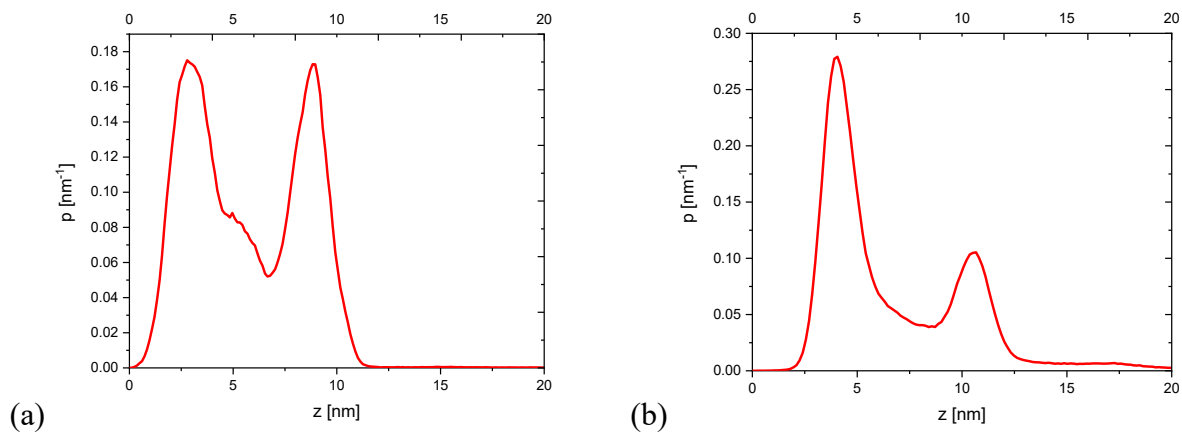


Para evaluar la deposición de nanopartículas magnéticas sobre la monocapa modificada con GSL3 se realizó un análisis comparativo de histogramas de altura obtenidos a partir de imágenes AFM, antes y después del proceso de deposición. La Figura 18 muestra el histograma de alturas obtenido a partir de imágenes AFM de la monocapa modificada con GSL3. El eje horizontal representa la altura topográfica z , expresada en nanómetros, mientras que el eje vertical corresponde a la densidad de probabilidad $\rho(z)$, con unidades de nm^{-1} . Cada valor de $\rho(z)$ indica

la fracción relativa del área superficial cuya altura se encuentra dentro de un intervalo dz alrededor de z , de modo que el área total bajo la curva es igual a la unidad.

En el histograma correspondiente a la superficie sin nanopartículas se identificaron dos picos principales: el primero, asociado a la matriz de DPPC:CHOL, y un segundo pico a mayor altura, atribuible a las ramificaciones de glicosfingolípidos. Tras el proceso de deposición de nanopartículas, el histograma presenta una modificación en su forma general (figura 19). Además de los dos picos previamente observados, que se mantienen en posiciones de altura similares, se aprecia la aparición de una contribución adicional a valores de z más elevados, alrededor de 15–20 nm, ausente en la condición inicial. La presencia de esta nueva población de alturas se asocia a la incorporación de nanopartículas sobre la superficie, mientras que las diferencias en la intensidad relativa de los picos reflejan una redistribución de la topografía superficial tras la deposición.

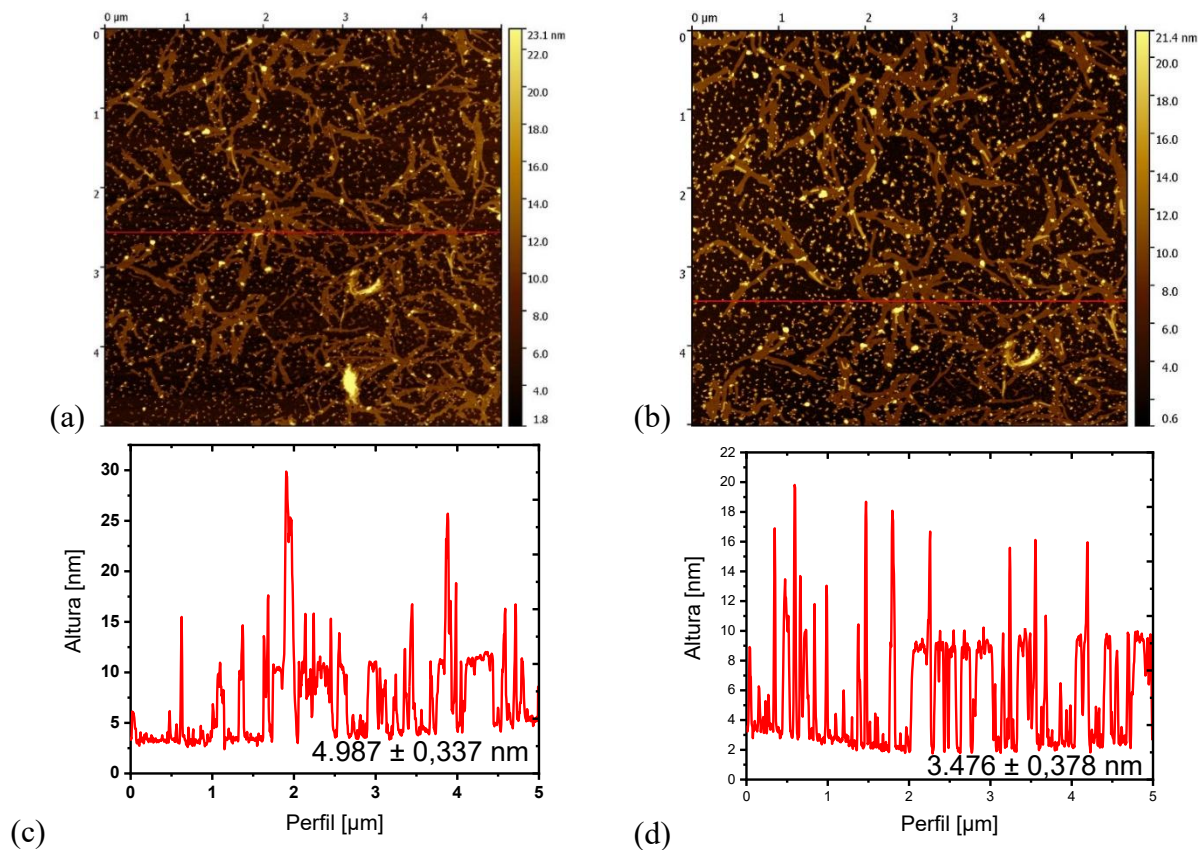
Figura 18. *Distribución de alturas de la bicapa DPPC:CHOL/GSL3 (a) Distribución antes de la adición de nanopartículas, (b) Distribución después de la adición de nanopartículas*



Posteriormente, se sometió la muestra con nanopartículas magnéticas a un tratamiento de hipertermia con el fin de evaluar posibles modificaciones en la topografía de la bicapa lipídica y en la disposición de las MNPs. A nivel visual, la comparación de las imágenes AFM antes y

después de la hipertermia no mostró cambios marcados, más allá de una ligera variación en la escala de alturas máximas (de ~ 23 nm en la muestra sin hipertermia a ~ 21 nm en la muestra tratada). Sin embargo, los perfiles de sección transversal permitieron identificar una reducción más clara en las alturas de las nanopartículas, lo que fue corroborado mediante el análisis de histogramas de altura.

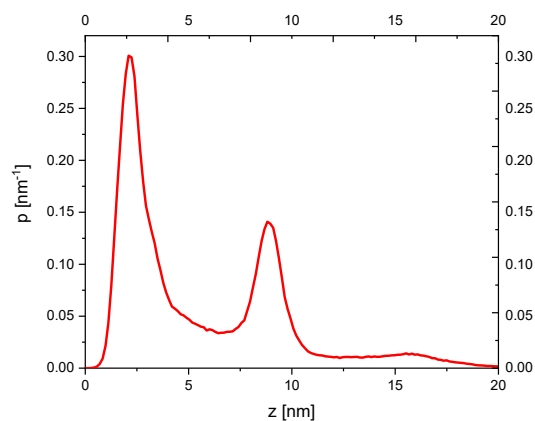
Figura 19. Sistema caracterizado con AFM de la bicapa DPPC:CHOL (1:1) y GSL3 con deposición de MNPs y aplicación de hipertermia. (a) imagen topográfica antes de la aplicación de hipertermia, (b) imagen topográfica después de la aplicación de hipertermia, (c) perfil de altura correspondiente a la línea roja de la Figura 18. (a), (d) perfil de altura correspondiente a la línea roja de la Figura 18. (b).



La comparación de las distribuciones de altura antes y después de la hipertermia, como se puede observar en la Figura 19, evidencia un desplazamiento de MNPs luego de la aplicación del campo magnético. En la figura 19. (c) se observan alturas entre 25 nm y 30 nm, mientras que en la figura 19. (d) luego de la aplicación del campo magnético se observan alturas máximo hasta 20

nm. Este comportamiento indica que el tratamiento de hipertermia magnética modificó la disposición estructural de las nanopartículas en la superficie lipídica, lo que podría asociarse con procesos de reorganización superficial, compactación o cambios en su interacción con la membrana modelo.

Figura 20. *Distribución de alturas de la película después de realizar hipertermia magnética.*



En conjunto, los análisis de imágenes, perfiles y distribuciones de alturas indican que la hipertermia magnética tuvo un efecto medible sobre las nanopartículas depositadas en la membrana, reduciendo sus alturas características respecto a la condición inicial. Los resultados sugieren una posible reorganización o aplanamiento de las nanopartículas inducido por el tratamiento.

5. Conclusiones

En este trabajo se logró la fabricación de sistemas de membranas modelo basados en la mezcla DPPC:CHOL (1:1) mediante las técnicas de Langmuir-Blodgett (LB) y Langmuir-Schaefer (LS), obteniendo películas homogéneas adecuadas para su posterior caracterización estructural.

La caracterización de la monocapa transferida mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) confirmó la formación de superficies continuas y homogéneas sobre el sustrato de mica,

especialmente a una presión superficial de $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, condición en la cual se evidenció un mayor grado de organización molecular.

La incorporación de glicosfingolípidos sobre la monocapa base permitió modificar la topografía de la superficie, observándose la formación de dominios con características diferenciadas. En particular, el sistema con GSL1 presentó una baja cobertura superficial ($\sim 10 \%$), mientras que el sistema con GSL3 alcanzó valores cercanos al 44% , evidenciando una mayor afinidad de este glicosfingolípido por la monocapa lipídica.

En cuanto a la incorporación de nanopartículas magnéticas, los resultados mostraron un comportamiento diferencial dependiendo del sistema. En el caso de GSL1, no se evidenció una adsorción significativa de nanopartículas, mientras que en el sistema con GSL3 se observó una distribución preferencial de las MNPs sobre los dominios del glicosfingolípido, lo que indica una interacción selectiva con la superficie funcionalizada.

El análisis de histogramas de altura permitió confirmar la presencia de nanopartículas sobre la superficie, evidenciada por la aparición de nuevas poblaciones de alturas en el rango de $15\text{--}20 \text{ nm}$, ausentes en las condiciones iniciales. Asimismo, la aplicación de hipertermia magnética generó cambios en la distribución de alturas, sugiriendo una reorganización estructural de las nanopartículas sobre la membrana.

6. Referencias bibliográficas

- Balleza, D., Mescola, A., & Alessandrini, A. (2020). Model lipid systems and their use to evaluate the phase state of biomembranes, their mechanical properties and the effect of nonconventional antibiotics: The case of daptomycin. *European Biophysics Journal*, 49(5), 401–408. <https://doi.org/10.1007/s00249-020-01445-w>
- Chen, C., Han, D., Cai, C., & Tang, X. (2010). An overview of liposome lyophilization and its future potential. *Journal of Controlled Release*, 142(3), 299–311. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.10.024>
- 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>
- Davis, U. (2021). Membrane phase transitions. In *Biophysics: Biology of membranes*. Physics LibreTexts.
- Dufrêne, Y. F., Boland, T., Schneider, J. W., Barger, W. R., & Lee, G. U. (1999). Characterization of the physical properties of model biomembranes at the nanometer scale with the atomic force microscope. *Faraday Discussions*, 111, 79–94.
- Garcia-Manyes, S., Oncins, G., & Sanz, F. (2005). Effect of ion-binding and chemical phospholipid structure on the nanomechanics of lipid bilayers studied by force spectroscopy. *Biophysical Journal*, 89(3), 1812–1826.
- Garcia-Manyes, S., Redondo-Morata, L., Oncins, G., & Sanz, F. (2010). Nanomechanics of lipid bilayers: Heads or tails? *Journal of the American Chemical Society*, 132(37), 12874–12886.

- Golovin, Y. I., Klyachko, N. L., & Majouga, A. G. (2015). Magneto-mechanical actuation of magnetic nanoparticles: In vivo, in vitro, and in silico perspectives. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 380, 377–384. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2014.10.110>
- Hergt, R., & Dutz, S. (2007). Magnetic particle hyperthermia—Biophysical limitations of a visionary tumour therapy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 311(1), 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2006.10.115>
- Hussain, S. A., Dey, B., Bhattacharjee, D., & Mehta, N. (2018). Unique supramolecular assembly through Langmuir–Blodgett technique. *Heliyon*, 4(12).
- Jalili, N. (2004). A review of atomic force microscopy imaging systems: Application to molecular metrology and biological sciences. *Mechatronics*, 14(8), 907–945.
- Jovanović, A. A., Balanč, B. D., Ota, A., Ahlin Grabnar, P., Djordjević, V. B., Šavikin, K. P., Bugarski, B. M., Nedović, V. A., & Poklar Ulrih, N. (2018). Comparative effects of cholesterol and β -sitosterol on the liposome membrane characteristics. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120(9), 1800039. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800039>
- Jurak, M. (2013). Thermodynamic aspects of cholesterol effect on properties of phospholipid monolayers: Langmuir and Langmuir–Blodgett monolayer study. *Journal of Physical Chemistry B*, 117(13), 3496–3502. <https://doi.org/10.1021/jp401182c>
- Krause, M. R., & Regen, S. L. (2014). The structural role of cholesterol in cell membranes: From condensed bilayers to lipid rafts. *Accounts of Chemical Research*, 47(12), 3512–3521. <https://doi.org/10.1021/ar500260t>
- Liu, X., Zhang, Y., Wang, Y., Zhu, W., & Li, G. (2020). Comprehensive understanding of magnetic hyperthermia: Experiments, theory and applications. *Materials Today*, 33, 163–177. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2019.10.006>

- 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). <https://doi.org/10.3390/jfb8010007>
- Navarro Tovar, G., Maldonado, L. A., & González Castillo, M. del C. (2018). Liposomas: Nanoburbujas de lípidos con aplicaciones en biomedicina. *Universitarios Potosinos*, 229(1), 4–10.
- Redondo-Morata, L., Oncins, G., & Sanz, F. (2012). Force spectroscopy reveals the effect of different ions in the nanomechanical behavior of phospholipid model membranes: The case of potassium cation. *Biophysical Journal*, 102(1), 66–74.
- Ruiz-Rincón, S. (2015). *Formation and characterization of model cell membranes and their interaction with magnetic nanoparticles* (Master's thesis). Universidad de Zaragoza.
- Ruiz-Rincón, S. (2021). *Modelos de membranas celulares y su interacción con nanopartículas magnéticas* (Doctoral dissertation). Universidad de Zaragoza.
- 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., De La Fuente, J. M., & Cea, P. (2020). Altering model cell membranes by means of localized magnetic heating. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 196, 111315. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111315>

- Shivanna, A. T., Behera, S. K., & Yoon, H. (2022). Functionalized magnetic nanoparticles for alternating magnetic field applications: A review. *Journal of Controlled Release*, 349, 911–930. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.07.019>
- Toimil, P., Prieto, G., Miñones, J., & Sarmiento, F. (2010). A comparative study of F-DPPC/DPPC mixed monolayers: Influence of subphase temperature on F-DPPC and DPPC monolayers. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12(40), 13323–13332. <https://doi.org/10.1039/c0cp00506a>
- Uria Canseco, E., & Perez Casas, S. (2019). Spherical and tubular dimyristoylphosphatidylcholine liposomes. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 139(1), 399–409. <https://doi.org/10.1007/s10973-019-08416-0>
- Voigtländer, B. (2015). *Scanning probe microscopy: Atomic force microscopy and scanning tunneling microscopy*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-45240-0>
- Watanabe, H., Kashiwagi, M., Nakazato, K., & Itoh, H. (2004). Langmuir–Schaefer and Langmuir–Blodgett techniques for the preparation of organic thin films. *Journal of Applied Physics*, 95(4), 1546–1550. <https://doi.org/10.1063/1.1644632>