

Morfología y propiedades estructurales de monocapas con aplicaciones biotecnológicas



Yan Yang

Grupo de Física de Fluidos y Biocoloides

Departamento de Física Aplicada

Programa de Doctorado de Física y Ciencias del
Espacio

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autor: Yan Yang

ISBN: 978-84-1306-831-2

URI: <http://hdl.handle.net/10481/68023>

**Tesis doctoral en el Programa de Doctorado de Física y Ciencias del Espacio
supervisada por:**

Alberto Martín Molina

Prof. titular de Física Aplicada

Julia Maldonado Valderrama

Prof. Titular de Física Aplicada

AGRADECIMIENTOS

En estos tres años que he realizado la Tesis Doctoral puedo recordar todo tipo de sentimientos y emociones, desde los momentos más felices y satisfactorios, hasta los momentos más duros y difíciles de mi vida. Pero para mí, este contraste es lo que define una vida plena y sin lugar a duda recordaré esta etapa con especial cariño, no solo por los resultados mostrados aquí, sino también por todas las experiencias inolvidables que he tenido la fortuna de vivir y compartir con mis compañeros y amigos. Quienes no solo me han ayudado en la parte profesional, sino también me han ayudado a crecer y madurar como persona. Sin su apoyo y compañía no habría sido posible este trabajo y quiero agradecerles profundamente por haberme acompañado durante esta bonita etapa.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis Alberto y Julia, por todo el trabajo, el tiempo, y sobre todo, el cariño que me han dado. En todos estos años, no solo me han tratado como su alumno, sino también como si fuera su hijo. Por supuesto ha habido momentos de discusión y momentos difíciles, pero siempre hemos podido avanzar y seguir adelante con esfuerzo y dedicación. No solo me han enseñado Física, también me han dado consejos y conocimientos que tienen un valor incalculable para mí, y no tengo palabras suficientes para mostrar todo el aprecio y agradecimiento que siento por ellos. Gracias por enseñarme, por aguantar a un cabezón como yo, y gracias por todo el cariño y amor que me habéis dado. Es mi orgullo y suerte poder tenerlos como mis directores de tesis.

Agradecer también a todo el grupo de Física de Fluidos y Biocoloides, por acogerme como miembro de la familia, por estar ahí siempre que lo he necesitado, y por compartir experiencias y conocimientos de forma incondicional. Agradecer en especial a mis amigos y compañeros de la sala Luis, Aixa, pablo, Irene, José Rafael, Teresa, Guillermo, Alicia, Oscar, tamara, Mathieu, Keshwad, Leonor y Nico, por todos los congresos y viajes que hemos realizado, por esas cenas y quedadas en grupo tan divertidas, y por el aprecio y el tiempo que hemos vivido juntos.

Gracias a Cristina, Paloma y Jesús por acompañarme siempre en los laboratorios y pasillos de la facultad, de preguntar por mi bienestar siempre que me ven, y por el apoyo continuo en todos estos años. Quiero también agradecer a Teresa, con quien más tiempo en el laboratorio he compartido junto, intercambiando ideas, realizando medidas, y por esas maravillosas horas hablando más allá de la ciencia.

Mencionar en especial a nuestro jefe de departamento Jorge, que me ha ayudado y apoyado en mis momentos más duros de la tesis, ofreciéndome siempre su mano cuando lo necesitaba. Quiero darte mis más sinceros agradecimientos por el apoyo y los consejos que me has dado para poder terminar este trabajo.

Dar las gracias también a todos mis amigos fuera de la facultad que me han estado apoyando de forma incondicional durante estos años de tesis. A mis hermanos Ezra, Diego, Jaime, y Juan por la maravillosa convivencia, a mi pareja por estar siempre conmigo y quererme tanto, y a toda la familia que tengo en la comunidad de “YU-GI-OH”, sin vosotros no sería nadie.

Por supuesto agradecer a mis padres Qun Wei y Cui Li, los que más me quieren en este mundo, y por estar siempre ahí conmigo. Me han enseñado a apreciar lo que tengo, a darle valor a los conocimientos y a ser libre como quiero. Todo lo que tengo se los debo a ellos por sus sacrificios y esta tesis también es un mérito de ellos. También agradecer a mí hermano pequeño Liang por estar con nosotros y crecer junto a mí.

Finalmente, agradecer a la Junta de Andalucía por subvencionar el programa de Garantía Juvenil, y también a los proyectos del departamento que han permitido realizar esta Tesis Doctoral.

ÍNDICE

Abreviaciones.....	8
Símbolos.....	8
Resumen.....	1
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	4
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS.....	12
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	13
3.1 Materiales.....	13
3.2 Dispersión Dinámica de Luz (DLS).....	19
3.3 Balanza de Langmuir.....	29
3.4 Microscopio de Ángulo de Brewster (BAM).....	33
3.5 Tensiómetro de Gota Pendiente.....	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
CAPÍTULO 4: Caracterización Interfacial y en Disolución de Microgeles de PNIPAM.....	45
4.1 Propiedades de los microgeles en Disolución.....	47
4.2 Caracterización interfacial.....	49
4.3 Imágenes de Micro-BAM.....	57
4.4 Caracterización electrocinética.....	59
CAPÍTULO 5: Caracterización Interfacial y en Disolución de Microgeles de PNIPAM-PEG.....	63
5.1 Propiedades de los microgeles en Disolución.....	63
5.2 Isotermas de Compresión.....	65
5.3 Caracterización electrocinética.....	69
CAPÍTULO 6: Lípidos: DPPC, DPPS y Colesterol.....	74
6.1 Isotermas de Compresión.....	75
6.2 Imágenes de Micro-BAM.....	80
6.3 Efecto del electrolito.....	82
CAPÍTULO 7: Ácido Hialurónico y Polidocanol.....	85
7.1 Isotermas de Compresión.....	85
7.2 Imágenes de Micro-BAM.....	87
CAPÍTULO 8: Ácido Hialurónico, BSA y HSA.....	89
8.1 Isotermas de Compresión.....	90
8.2 Imágenes de Micro-BAM.....	93
Conclusiones.....	95

Lista de Publicaciones	98
Bibliografía	98

Abreviaciones

ATPS: Sistemas bifásicos acuosos

AWPD: Diferencia de fase ponderada en amplitud

BAM: Microscopio de Ángulo de Brewster

BSA: Albúmina de Suero Bovino

DLS: Dispersión Dinámica de Luz

DPPC: Dipalmitoilfosfatidilcolina

DPPS: Dipalmitoilfosfatidilserina

FFR: Inversión de campo rápido

HA: Ácido hialurónico

HSA: Albúmina de Suero Humano

LDE: Laser-Doppler electroforesis

NIPAM: N-isopropilacrilamida

PALS: Phase Analysis Light Scattering

PEG: Metacrilato de poli (etilenglicol)

P(NIPAM-co-MAA): Poli (N-isopropilacrilamida-co-ácido metacrílico)

P(NIPAM-co-AA): Poli (N-isopropilacrilamida-co-ácido acrílico)

PNIPAM: Poli-N-isopropilacrilamida

SFR: Inversión de campo lento

VPTT: Temperatura de transición de fase de volumen

Símbolos

π : Presión Superficial

μ_e : Movilidad Electroforética

D_h : Diámetro Hidrodinámico

I : Fuerza Iónica

MMA: Área Molecular Media

LMA: Área Molecular Límite

Resumen

En esta tesis se aborda el estudio de la morfología y propiedades estructurales de monocapas de sistemas coloidales con aplicaciones biotecnológicas. Los coloides son partículas con un diámetro entre 1 y 1000 nanómetros de forma que debido a su pequeño tamaño, comparten la característica de que poseen una gran cantidad de superficie en comparación con su área, de forma que los efectos superficiales son muy importantes. En concreto, este trabajo se centra en la caracterización y estudio de diversos sistemas coloidales que presentan dos propiedades en común:

- 1) Sistemas físicos catalogados como materia blanda.
- 2) Sistemas que presentan actividad superficial.

Estos sistemas tienen un enorme impacto en diversos campos como la física, biología o nanotecnología, entre otros, debido a su gran versatilidad y variedad permitiendo multitud de aplicaciones biomédicas y tecnológicas. Entre estos sistemas se encuentran, por ejemplo: microgeles, lípidos, emulsionantes o espumantes. En primer lugar, en esta tesis se realiza una caracterización completa, tanto en superficie como en disolución, de microgeles de Poli (N-isopropilacrilamida-co-ácido metacrílico) (PNIPAM) y Poli (N-isopropilacrilamida-co-ácido metacrílico)- Metacrilato de poli (etilenglicol) (PNIPAM-PEG). En segundo lugar, se presenta una caracterización de monocapas de mezclas de lípidos: Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), Dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS) y colesterol. En último lugar, se aborda el estudio del efecto de un polisacárido, el ácido hialurónico (HA), sobre diferentes moléculas como el polidocanol y proteínas de Albúmina de Suero Humano (HSA) y Albúmina de Suero Bovino (BSA).

En referencia al contenido de este manuscrito, se inicia con una introducción a los conceptos básicos que se manejan en la tesis, y por otra parte se expone la motivación y la aplicabilidad de cada sistema. Tras esta introducción se plantearán los objetivos de este proyecto de investigación.

En el capítulo de metodología se detallarán los materiales que se ha utilizado para realizar todos los estudios y posteriormente se explican los métodos y técnicas experimentales empleados. La caracterización interfacial y estudio de las monocapas se realiza con la balanza de Langmuir, el Micro-BAM y el tensiómetro de Gota Pendiente.

La caracterización en disolución para medir el diámetro hidrodinámico (D_h) y la movilidad electroforética (μ_e) se realiza mediante el instrumento Malvern Zetasizer Nano zs aplicando Dispersión de Luz Dinámica (DLS).

A continuación, se discuten ampliamente todos los resultados obtenidos teniendo en cuenta los trabajos previos y la actualidad del tema. Posteriormente, se muestran las conclusiones que se han obtenido a raíz de este trabajo. En primer lugar, se pone a punto

el dispositivo KSV NIMA Micro-BAM (Biolin Scientific, Finlandia) en el laboratorio de superficies e interfases del Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Granada. Esta técnica experimental ha permitido visualizar las interfaces caracterizadas y supone un importante complemento a la caracterización superficial realizada.

Respecto a los sistemas estudiados, en el caso de los microgeles, se ha podido comprobar que el comportamiento superficial de microgeles de PNIPAM y PNIPAM-PEG es dependiente de la temperatura, de la carga efectiva y de la concentración de electrolito, traduciéndose en un desplazamiento de las isothermas de compresión sin variar su forma. Para el caso de los microgeles de PNIPAM, el aumento de la temperatura y la adición de electrolito varía la carga efectiva de las partículas de microgel, observando que valores similares de carga efectiva dan lugar a isothermas de compresión superpuestas. Para los microgeles de PNIPAM-PEG, se observa nuevamente esta relación de la carga efectiva con las isothermas de compresión, sin embargo, también se ponen de manifiesto interacciones específicas del PEG con la sal de NaNO_3 , dando lugar a un desplazamiento mayor de las isothermas sin afectar a los efectos electrocinéticos.

Para los lípidos, se ha estudiado el efecto de las sales NaCl , CaCl_2 , MgCl_2 , LaCl_3 en las monocapas de DPPC:DPPS con distintas concentraciones de colesterol, a la misma fuerza iónica. Se ha observado que en presencia de NaCl la monocapa de DPPC:DPPS sufre un efecto de condensación que depende de la concentración del colesterol. En el caso de LaCl_3 , también se observa un efecto de condensación con el colesterol, con la diferencia de que en este caso la monocapa mantiene sus propiedades independientemente de la concentración de colesterol. Por otro lado, en presencia de cationes divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} , el efecto de la condensación muestra diferencias respecto a las otras sales debido a efectos específicos, mostrando que el efecto de la condensación depende de la acción combinada de los iones y del colesterol.

Por último, el estudio del HA viene motivado por la aplicación biomédica de este polisacárido. Por un lado, se ha utilizado como aditivo para mejorar las propiedades de la espuma esclerosante, una técnica novedosa de tratamiento de varices. El HA mejora la estabilidad de la espuma formada por el medicamento, Polidocanol. Las medidas con la balanza de Langmuir también muestran que la presencia de HA reduce la solubilidad del polidocanol mejorando las interacciones superficiales entre las partículas de polidocanol y con el HA, aumentando también la estabilidad de la monocapa.

Por otro lado, se ha comprobado que el HA mejora la propiedades de emulsiones estabilizadas por BSA y HSA para su uso como sistemas transportadores de fármacos. Para el caso del BSA, la presencia de HA en la subfase reduce la actividad superficial de esta proteína ya que al perder su estructura terciaria en la interfaz aire-agua, permite más puntos de unión con las moléculas de HA en la subfase, favoreciendo la formación de bucles y colas en la monocapa, permitiendo mayor número de moléculas en la superficie. Por contra, la HSA al no perder su estructura terciaria ni secundaria en la

interfase, impide su interacción con las moléculas de HA, disminuyendo la solubilidad de la proteína y mejorando su actividad superficial.

Las publicaciones que estos resultados han dado lugar se encuentran en una lista al final de la tesis.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

La palabra coloide tiene su origen en la palabra griega “kolas”, que significa pegarse o pegamento. Este término fue acuñado por Thomas Graham en 1861 cuando observó que ciertas sustancias se difundían rápidamente en el papel sulfurizado y en las membranas animales, formando cristales al secarse; mientras que otras sustancias se difundían lentamente sobre estos mismos medios sin formar cristales en el secado. A estas últimas sustancias les llamo “coloides” y las sustancias que difundían rápidamente “cristaloides”, que hoy en día también se les llama como disoluciones verdaderas [1].

Coloide o suspensión coloidal es un sistema conformado por dos o más fases, donde se distinguen una fase dispersa (partículas dispersas) y una fase continua (medio de dispersión). También se conoce a la fase dispersa como “partícula coloidal”. Las partículas coloidales suelen poseer un tamaño, acordado en la bibliografía, entre 1 y 1000 nanómetros en una de sus dimensiones, para asegurar que son lo suficientemente pequeñas para que el movimiento browniano de las partículas pueda evitar que coagulen, y suficientemente grandes para diferenciarlos de una disolución verdadera. Aunque se les suela llamar partículas coloidales, la fase dispersa depende de la naturaleza de la misma pudiendo ser una partícula sólida, una burbuja de gas o una gota de líquido [2].

Las partículas coloidales se encuentran siempre dispersas en una fase continua, ya que en caso contrario, con su pequeño tamaño tendería a aglomerarse y formar un cúmulo donde se pierden todas las características únicas que ofrecen los sistemas coloidales.

Dependiendo de los estados de ambas fases, se pueden diferenciar varios tipos de dispersión coloidal, como se muestran en la tabla 1.1.

Medio/Partícula coloidal		Fase dispersada		
		Gas	Líquido	Sólido
Fase continua	Gas	---	Aerosol líquido	Aerosol sólido
	Líquido	Espuma	Emulsión	Sol
	Sólido	Espuma sólida	Gel	Sol sólido

Tabla 1.1. Tipos de dispersión coloidal en función de los estados de la fase dispersada y la fase continua.

Debido a las dimensiones que poseen las partículas coloidales, estos sistemas crean una gran cantidad de área interfacial entre las partículas dispersadas y el medio comparado con su volumen. En la figura 1.1 se muestra un ejemplo donde se puede apreciar como un cubo, con un lado de 1 mm, volumen total de 1 mm³ y área superficial total de 6 mm²,

dividido en pequeños cubos con un lado de $1 \mu\text{m}$, posee un área total de 6000 mm^2 aunque mantiene su volumen total constante.

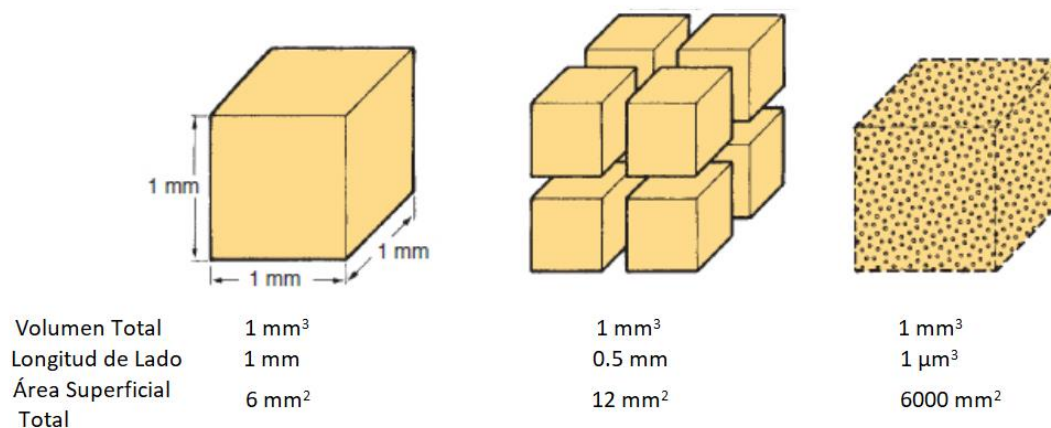


Figura 1.1. Área superficial total en función del lado del cubo con volumen total de 1 mm^3 .

Esta propiedad característica de los sistemas coloidales da lugar a diversos fenómenos superficiales enorme importancia [1,3]. De hecho, en estos sistemas, coloides e interfases son conceptos estrictamente relacionados y se estudian de forma conjunta [4–6]. Una rama muy extendida y ampliamente investigada es el estudio y caracterización interfacial de sistemas con actividad superficial o moléculas anfífilas, la cual tiene impacto en diversos campos tales como la física, biología, óptica o nanotecnología, entre otros. Las moléculas anfífilas forman las monocapas moleculares, que se utilizan para la fabricación de superficies inteligentes, estudio de estructuras interfaciales moleculares, y constituyen la base de la caracterización de membranas celulares mediante la fabricación de monocapas lipídicas.

El concepto de monocapa se refiere a una única capa de átomos o moléculas que están estrechamente empaquetados [7]. Sin embargo, no fue hasta los principios del siglo XX cuando se empezó a estudiar en profundidad estos sistemas. Benjamin Franklin fue uno de los primeros científicos en estudiar la formación de monocapas depositando aceite de oliva en la superficie del agua, observando que al incrementar el área de la superficie era necesario aplicar una mayor cantidad de aceite para crear la misma capa [8]. Posteriormente, sería Lord Rayleigh quien indicaría la formación de una monocapa de aceite en la superficie al depositarlo en el agua [9].

La científica alemana Agnes Pockels crearía el primer dispositivo capaz de medir la tensión superficial de monocapas de moléculas hidrófobas y anfífilas. Este dispositivo sería mejorado posteriormente por Irving Langmuir y su ayudante Katherine Blodgett, conocido hoy en día como la balanza de Langmuir-Blodgett, capaz de transferir la

monocapa en la superficie de agua a una superficie sólida formando las películas de Langmuir-Blodgett. Con ella también demostraron que las películas de moléculas anfifílicas eran realmente moléculas orientadas de tal forma que la parte hidrófoba se sitúa en el aire y la parte hidrófila en contacto con el agua. Irving Langmuir sería galardonado con el premio Nobel en química en 1932 por este trabajo [10]. En la Figura 1.2 se muestra una monocapa de moléculas anfifílicas en la interfaz aire-agua.

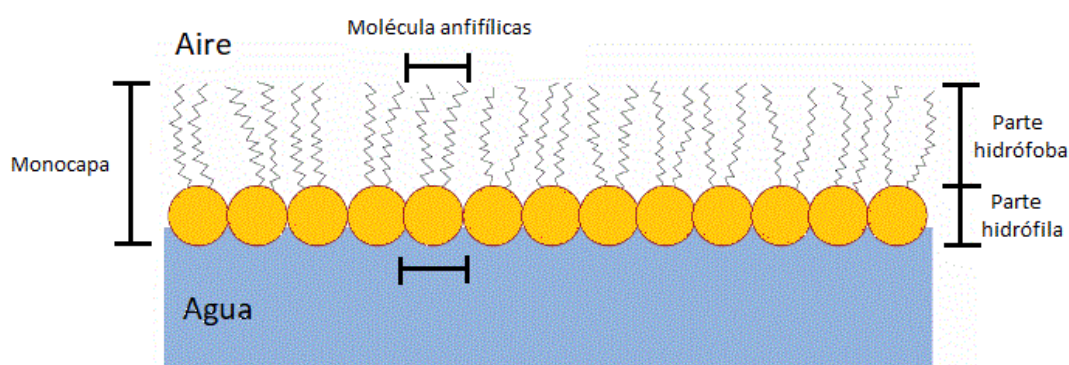


Figura 1.2. Monocapa de moléculas anfifílicas en la interfaz aire-agua.

En la actualidad, se definen dos tipos de monocapas según la naturaleza de las moléculas anfifílicas y el procedimiento de obtención de la monocapa. Una monocapa formada por moléculas insolubles se conoce como monocapa de Langmuir, normalmente suelen ser moléculas anfifílicas, y más recientemente macromoléculas semi-anfifílicas de base polimérica, que se obtiene por esparcimiento en la interfaz. Si la molécula es soluble en una de las fases, la monocapa formada se denomina monocapa de Gibbs y se obtiene por adsorción desde una de las fases a la interfaz [11].

Las monocapas de Langmuir presentan importantes aplicaciones biotecnológicas. Entre las aplicaciones derivadas de los estudios en monocapas destacan la generación de bicapas a partir de la técnica de Langmuir-Blodgett para el estudio de membranas biológicas [12], creación de vidrios anti-reflectantes mediante recubrimiento consecutivo de películas delgadas [7] [8] o sistema como aislante orgánico para transistores [15]. Otras investigaciones que se están llevando a cabo en esta línea son la producción de películas súper delgadas a gran escala con materiales bidimensionales [16], estudio de microgeles como estabilizadores de emulsiones de Mickering [17,18], o el efecto del colesterol sobre membranas lipídicas [19].

Las diversas técnicas experimentales disponibles permiten estudiar la influencia de las condiciones del medio, las interacciones moleculares, los fenómenos de complejación y de asociación entre sistemas anfifílicos de diversa naturaleza. Técnicas como el Microscopio de Ángulo de Brewster (BAM), permiten la visualización directa de las

monocapas en tiempo real y diferenciar el espesor de las monocapas así como la formación de dominios y las transiciones de fase que tienen lugar en las monocapas.

Por otra parte, el estudio de las monocapas de Gibbs permite medir y caracterizar propiedades mecánicas de las monocapas. Las moléculas anfifílicas en suspensión tienden a adsorberse de manera espontánea a la interfaz para reducir la energía libre del sistema, formando las monocapas de Gibbs. El tensiómetro de Gota Pendiente es de las técnicas más utilizadas para estudiar estos sistemas ya que permite medir la variación de la tensión superficial en función del tiempo mediante la formación de una gota con la técnica de Axisymmetric Drop Shape Analysis (ADSA), que se explicará con más detalle en capítulos posteriores. El dispositivo de Gota Pendiente utilizado en esta Tesis Doctoral ha sido diseñado en la UGR, controlados por los programas DINATEN y CONTACTO, software diseñado también en la UGR [20]. Esta técnica mide la tensión superficial de la gota en tiempo real, lo que permite estudiar la cinética de adsorción a la superficie de las moléculas anfifílicas; el control sobre el volumen y área superficial total de la gota mediante inyección y extracción de la subfase permite evaluar la reología dilatacional de la capa interfacial. El dispositivo de Gota Pendiente está equipado con un mecanismo de intercambio de la subfase que permite el estudio de la reversibilidad de la adsorción, interacciones interfaciales y formación de multicapas. Estas técnicas para estudiar las monocapas de Gibbs permiten obtener información relevante de las partículas coloidales en función del medio de dispersión así como la estabilidad de las monocapas resultantes en distintas interfases [21–24].

Aprovechando la enorme potencialidad de esta temática se pueden estudiar distintos sistemas coloidales que presentan diversas interacciones moleculares y nuevas aplicaciones biotecnológicas. Para ello, esta tesis se centra en la especialización en técnicas interfaciales, empezando con la instalación y puesta a punto del microscopio de ángulo de Brewster Micro-BAM, que trabaja en paralelo con la balanza de Langmuir, y el tensiómetro de Gota Pendiente. A través de estas técnicas interfaciales se aborda el estudio de sistemas de naturaleza anfifílica con los cuales se forman sistemas que se enmarcan dentro del grupo de materiales conocido como “Materia Blanda”, que se caracterizan por tener unidades estructurales mucho mayores que el tamaño atómico [25]. El hecho de que estos sistemas posean una unidad estructural tan grande hace que se muevan de forma colectiva, dotando a la materia blanda de varias propiedades características de estos sistemas [26]:

- 1) Respuesta no lineal y muy sensible frente a estímulos externos.
- 2) Estado de no equilibrio y lentos frente a cambios dinámicos debido a la colectividad de la materia blanda.

Estos sistemas coloidales blandos poseen características muy peculiares, idóneas para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas. En esta tesis en partículas se realiza la

caracterización interfacial de tres sistemas coloidales blandos que presentan propiedades superficiales muy distintas y novedosas.

El primero de estos sistemas coloidales blandos que se plantea en este trabajo son los microgeles, partículas formadas por una red de polímeros entrecruzados, los cuales presentan características que responden a estímulos externos como la presión, temperatura, pH o fuerza iónica [27–29]. Estos sistemas adaptan su tamaño y estructura en función del ambiente local lo que les hacen candidatos para distintas aplicaciones atractivas, incluyendo transporte de fármacos [27–32], ingeniería de tejidos e imagen [33,34], recubrimientos anti-incrustantes [13,14], robótica [28,35], desalinización de agua mediante ósmosis directa [36,37] o para eliminar los tintes tóxicos y metales pesados del medio acuoso [38,39].

Uno de los tipos de microgeles más estudiados son los microgeles termosensibles debido a su rápida respuesta cinética a cambios de temperatura. Estos microgeles poseen una temperatura de transición de fase de volumen (VPTT) donde pasan de un estado hinchado a un estado colapsado, o viceversa. En concreto, los sistemas más investigados en la bibliografía son los microgeles termosensibles con una temperatura de transición de fase de volumen (VPTT) cerca de la temperatura fisiológica (entre 32°C y 40°C) [27,40].

Los microgeles basados en polímeros biocompatibles y biodegradables como el poli-N-isopropilacrilamida (PNIPAM) son sistemas modelo debido a su gran versatilidad y fácil proceso de síntesis. Además del comportamiento termosensible de los microgeles de PNIPAM, estas partículas coloidales poseen actividad superficial y se adsorben en las interfases líquido/fluido formando monocapas [21,41–47]. Estas propiedades hacen que estos sistemas sean también aptos como estabilizadores de emulsiones de Pickering con estabilidad controlable. Las emulsiones estabilizadas por partículas blandas de microgeles también son conocidas como “emulsiones Mickering” en la bibliografía para distinguirlos de las “emulsiones de Pickering” convencional, donde se utilizan partículas coloidales rígidas como estabilizadores [17,48]. Otros polímeros biocompatibles como el metacrilato de poli (etilenglicol) (PEG), que poseen un carácter más hidrófilo y se disuelven en la fase acuosa, poseen especial interés ya que su tiempo de degradación, dependiendo de la síntesis, puede variar desde días a varios meses. Esto hace que los microgeles de PEG sean vehículos idóneos para el transporte de fármaco si se quiere suministrar durante un periodo de tiempo determinado de forma continua [49]. Por otro lado, su carácter hidrófilo se puede controlar mediante copolimerización con otros polímeros o lípidos, como el PNIPAM o colesterol, con un carácter más hidrófobo dotando a estos geles actividad superficial para formar monocapas [50].

El segundo sistema coloidal blando que se plantea para esta tesis son las membranas celulares, en concreto, se va a estudiar moléculas lipídicas que constituyen estas membranas. Las monocapas formadas por los lípidos Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)

y Dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS), lípidos que forman la mayor parte de membranas celulares animales, son idóneas para simular el comportamiento de membranas celulares así como la interacción de estos lípidos con otras moléculas como el colesterol. El colesterol es un componente esencial de las membranas celulares, así como en otros sistemas como el cerebro, las células nerviosas y de la bilis, la cual ayuda al cuerpo absorber vitaminas solubles en grasa [51]. En las membranas celulares, el colesterol participa en diversos procesos de transporte y señalización entre el interior y el exterior de la membrana tales como la endocitosis o la exocitosis [52–54]. Más allá de la biología fundamental, el colesterol es un elemento importante para el desarrollo de nuevos biomateriales; como por ejemplo formar parte de liposomas desarrollados para el transporte de medicamentos [55,56], o en lipoplejos para terapia de genes [57,58]. A diferencia de los fosfolípidos, el colesterol posee una estructura que consiste en una cabeza polar formada por un grupo hidroxilo unida a una parte apolar hidrófoba rígida donde contiene cuatro anillos de hidrocarburos. Debido a esta estructura, el colesterol posee un carácter muy hidrófobo y no forma bicapas como los fosfolípidos, sino que siempre interaccionan fuertemente con otros lípidos incrustándose entre dos lípidos de la bicapa, alterando la fuerza mecánica de la membrana e induciendo un comportamiento no ideal en estos sistemas mixtos, conocido como el efecto de condensación del colesterol [59,60]. Este fenómeno fue observado por primera vez por Leathes en 1925 quien estudiaba mezclas de colesterol con monocapas de lecitina de huevo [61]. Es su trabajo, demostró que el área medio por molécula en la mezcla era mucho menor que el esperado para los componentes de forma individual. Desde entonces, el efecto de condensación y la habilidad del colesterol para inducir orden entre las cadenas de hidrocarburos en las películas lipídicas, han sido extensamente caracterizadas usando las películas de Langmuir [62–64].

El último sistema coloidal que se estudia en este trabajo contiene ácido hialurónico (HA), un polisacárido natural que forma parte de la matriz extracelular. Esta sintetizado por las células mesenquimales y consiste en unidades repetitivas de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina formando un polímero de alto peso molecular. El HA, a diferencia de los microgeles de PNIPAM y los lípidos DPPC y DPPS, no presenta actividad superficial y no se adsorbe a las interfases de forma espontánea, sin embargo, esta molécula si puede modificar sustancialmente las propiedades superficiales de otras proteínas y surfactantes que forman sistemas coloidales de interés biomédico.

El HA tiene numerosas aplicaciones biomédicas debido a su capacidad de hidratación ya que adopta una conformación extendida en disolución acuosa y se usa como lubricante y cicatrizante. Entre las aplicaciones biomédicas se puede destacar su uso como viscosuplementos en ortopedia, material de relleno en cirugía y odontología, o su aplicación en un gran número de productos cosméticos y estética debido a su capacidad hidratante [65]. Por otro lado, el HA es una molécula que se estudia también con mucha frecuencia en las investigaciones para el desarrollo de vehículos de transporte de

fármacos en el tratamiento del cáncer. Este interés nace de la propiedad que posee el HA para unir diferentes biomoléculas, tales como proteínas, a través de interacciones específicas o no específicas [66]. Por ejemplo, el HA se une de forma específica a las proteínas receptoras CD44 y RHAMM, dos proteínas muy presentes en células madres cancerígenas, responsable de la resistencia a la quimioterapia, la recurrencia y la metástasis [67,68]. A parte, ya se ha realizado estudios utilizando el HA para recubrir nanopartículas diseñados específicamente para atacar las células cancerígenas [69].

En esta última parte de la Tesis Doctoral se aborda el efecto de HA en dos sistemas coloidales transportadores de fármacos. El primer sistema transporta el fármaco polidocanol, en una espuma. El segundo sistema transporta compuestos liposolubles en una emulsión estabilizada por proteínas de suero (bovino y humano). En ambos sistemas, el HA introduce una mejora en las propiedades debido a la interacción que se produce a nivel interfacial. Esto motiva la caracterización superficial realizada que proporciona información acerca de las interacciones.

El polidocanol es un polímero formado por la etoxilación del dodecanol que se puede dotar de nuevas propiedades interfaciales en presencia del HA. El polidocanol tiene importantes aplicaciones en medicina y estética. Por ejemplo, está presente en champús y acondicionadores para el cabello, y en cremas corporales y faciales [70]. Además, una de sus propiedades más destacadas es su capacidad esclerosante, haciendo que el polidocanol sea utilizado y estudiado en la escleroterapia para el tratamiento de venas varicosas [71].

La escleroterapia consiste en la inyección directa del agente esclerosante sobre la vena dañada [72,73]. La eficacia de este tratamiento depende fundamentalmente del agente esclerosante utilizado y de cómo este interacciona con las células endoteliales, que recubren la cara interna de los vasos sanguíneos. Por otra parte, la acción esclerosante difiere cuando se aplica el medicamento en líquido o en espuma. Para el caso líquido, este tiende a diluirse en el torrente sanguíneo tras la inyección intravenosa, reduciendo la concentración del agente esclerosante. Sin embargo, la espuma es capaz de desplazar la sangre en la inyección y llenar el vaso sanguíneo conservando la concentración del agente esclerosante, que se encuentra en la superficie de las burbujas. Por lo tanto, la eficacia de la escleroterapia con espuma depende en gran medida de las características de la espuma, a saber, la estabilidad de la espuma y el tamaño de las burbujas. Uno de los parámetros que controla estas propiedades del sistema coloidal es la composición de la solución esponjosa, y otra las propiedades interfaciales del polidocanol en la interfaz aire-agua, al ser el estabilizador de la espuma que se deposita en la superficie de las burbujas [74].

Por su parte, las proteínas BSA y HSA se han utilizado en los últimos años en nuestro grupo de investigación como recubrimiento de nanocapsulas lipídicas o nanoemulsiones [75]. Estas proteínas es una de las más importantes de la sangre ya que controla varias

funciones fisiológicas tales como mantener la presión osmótica y el pH, y el transporte de compuesto a través del torrente sanguíneo [76,77]. Por estas razones, son candidatos idóneos para la fabricación de sistemas de transporte de fármacos ya que son totalmente biocompatibles, biodegradables, no tóxicos y además son proteínas no inmunogénicas. La utilización de sistemas emulsionados como medios de transporte presenta numerosas ventajas. Por ejemplo, las emulsiones son capaces de proteger el fármaco encapsulado evitando su degradación en el torrente sanguíneo, poseen una alta eficacia para encapsular compuestos lipofílicos, y la capa polimérica externa también puede prevenir la irritación del tejido en el lugar de administración [78]. En la bibliografía se suele tratar la BSA como una proteína análoga a su versión humana, la HSA, debido a la similitud que hay entre ambas proteínas. Según la bibliografía, entre estas dos proteínas comparten 436 aminoácidos de un total de 576, por lo que comparten un 76% de la secuencia de aminoácidos [79]. Aun considerando estas similitudes, sigue existiendo una diferencia en la estructura primaria entre ambas proteínas, lo que puede producir diferencias cuando interactúan con otras moléculas o en sus comportamientos interfaciales. Este último punto debe ser considerado cuando se quiere utilizar la BSA y la HSA como emulsionantes para sistemas de transporte de fármacos. En este sentido, la técnica de monocapas de Langmuir constituye una herramienta única para investigar posibles diferencias entre BSA y HSA a través de sus interacciones con el HA, mientras que el BAM permite observar la posible formación de sistemas complejos de estas proteínas con el HA en la interfase.

Como se ha visto, el estudio de la morfología y propiedades estructurales de monocapas tiene interés en diversos sistemas, donde cada una de ellas posee interesantes aplicaciones biotecnológicas. En este trabajo se estudian los sistemas mencionados en distintas condiciones para caracterizar las propiedades superficiales que estos sistemas presentan mediante las técnicas interfaciales de balanza de Langmuir, Micro-BAM y tensiómetro de Gota Pendiente; así como sus propiedades en disolución mediante técnicas de DLS para medir el diámetro hidrodinámico y la movilidad electroforética. Estos estudios permitirán profundizar en el comportamiento interfacial de estos sistemas en distintas condiciones para mejorar las aplicaciones futuras.

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es la especialización en las distintas técnicas interfaciales y con ellos abordar el estudio y caracterización de sistemas coloidales blandos que presentan actividad superficial e interesantes aplicaciones biotecnológicas.

Como ya se sabe, los sistemas coloidales blandos que se van abordar en este trabajo son los microgeles de PNIPAM y PEG, los lípidos DPPC y DPPS en interacción con el colesterol como sistema modelo de la membrana biológica, y la formación de complejos del polidocanol y proteínas de BSA y HSA con HA como aditivo funcional en sistemas transportadores de fármacos (espumas y emulsiones). Para lograr estos objetivos será necesario:

1. Instalación y puesta a punto del Microscopio de Ángulo de Brewster Micro-BAM para complementar las técnicas de balanza de Langmuir y el tensiómetro de Gota Pendiente.
2. Caracterización superficial y en disolución de microgeles de PNIPAM y PEG a distintas temperaturas y concentraciones de electrolitos en la fase acuosa. Estos sistemas se estudian en la interfaz aire-agua a temperatura de 20°C y 50°C donde presenta distintos estados de hinchado/deshinchado y se visualiza la estructura interfacial mediante el Micro-BAM.
3. Caracterización superficial de monocapas de mezclas de lípidos de DPPC/DPPS con distintas proporciones de colesterol y concentraciones salinas. Estos experimentos permiten estudiar el efecto de condensación del colesterol en películas lipídicas siendo de gran relevancia en la función de las membranas biológicas. Por otro lado, el estudio de este sistema en función de las distintas sales permitirá conocer los efectos específicos de los lípidos con cada una de ellas.
4. Caracterización superficial de la interacción del HA con el polidocanol para mejorar la espuma esclerosante.
5. Caracterización superficial de la interacción del HA con las proteínas de BSA y HSA para investigar las similitudes y diferencias entre BSA y HSA para su uso en emulsiones.

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y METODOLOGÍA

Como se ha indicado en los objetivos, este trabajo se centra principalmente en tres bloques experimentales: microgeles, lípidos y los complejos formados con HA. Por lo tanto, en esta sección se exponen los materiales que se han utilizado en cada uno de los bloques y las técnicas y métodos experimentales empleados.

3.1 Materiales

Microgeles

En la bibliografía se conocen principalmente tres métodos de síntesis de microgeles: nucleación homogénea por polimerización en emulsión, emulsificación y complejación polimérica [25]. Los microgeles de PNIPAM utilizados en este trabajo han sido sintetizados mediante nucleación homogénea por polimerización en emulsión siguiendo el protocolo de Pérez-Fuentes et al. [80] en la Universidad de Granada. En concreto, la síntesis se realizó en un reactor con una capacidad volumétrica de 1000 ml con un agitador con forma de ancla, un condensador, termómetro de mercurio y una entrada para un flujo de nitrógeno. Se utilizan 4.9 g de N-isopropilacrilamida (NIPAM, Acros) como el monómero principal mientras que 0.49 g de N-metilenbis (acrilamida) (MBA, Acros) es usado como entrecruzante. El NIPAM y el MBA se disuelven en 350 ml de agua deionizada Milli-Q (Milli-Q, Millipore) ($2 \mu\text{S cm}^{-1}$) y se introduce en el reactor. Esto se agita a 200 rpm a temperatura de 70°C (el PNIPAM es insoluble en agua para altas temperaturas) y se añade 0.291 g de persulfato de potasio (KPS, Acros) como iniciador, la cual dota del microgel de carga negativa. La reacción se deja durante 4 horas bajo un flujo constante de nitrógeno. Posteriormente se procede con un proceso de purificación propuesto por los autores Pelton y Chibante [81] donde se realizan 3 ciclos sucesivos de centrifugación/decantación/redispersión a 38°C y 14000 rpm. Como resultado se obtiene una suspensión coloidal de microgeles de PNIPAM con una concentración de $2.8 \pm 0.6 \text{ g L}^{-1}$, con una densidad de entrecruzante del 4.75%.

Los microgeles de PNIPAM-PEG han sido proporcionados por la empresa *IQOXE Emulsiones Poliméricas* y fueron sintetizados con el mismo método de nucleación homogénea por polimerización en emulsión. En este caso 14.4 g de NIPAM, 3.6 g de metoxi polietilenglicol 750-metacrilato 50 % en agua (MPEG750MA) y 1.8 g de ácido metacrílico (MAA) se utilizan como monómeros principales, y 0.9 g de etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) como entrecruzante que se disuelven en 1800 ml de agua Milli-Q. En el reactor se agita durante 20 minutos a 250 rpm con un flujo contante de

nitrógeno para eliminar el oxígeno disuelto. Posteriormente se añaden 0.36 g de persulfato de sodio (NaPS) como iniciador y se deja agitando a 250 rpm durante 24 h a 70°C. Como resultado se obtiene una dispersión coloidal de microgeles de PNIPAM-PEG con una concentración de $9.7 \pm 0.4 \text{ g L}^{-1}$.

En la Fig. 3.1.1 se muestra la estructura básica de un microgel, donde se puede diferenciar un núcleo, donde existe una mayor concentración de polímeros y de entrecruzantes, y una corteza externa caracterizada por una menor concentración de polímeros y una mayor deformabilidad frente a estímulos externos. El tamaño de estas dos zonas está determinado principalmente por la cantidad de entrecruzantes y el proceso de síntesis utilizado.

Los electrolitos utilizados en este trabajo son NaNO_3 y $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (ambos $\geq 99\%$ de pureza) de Sigma-Aldrich (Saint Louis, EE. UU.) y Scharlau-Sical (Barcelona, España) respectivamente. Para las disoluciones se utiliza siempre agua deionizada Milli-Q y se diluye estos electrolitos en concentraciones de 1 y 10 mM.

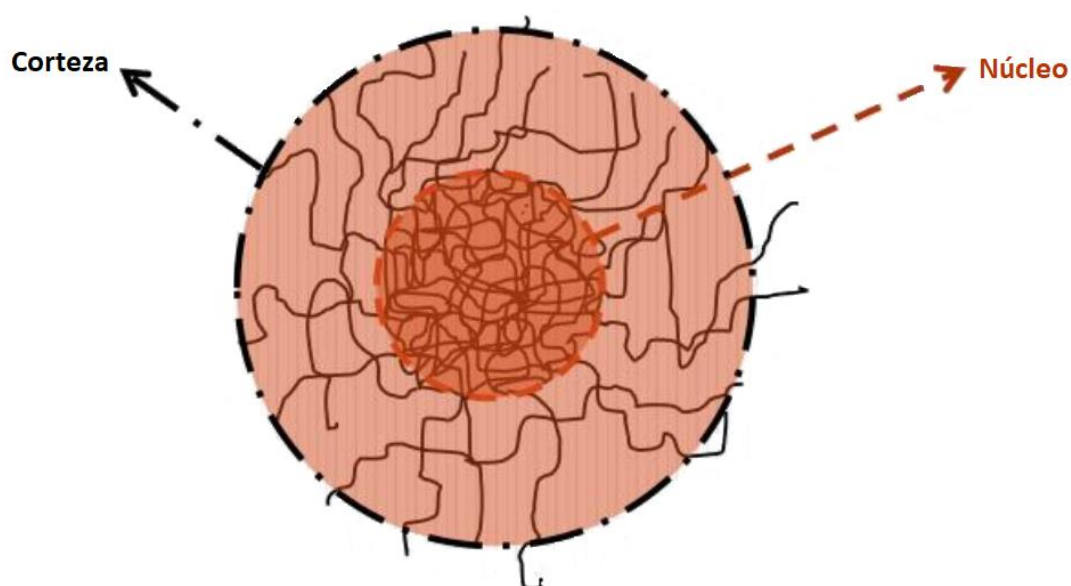


Figura 3.1.1. Estructura básica de una partícula de microgel que consta de un núcleo denso y una corteza más deformable.

Lípidos

El lípido 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina, fosfatidilcolina (DPPC) con masa molar de $734,053 \text{ g mol}^{-1}$ se adquirió en Avanti Polar Lipids (Delfzyl, Países Bajos), ($\geq 99\%$ de pureza). La fórmula química de esta molécula es $\text{C}_{40}\text{H}_{80}\text{NO}_8\text{P}$, y la estructura

molecular se muestra en la Fig. 3.1.2. El DPPC es un fosfolípido que consiste en dos grupos de ácido palmítico C_{16} (parte hidrófoba) unido a una cabeza de grupo fosfatidilcolina (parte hidrófila). El grupo fosfatidilcolina también es un grupo zwitteriónico que mantiene una carga neutra para valores de pH entre 4 y 10 [82].

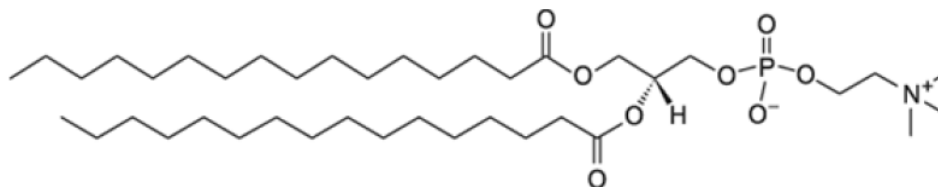


Fig. 3.1.2. Estructura molecular del DPPC.

El lípido 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (sal sódica), fosfatidilserina (DPPS) con masa molar de $735,769 \text{ g mol}^{-1}$ se adquirió en Avanti Polar Lipids (Delfzyl, Países Bajos), ($\geq 99\%$ de pureza). La fórmula química de esta molécula es $C_{38}H_{74}NO_{10}P$, y la estructura molecular se muestra en la Fig. 3.1.3. El DPPS también es un fosfolípido que consta de dos grupos de ácido palmítico C_{16} pero unido a una cabeza de grupo fosfatidilserina (hidrófila) con una carga neta negativa.

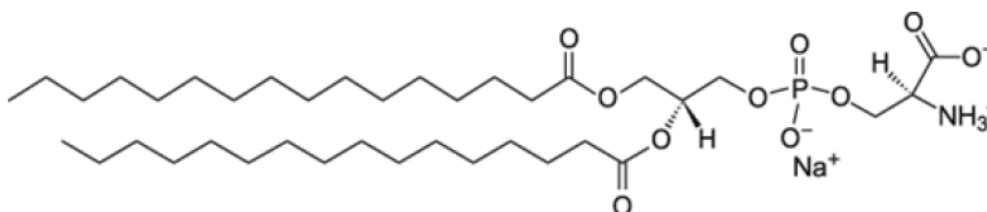


Fig. 3.1.3. Estructura molecular del DPPS.

El colesterol con masa molar de $386,65 \text{ g mol}^{-1}$ se adquirió desde Sigma-Aldrich (St. Louis, Estados Unidos), ($\geq 99\%$ de pureza). La fórmula química de esta molécula es $C_{27}H_{45}OH$, y la estructura molecular se muestra en la Fig. 3.1.4. El colesterol es un lípido de tipo esteroil.

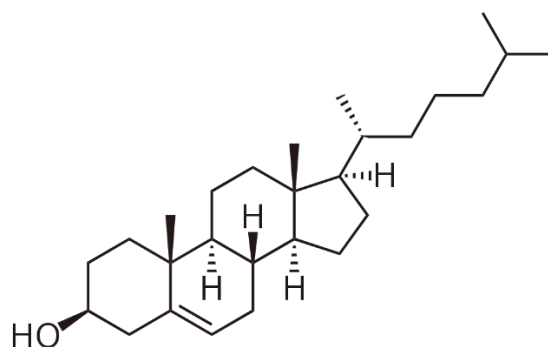


Fig. 3.1.4. Estructura molecular del colesterol.

Para realizar los experimentos se prepara una disolución de extensión de la mezcla de lípidos deseado en cloroformo/metanol en una proporción de 4:1 (v/v) bajo condiciones ambientales. Tanto el cloroformo y el metanol son de Sigma-Aldrich con una pureza $\geq 99\%$. Las mezclas de lípidos que se consideran para este estudio siguen las proporciones DPPC:DPPS:Colesterol (0.8:0.2:0), (0.56:0.14:0.3), (0.24:0.06:0.7) y (0:0:1), con una concentración final de 0.5 g L^{-1} . Por lo tanto, se estudia el efecto del colesterol en proporciones de 0, 30, 70 y 100 % sobre las propiedades interfaciales de los lípidos DPPC y DPPS.

Los electrolitos utilizados son: CaCl_2 (Fluka, Hampton, NH, USA, 21114), MgCl_2 (Fluka, 65020), NaCl (Sharlau, Barcelona, España, S02241000), y LaCl_3 (Sigma-Aldrich, 31820). Como lo que se quiere investigar es el efecto específico del ion con la monocapa lipídica y el colesterol, se mantiene las disoluciones a una fuerza iónica constante de $I=15 \text{ mM}$. Consecuentemente, las concentraciones de cada electrolito utilizado son: 15 mM NaCl , 5 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 y 2.5 mM LaCl_3 .

Ácido Hialurónico

El HA es adquirido de Bioibérica S.A.U. (Hialuronato de sodio intra-articular de alto peso molecular, código F0142, número de lote 15/0001) y utilizado sin purificación adicional. Es un glicosaminoglicano no sulfatado formado por repeticiones del disacárido N-acetilglucosamina y ácido N-glucurónico, con un peso molecular de $846,786 \text{ g mol}^{-1}$. La fórmula química del HA es $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_{11}$, y la estructura molecular se muestra en la Fig. 3.1.5.

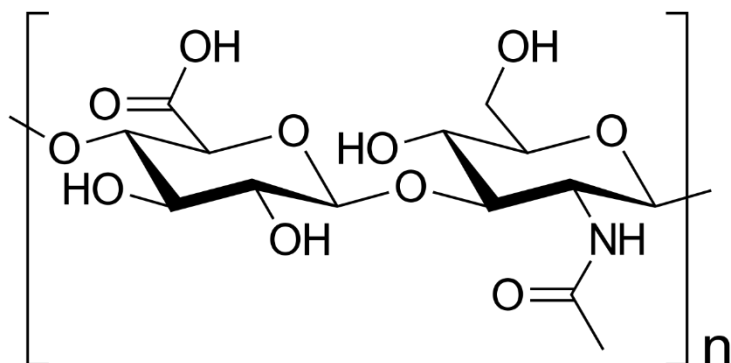


Fig. 3.1.5. Estructura molecular del ácido hialurónico.

El polidocanol se adquirió como Thesit® (CAS number 9002-92-0, Sigma-Aldrich) y es un éter de polietilenglicol de alcohol laurílico. Posee una masa molar de $582,816 \text{ g mol}^{-1}$ y su fórmula química es $\text{C}_{30}\text{H}_{62}\text{O}_{10}$. El polidocanol es un agente tensioactivo no iónico que consta de una cabeza polar hidrófila (dodecilo) y una cadena apolar hidrófoba (óxido de polietileno) como se puede observar en su estructura molecular en la Fig. 3.1.6.

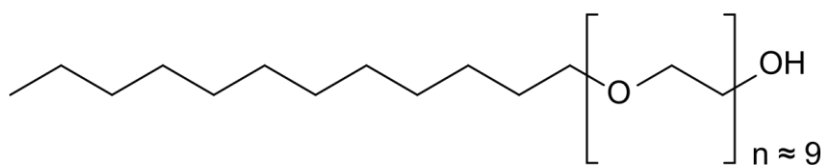


Fig. 3.1.6. Estructura molecular del polidocanol.

Tanto la BSA como la HSA fueron comprados a Sigma-Aldrich. Ambas proteínas son proteínas albúmina séricas de la familia de proteínas globulares albúmina. Aunque son proteínas muy similares, estructuralmente tienen ciertas diferencias. En el caso del BSA posee un total de 583 aminoácidos residuos con un peso molecular de $66,382 \text{ g mol}^{-1}$, mientras que para la HSA posee 585 aminoácidos residuos con un peso molecular de $66,437 \text{ g mol}^{-1}$.

En la Fig. 3.1.7A se muestran las estructuras 3D modeladas de BSA y HSA donde se puede apreciar que ambas estructuras son bastante similares. En la Fig. 3.1.7B se identifica todas las variaciones de secuencia después del alineamiento de las proteínas y se define para los aminoácidos no coincidentes si son homólogos o si poseen propiedades fisicoquímicas diferentes. El mayor interés de estudiar estas diferencias radica en el hecho de que tener aminoácidos con diferentes características en la misma posición

podría modificar las interacciones intermoleculares y producir diferencias en la conformación o estabilidad de las proteínas [83].

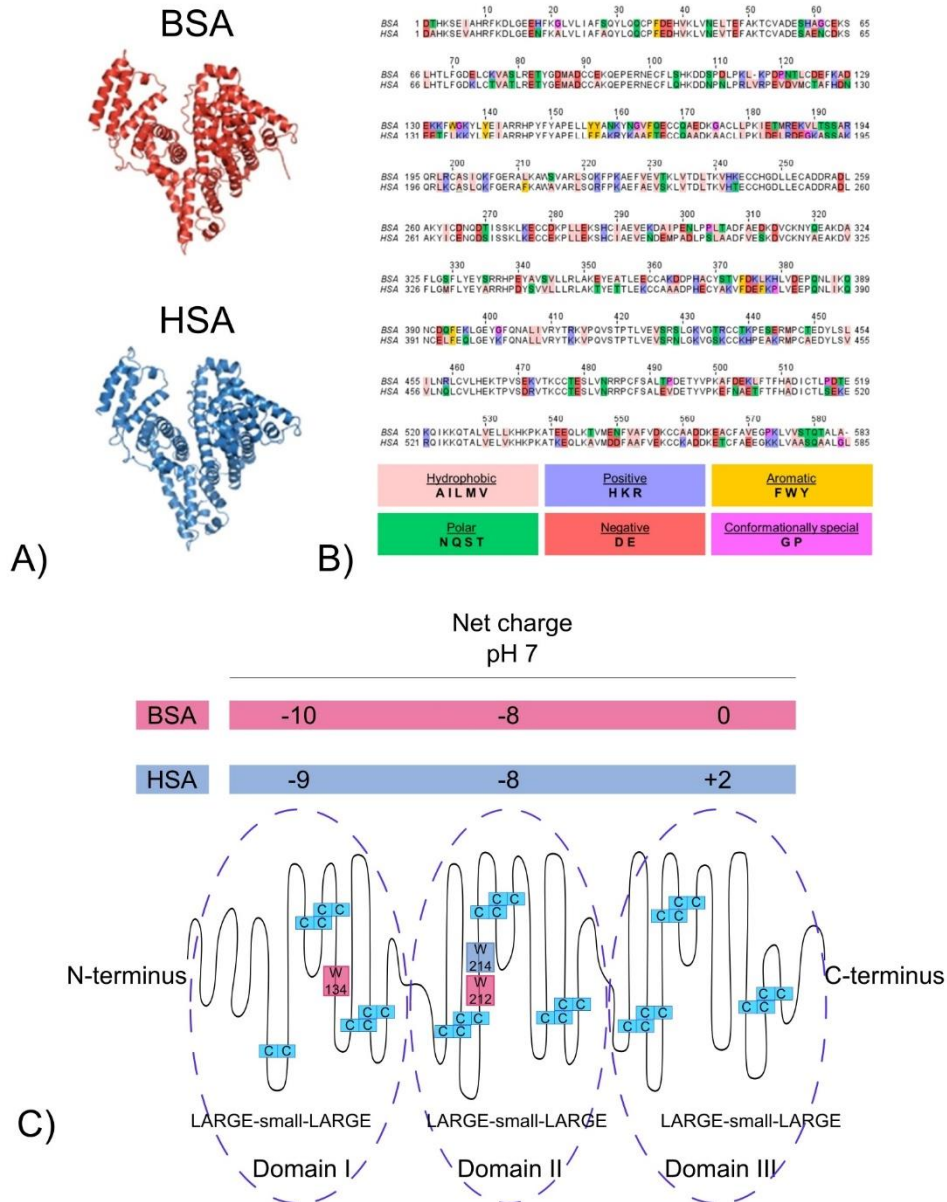


Fig. 3.1.7. (A) Estructuras 3D modeladas de BSA y HSA. (B) Alineación de BSA y HSA; los 189 aminoácidos no coincidentes se resaltan con un color predeterminado, dependiendo de sus 190 propiedades fisicoquímicas, de acuerdo con el esquema de color de Zappo [83]. (C) Estructura de nueve bucles de BSA y HSA que destaca la ubicación de los grupos de cisteína y la distribución de carga a lo largo de los dominios de la proteína a pH 7. (A) y (B) adaptado de [83] con permiso de Elsevier © 2020.

BSA y HSA tienen 17 enlaces disulfuro y la posición de las cisteínas implicadas en esos enlaces produce una estructura característica de nueve bucles. A lo largo de la secuencia de ambas proteínas, hay ocho pares de cisteínas adyacentes que definen la estructura del bucle (Fig. 3.1.7C). Los nueve bucles se distribuyen en tres dominios homólogos, de tal manera que los tres bucles incluidos en cada dominio siguen una organización de bucle grande-bucle pequeño-bucle grande (Fig.3.1.7C). Una de las diferencias dentro de estos dominios a lo largo de la longitud de la proteína es la distribución de carga. Por ejemplo, a pH 7, la carga estimada para los dominios I, II y III para BSA es -10, -8 y 0, respectivamente, mientras que para HSA es -9, -8 y +2, respectivamente [83].

3.2 Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

Tamaño Hidrodinámico

Para determinar el tamaño y la carga efectiva de los microgeles en disolución se ha utilizado el instrumento Malvern Zetasizer Nano zs (malvern panalytical, Reino Unido). Este aparato permite medir el diámetro hidrodinámico D_h mediante Dispersión Dinámica de Luz (DLS) con el Método de los cumulantes [84–86]. Este método se basa en las medidas de la función de autocorrelación de intensidad dispersada $G(\tau)$:

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t) \cdot I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (3.2.1)$$

Donde $I(t)$ e $I(t + \tau)$ son la intensidad detectada en los instantes de tiempo t y $t + \tau$ respectivamente. A τ también se le conoce como el tiempo de muestra, y representa el intervalo de tiempo durante el cual las medidas de intensidad van a ser correlacionadas. Este dato se introduce en el experimento y su valor dependerá del tamaño de la partícula. La notación de “brackets” denota el operador de valor esperado, normalizado por $\langle I(t) \rangle^2$.

Para muestras diluidas y monodispersas donde las partículas coloidales se pueden aproximar a esferas con un radio a , la función de autocorrelación de intensidad se puede simplificar a:

$$G(\tau) = A + B \exp(-2\Gamma \tau) \quad (3.2.2)$$

$$\Gamma = D_0 q^2 \quad (3.2.3)$$

Siendo A y B parámetros relacionados con la razón señal-ruido del dispositivo, mientras que la tasa de decaimiento Γ es el producto del coeficiente de difusión libre D_0 y el cuadrado del módulo del vector de dispersión q . El vector de dispersión q se define como la diferencia entre el vector de onda de la radiación incidente y el correspondiente a la radiación dispersada, y su módulo se puede calcular con el ángulo de dispersión θ y la longitud de onda de la radiación incidente λ mediante la ecuación:

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda} \sin(\theta/2) \quad (3.2.4)$$

Siendo n_0 el índice de refracción del medio continuo.

Por otra parte, el coeficiente de difusión D_0 está relacionado con el radio de las partículas a por la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D_0 = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \quad (3.2.5)$$

Donde η es el coeficiente de viscosidad del medio, k_B la constante de Boltzmann y T la temperatura.

Si se realiza un logaritmo a la ecuación (3.2.2) se obtiene:

$$\ln\sqrt{G(\tau) - A} = \ln\sqrt{B} - \Gamma \tau \quad (3.2.6)$$

De esta última ecuación se puede ver que la tasa de decaimiento Γ , de donde se obtiene el coeficiente de difusión D_0 y el radio de las partículas a , es la pendiente de $\ln\sqrt{G(\tau) - A}$ en función del tiempo de muestra τ .

Para las muestras polidispersas el comportamiento del sistema coloidal deja de ser lineal para valores de τ grandes, por lo que la ecuación (3.2.6) deja de ser válida para estos

sistemas. En estos casos se aplica el método de los cumulantes para el término $\Gamma \tau$ resultando en la siguiente ecuación [87,88]:

$$\ln\sqrt{G(\tau) - A} = \ln\sqrt{B} - \mu_1 \tau + \mu_2 \frac{\tau^2}{2!} - \mu_3 \frac{\tau^3}{3!} + \dots \quad (3.2.7)$$

Los coeficientes μ_i se les conocen como cumulantes de orden i . La precisión de este método para calcular los valores de μ_i decae rápidamente con el orden, y a partir del orden 3 suele ser inviable. En la práctica, se utiliza solo el cumulante de orden 1 que está relacionado con el valor promedio del coeficiente de difusión \bar{D} :

$$\mu_1 = q^2 \bar{D} \quad (3.2.8)$$

Y \bar{D} está relacionado con el radio medio de las partículas coloidales \bar{a} a través de la ecuación de Stokes-Einstein:

$$\bar{D} = \frac{k_B T}{6\pi\eta\bar{a}} \quad (3.2.9)$$

La calidad de estas medidas se suele controlar calculando el índice de polidispersidad IP :

$$IP = \frac{\mu_2}{\mu_1^2} \quad (3.2.10)$$

Siendo el valor de IP igual a cero para muestras monodispersas y con valores mayores en función de la polidispersidad.

Movilidad Electroforética

El Malvern Zetasizer Nano zs también permite medir la movilidad electroforética μ_e de partículas coloidales que poseen carga. La movilidad electroforética μ_e es la relación

entre la velocidad \vec{V} que adquieren las partículas bajo la acción de un campo eléctrico \vec{E} :

$$\vec{V} = \mu_e \vec{E} \quad (3.2.11)$$

Las partículas coloidales cargadas bajo la acción de un campo eléctrico \vec{E} experimentan una fuerza, y por lo tanto adquieren una aceleración hacia el polo opuesto, hasta obtener una velocidad constante debido a la resistencia por la viscosidad del medio. Esta velocidad constante \vec{V} es la que se utiliza para obtener el valor de la movilidad electroforética μ_e . Por lo que la movilidad electroforética es una magnitud que está directamente relacionada con la carga efectiva que presenta las partículas coloidales en disolución.

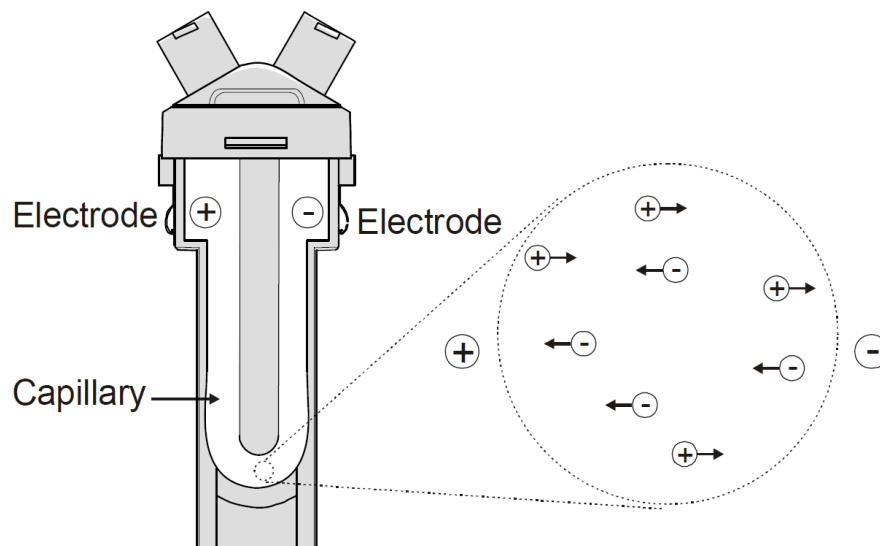


Fig. 3.2.1. Célula diseñadas para medir la μ_e aplicando un potencial eléctrico en los electrodos [86].

El sistema experimental clásico para medir la movilidad electroforética consiste en una celda con un electrodo a cada lado donde se aplica un potencial eléctrico conocido, y se mide la velocidad de las partículas bajo este campo. En la Fig. 3.2.1 se muestra una celda ejemplo. Bajo el efecto de este potencial las partículas coloidales se mueven hacia el electrodo con carga opuesta, y la velocidad de estas partículas es medida para obtener el valor de la movilidad electroforética.

Uno de los primeros métodos para medir la velocidad de las partículas coloidales en estas células es el método de Laser-Doppler electroforesis (LDE). Esta técnica de

dispersión de luz se basa en el desplazamiento Doppler que sufre una radiación después de incidir sobre una muestra con partículas en movimiento. Para ello, se utiliza una fuente de luz monocromática a una longitud de onda λ conocida, que se divide en dos haces independientes con la misma intensidad. Estos dos haces de luz inciden en la muestra y se cruzan con un ángulo θ , formando en la región de medida una serie de bandas de interferencia con distinta intensidad paralela a la bisectriz del ángulo θ , y perpendicular a la dirección de movimiento de las partículas y al del campo eléctrico aplicado como se puede ver en la Fig. 3.2.2 [85].

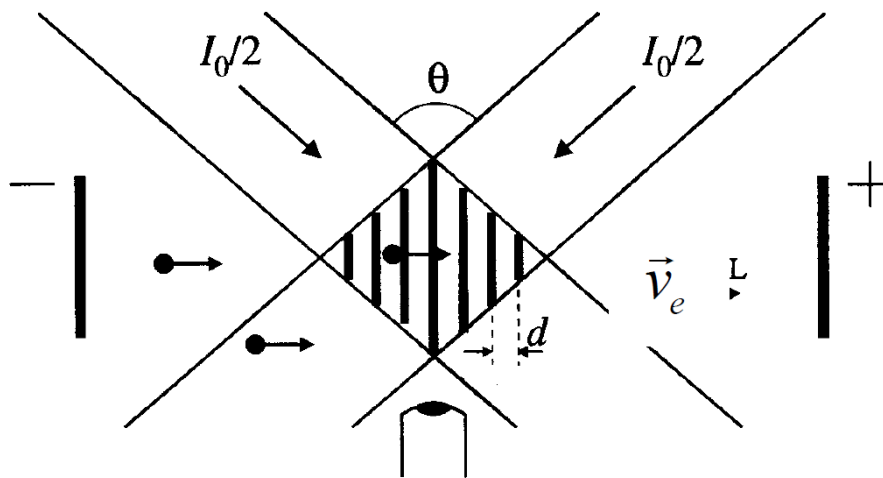


Fig. 3.2.2. Franjas de interferencia creada por los dos haces de luz en la técnica de LDE.

La distancia d entre las franjas de interferencia viene dada en función del índice de refracción del medio continuo n , la longitud de onda λ y el ángulo formado por los haces de luz θ :

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin(\theta/2)} \quad (3.2.12)$$

Para el caso de una partícula j que atraviesa el patrón de interferencias, la intensidad de la radiación dispersada $I_j(t)$ por esta partícula varía de forma senoidal con la expresión:

$$I_j(t) = I_{0j}(t) \exp[i\vec{q}\vec{r}_j(t)] \quad (3.2.13)$$

Siendo $I_{0j}(t)$ la amplitud de la radiación incidente, \vec{q} el vector de dispersión y $\vec{r}_j(t)$ el vector de posición de la partícula j .

En la práctica, la dependencia temporal de la amplitud $I_{0j}(t)$ suele variar más lentamente que el término exponencial debido a las dimensiones del sistema experimental, por lo que para simplificar el problema se considera esta amplitud constante, mientras que el movimiento de las partículas se puede descomponer como suma de un término colectivo y otro individual o difusivo, denotados por c y d respectivamente [89].

$$I_j(t) = I_{0j} \exp\{i[\vec{q} \cdot \vec{r}_c(t) + \vec{q} \cdot \vec{r}_{d,j}(t)]\} \quad (3.2.14)$$

A partir de esta ecuación se puede escribir fácilmente la intensidad dispersada por N números de partículas como la suma de las contribuciones individuales:

$$I(t) = \sum_j^N I_j(t) = \exp[i\vec{q} \cdot \vec{r}_c(t)] \sum_j^N I_{0j} \exp[i\vec{q} \cdot \vec{r}_{d,j}(t)] \quad (3.2.15)$$

Si el sistema coloidal está compuesto por partículas idénticas y no existen contribuciones térmicas ni electro-osmóticas, el término colectivo se puede relacionar con la movilidad electroforética de la siguiente manera:

$$\frac{d\vec{r}_c(t)}{dt} = \mu_e \vec{E}(t) \quad (3.2.16)$$

Y agrupando la parte difusiva en un término de intensidad difusiva $I_d(t) = \sum_j^N I_{0j} \exp[i\vec{q} \cdot \vec{r}_{d,j}(t)]$, se puede reescribir la ecuación (3.2.15) como:

$$I(t) = I_d(t) \exp[i\vec{q} \cdot \vec{r}_c(t)] \quad (3.2.17)$$

Para obtener la movilidad electroforética μ_e de esta última ecuación se debe realizar un análisis espectral de la señal de intensidad o utilizar la función de autocorrelación de intensidad $G(\tau)$ definida en la ecuación (3.2.1). En el primer caso, el espectro de

frecuencias se obtiene calculando el módulo de la transformada de Fourier de la ecuación (3.2.17) teniendo en cuenta la relación (3.2.15) [90,91]:

$$\tilde{I}(\omega) = \frac{\Gamma}{2\pi} \left[\frac{1}{(\omega + \Delta\omega_e)^2 + \Gamma^2} + \frac{1}{(\omega + \Delta\omega_e)^2 - \Gamma^2} \right] \quad (3.2.18)$$

Donde $\Gamma = D_0 q^2$ es la tasa de decaimiento definida en (3.2.3) y $\Delta\omega_e = \vec{q} \cdot \vec{v}_e$ es la frecuencia Doppler que representa el desplazamiento en frecuencias de la intensidad debido al movimiento de las partículas. La segunda forma consiste en utilizar la función de autocorrelación de intensidad $G(\tau)$ que está relacionado con la frecuencia Doppler:

$$\frac{G(\tau)}{G(0)} = \exp(-\Gamma\tau) \cos(\Delta\omega_e\tau) \quad (3.2.19)$$

En ambos casos se obtiene la frecuencia Doppler y consecuentemente la movilidad electroforética μ_e .

Sin embargo, el método de LDE posee ciertos inconvenientes técnicos que empeora los resultados y dificulta las medidas. EL primer efecto que aparece es el fenómeno de la polarización de los electrodos donde se acumulan las partículas en sus cercanías tras aplicar un campo eléctrico continuo. Este efecto se puede remediar cambiando el campo continuo a un campo eléctrico alterno, haciendo que el espectro de frecuencias continuo pase a un conjunto de picos armónicos espaciados en múltiplos de la frecuencia del haz incidente (ω_0). Para medir adecuadamente en estas condiciones, la frecuencia del haz incidente debe ser menor que la frecuencia Doppler $\Delta\omega_e$ para que en un pulso las partículas puedan cubrir distintas franjas de interferencia. Para los casos donde la movilidad electroforética es muy pequeña, y por lo tanto valores de $\Delta\omega_e$ menores que la frecuencia del haz incidente, la precisión en la medida del desplazamiento Doppler decae drásticamente. Esto se podría solucionar aumentando el campo eléctrico pero conlleva otros efectos negativos, como un exceso en el calentamiento Joule del sistema [85,89].

Por otro lado, LDE en principio solo permite medir el valor absoluto de la movilidad electroforética μ_e y no el signo o la carga de las partículas coloidales. Sin embargo, este defecto se puede arreglar con un modulador óptico, que consiste en modular uno de los haces de luz con un espejo oscilante. Este modulador óptico permite medir el signo de la movilidad electroforética, y a diferencia del LDE, funciona tanto en sistemas con alta o baja movilidad electroforética [86].

Otro efecto a tener en cuenta es el efecto electro-osmótico. Este efecto consiste en el flujo de los iones hacia los extremos de la célula debido al campo eléctrico. Al ser un sistema cerrado, se crea otro flujo inverso en el centro de la célula que contrarresta al anterior. Al ser flujos opuestos, existe una zona donde ambos flujos se cancelan, conocido como capa estacionaria, donde si se realiza la medida de velocidad esta correspondería a la velocidad electroforética verdadera [86].

Aunque es posible medir la velocidad electroforética en la capa estacionaria, esta sigue siendo un inconveniente para los dispositivos. En el caso de los dispositivos Malvern, estos utilizan el método M3, que consiste en la aplicación de dos modos: la inversión de campo lento (SFR) y la inversión de campo rápido (FFR), permitiendo medir la movilidad electroforética en cualquier punto del sistema. Este método se aplica junto con el método de Phase Analysis Light Scattering (PALS), siendo una versión mejorada del método clásico LDE que permite obtener valores de movilidades cercanos a cero.

El método M3 aplica el modo SFR para obtener una mejor resolución de la distribución y evitar la polarización de los electrodos. Mientras que el modo FFR invierte el campo eléctrico a mayor velocidad para evitar el efecto electro-osmótico, pero asegurando que las partículas coloidales alcanzan la velocidad electroforética, obteniendo un valor preciso de la movilidad electroforética.

Por su parte, el método de PALS se ha desarrollado para poder medir valores pequeños de movilidad, como mejora del método LDE. Para ello, PALS hace un análisis en fase, y no en frecuencia de la radiación dispersada. Al igual que LDE, PALS se basa en la superposición de un haz de luz de referencia, modulada en una frecuencia ω_m , con el haz de luz dispersado. Esta superposición de haces crea una región de franjas de interferencia en movimiento separadas por una distancia d (ecuación 3.2.12) que permite la demodulación de fase de la señal Doppler cuando se utiliza ω_m como referencia. Una partícula j en una posición fija en la región de interferencia dispersará la luz con una intensidad que varía con la frecuencia ω_m y con un cambio de fase arbitrario pero fijo $\phi_j(0)$.

En este escenario, si la movilidad de las partículas dispersoras es nula, se obtiene que la frecuencia Doppler será igual a ω_m , y la diferencia en fase de ambos haces de luz será constante. Por el contrario, si la luz es dispersada por una partícula j con movilidad, la fase de la luz dispersada ϕ_j estará dada en función del tiempo, que dependerá de la posición \vec{r}_j de la partícula, el vector de dispersión \vec{q} y de la fase de la radiación fija $\phi_j(0)$:

$$\phi_j(t) = \phi_j(0) + \vec{q}[\vec{r}_j(t) - \vec{r}_j(0)] \quad (3.2.20)$$

Un cambio de fase $\phi_j(t)$ de 2π , o de forma equivalente de 360° , corresponde al desplazamiento de la partícula j sobre el patrón de interferencias una distancia d [92]. Por lo tanto, el cambio de fase de la radiación está directamente relacionado con la velocidad electroforética de la partícula. También se puede observar que esta expresión no requiere de una velocidad mínima de movimiento de la partícula siempre y cuando el movimiento produzca un cambio en la fase $\phi_j(t)$, permitiendo medir valores de movilidad electroforética pequeñas.

En el caso donde la radiación es dispersada por N partículas, a la expresión (3.2.20) se le tiene que añadir una sumatoria hasta N partículas para obtener la fase de la luz dispersada total $\phi(t)$, que se puede descomponer a su vez en una contribución colectiva y otra difusiva:

$$\phi(t) = \phi_c(t) + \phi_d(t) \quad (3.2.21)$$

Donde podemos relacionar la contribución colectiva con el campo eléctrico y la movilidad electroforética de la siguiente manera:

$$\frac{d\phi_c(t)}{dt} = \mu_e \vec{q} \cdot \vec{E}(t) \quad (3.2.22)$$

Sin embargo, trabajar directamente con la suma de las fases dispersadas $\phi(t)$ puede resultar contraproducente ya que puede producir efectos de interferencia destructiva que afecte a la medida. Por lo que, en la práctica, la velocidad media de las partículas se deduce ponderando la amplitud de los cambios de fase. Para ello se utiliza la diferencia de fase ponderada en amplitud (AWPD), también conocido como cambio de fase tangencial [89,92]:

$$Q(t) - Q(0) = \int_0^t I_0(t') \frac{d\phi(t')}{dt} dt' \quad (3.2.23)$$

El AWPD, de forma análoga a la diferencia de fase para la dispersión simple, está directamente relacionado con la velocidad media de las partículas. Si separamos el AWPD en un término colectivo más otro difusivo se puede escribir:

$$Q(t) - Q(0) = [Q_c(t) - Q_c(0)] + [Q_d(t) - Q_d(0)] \quad (3.2.24)$$

Que teniendo en cuenta las ecuaciones (3.2.22) y (3.2.23):

$$Q(t) - Q(0) = \mu_e \int_0^t I_0(t') \vec{q} \cdot \vec{E}(t') dt' + \int_0^t I_0(t') \frac{d\phi_d(t')}{dt} dt' \quad (3.2.25)$$

La segunda integral de esta ecuación consiste en la suma de las contribuciones individuales de cada partícula a la fase de la radiación difusiva dispersada. Como la fuente de la radiación posee una distribución de intensidad Gaussiana, se puede aproximar esta contribución difusiva también a una distribución de Gauss centrada en el cero al tratarse de sucesos no correlacionados. Por lo tanto, si se realiza el promedio de la AWPD en un número significativo de ciclos, la integral del término difusivo tendería a cero y queda:

$$\langle Q(t) - Q(0) \rangle = \mu_e \langle I_0 \rangle \vec{q} \cdot \int_0^t \vec{E}(t') dt' \quad (3.2.25)$$

De la ecuación (3.2.25) se puede obtener directamente la movilidad electroforética μ_e y su signo de las partículas coloidales a partir de medidas del promedio de la función AWPD, ya que el campo eléctrico aplicado es conocido y el promedio de la intensidad se obtiene directamente de la señal detectada.

3.3 Balanza de Langmuir

La Balanza de Langmuir es una técnica experimental que permite formar y comprimir monocapas de moléculas anfifílicas en una interfaz dada, midiendo la presión superficial respecto del área superficial disponible. En este trabajo se trabaja siempre en interfaz aire-agua por lo que las monocapas se forman con moléculas que se poseen actividad superficial en el agua, como moléculas anfifílicas o partículas coloidales que se adsorben a esta interfase.

El objetivo de esta técnica es estudiar las propiedades superficiales de la monocapa formada por las moléculas depositadas mediante compresión lateral por barreras de la interfase. En la Fig. 3.3.1 se puede observar la Balanza de Langmuir del departamento de Física Aplicada que se ha utilizado para realizar los experimentos. Este dispositivo se encuentra en el laboratorio de superficie e interfases situado en el sótano de la Facultad de Ciencias sobre una mesa anti-vibratoria para minimizar las influencias de perturbaciones externas al sistema.

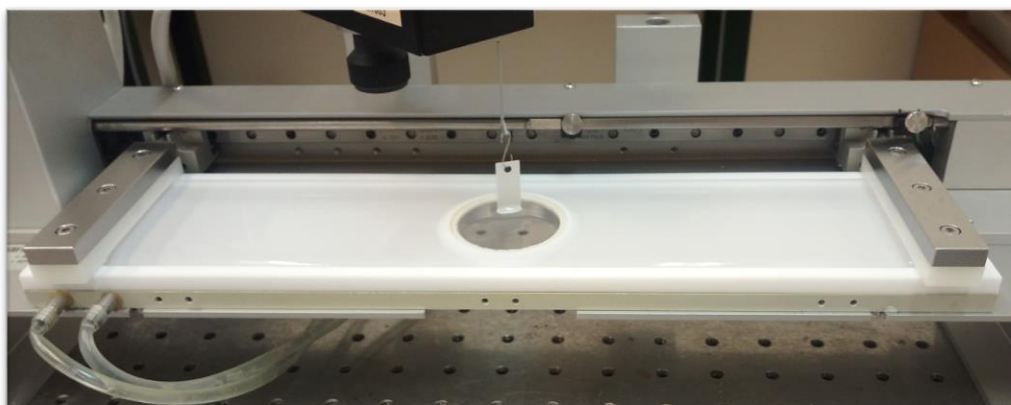


Fig. 3.3.1: Balanza de Langmuir del departamento de Física Aplicada, laboratorio de superficies e interfases.

Esta balanza posee un área superficial disponible de 244.5 cm^2 , que se va reduciendo a lo largo de la compresión, controlando en todo momento la densidad así como el área por molécula (A) de la monocapa en el experimento. Tanto las barreras como el canal donde se deposita la subfase están hechas de teflón politetrafluoroetileno, un material prácticamente inerte a productos químicos e hidrófobo por lo que no interacciona con la subfase de agua ni con las moléculas que se depositan en la interfase. Aparte, el sistema está conectado mediante canales de líquido anticongelante a un termostato que permite controlar la temperatura del sistema.

La deposición de las muestras se realiza mediante una microjeringa de Hamilton® o una micro-pipeta (solo disolución acuosa) en función de la muestra. Las propiedades superficiales de la monocapa se estudian obteniendo la presión superficial π , que se define como la diferencia entre la tensión superficial de la subfase pura γ_0 y la tensión superficial medida γ :

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (3.3.1)$$

La presión superficial π se mide con un sistema de plato de Wilhelmy (KSV) con una sensibilidad del 0.1 mN m^{-1} y todo el sistema se encuentra protegido por una cubierta de metacrilato transparente abatible para evitar la deposición de polvo u otros elementos externos. En la Fig. 3.3.2 se muestra un esquema del método de Wilhelmy.

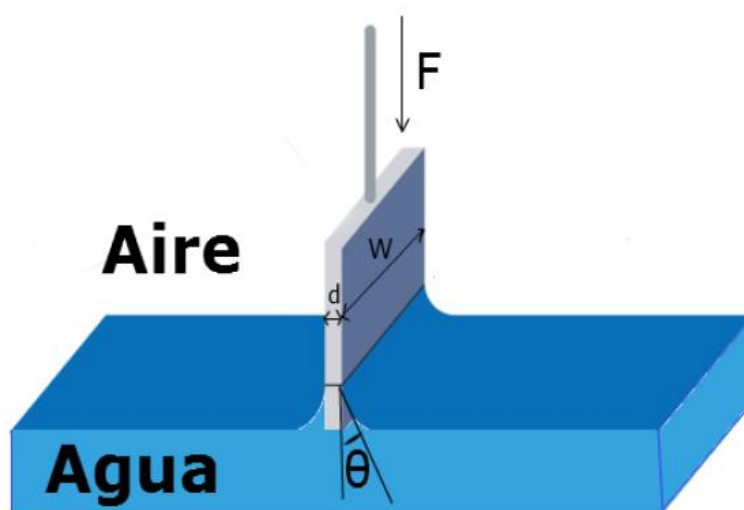


Fig. 3.3.2: Esquema del plato situada en la interfaz aire-agua del método de Wilhelmy.

Este método consiste en un plato, que puede ser de platino o papel filtro (en nuestro dispositivo usamos papel filtro) con dimensiones conocidas, parcialmente sumergido en la subfase acuosa conectado a un dinamómetro. El plato sumergido detecta la fuerza F hacia abajo ejercida por el menisco del líquido que humedece a dicho plato y la tensión superficial γ se relaciona con esta fuerza F mediante la ecuación de Wilhelmy [93]:

$$\gamma = \frac{F}{l \cos(\theta)} \quad (3.3.2)$$

Donde θ es el ángulo de contacto del menisco, y l la suma de todas las longitudes del plato que está en contacto con la superficie del agua, que en el caso de la Fig. 3.3.2 $l = 2d + 2W$.

Por lo tanto, para obtener la presión superficial π de la monocapa se pone a cero la presión superficial en agua, y se mide durante el experimento los valores de la tensión superficial del sistema γ con la ecuación (3.3.2).

Los resultados de la presión superficial π en función del área disponible de la superficie A se conocen como isothermas de compresión $\pi - A$, que está determinado por las interacciones moleculares en la interfase. Consecuentemente, las isothermas de compresión $\pi - A$ permite estudiar las estructuras moléculas que determinan estas interacciones, así como las interacciones laterales de las moléculas en el interfase. En la Fig. 3.3.3 se muestra una isoterma de compresión estándar para una monocapa formada por moléculas de DPPC en la interfaz aire-agua a 24°C [94,95].

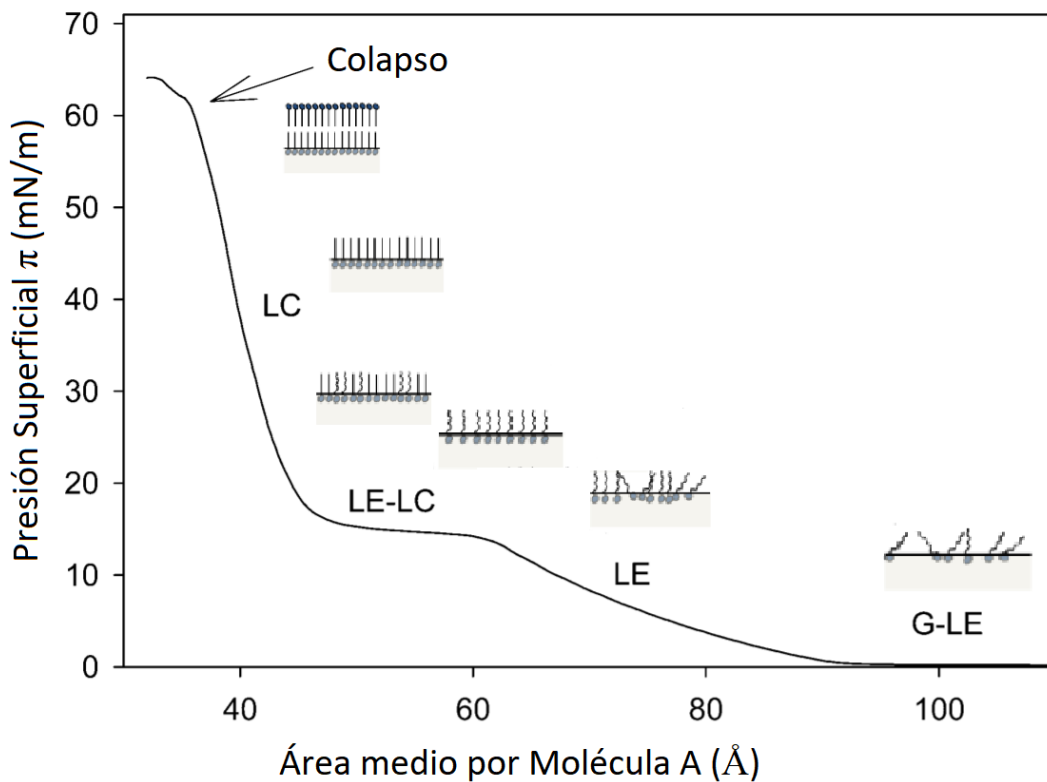


Fig. 3.3.3. Isotherma de compresión $\pi - A$ del DPPC a 24°C donde se observan los distintos estados de la monocapa.

En estas isothermas se pueden distinguir distintos estados de la monocapa en función de la presión superficial y del área medio por partícula característico de cada sistema. Para áreas superficiales altas, la presión superficial tiende a cero. En esta zona, las moléculas

de la superficie no interaccionan entre ellas. Este estado inicial se conoce como fase gaseosa (G) o coexistencia de fase entre gaseoso-líquido expandido (G-LE). Al comprimir el sistema las moléculas se van acercando y empiezan a interaccionar entre ellas, aumentando la presencia superficial de moléculas que se encuentran en un estado correspondiente a la fase de líquido expandido (LE). Dependiendo del sistema, se puede observar una segunda fase de coexistencia entre líquido expandido-líquido condensado (LE-LC), caracterizando por una zona constante de presión superficial. En los estados finales se encuentra la fase de líquido condensado (LC) que se caracteriza por un aumento brusco de la presión superficial debido a las fuertes interacciones entre las moléculas. Finalmente, cuando se supera cierta presión superficial se produce el colapso de la monocapa, donde los valores de π empiezan a fluctuar arbitrariamente debido a la formación de multicapas, o desorción de las moléculas hacia la fase acuosa.

A partir de la isoterma, también se puede obtener la elasticidad de Gibbs (ε_0) con la siguiente ecuación:

$$\varepsilon_0 = -A \left(\frac{\partial \pi}{\partial A} \right)_T \quad (3.3.3)$$

Esta ecuación nos permite obtener un valor de ε_0 en función de la π y nos da información de la compresibilidad de la monocapa [96].

Al ser experimentos con superficies y sistemas coloidales, se tiene que tener extremo cuidado con la limpieza de los dispositivos ya que cualquier mínima cantidad de agentes externos puede alterar los resultados de las medidas de las isotermas de compresión de forma significativa.

Por lo tanto, antes de empezar cualquier experimento se debe limpiar el sistema primero con jabón 10% Micro-90®, y a continuación enjuagar secuencialmente con propanol, agua destilada y varios ciclos de agua deionizada Milli-Q. Por último, para comprobar que no hay agentes contaminantes se comprime la subfase de agua pura hasta obtener un valor de presión superficial menor de 2 mN m⁻¹ durante todo el ciclo de compresión.

Tras depositar la muestra en la superficie se debe dejar un tiempo de evaporación, y posteriormente se comprime la superficie mediante una compresión uniaxial simétrica a una velocidad constante. Tras la compresión se obtiene la isoterma $\pi - A$, que nos da toda la información de las interacciones moleculares y estructurales de la monocapa.

El número de medidas necesarias depende en la variabilidad de los resultados y las desviaciones estándares obtenidas.

3.4 Microscopio de Ángulo de Brewster (BAM)

El Microscopio de Ángulo de Brewster Micro-BAM, modelo KSV NIMA Micro-BAM (Biolin Scientific, Finlandia), fue subvencionado por los proyectos (MAT2015-63644-C2-2-R) y (FIS2016-80087-C2-1-P) del departamento de Física Aplicada, y uno de los primeros objetivos de esta tesis es poner a punto este dispositivo en el laboratorio de superficies para trabajar de forma paralela con la balanza de Langmuir. En la Fig. 3.4.1 se muestra el dispositivo de Micro-BAM junto con la balanza de Langmuir.

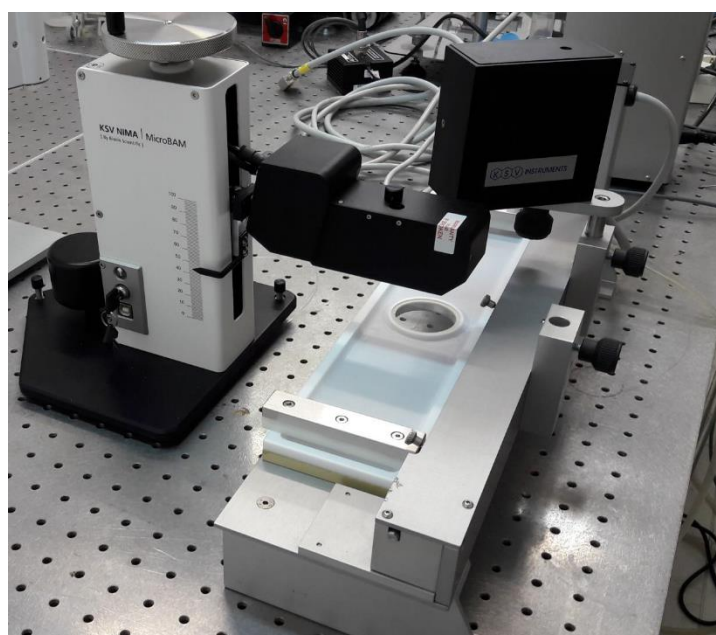


Fig. 3.4.1. Micro-BAM que trabaja en paralelo con la Balanza de Langmuir.

En la Fig. 3.4.2 se muestra las partes que posee el dispositivo. Como se puede observar, este dispositivo está compuesto por una cabeza donde se encuentra el láser, de 50 mW de potencia con una longitud de onda de 659 nm, y la cámara con una resolución espacial de 12 μm . Mientras que en el cuerpo tiene una rueda mecánica de nivel que ajusta la altura de la cabeza, el interruptor del láser y la conexión USB al ordenador.

El funcionamiento del dispositivo consiste en la emisión del láser polarizada paralela al plano de incidencia con un ángulo de incidencia de Brewster θ_B para la interfaz aire-agua (aproximadamente de 53°). El ángulo de Brewster θ_B se define como el arcotangente de la razón entre los índices de refracción n_1 y n_2 , respectivamente:

$$\theta_B = \arctan\left(\frac{n_2}{n_1}\right) \quad (3.4.1)$$

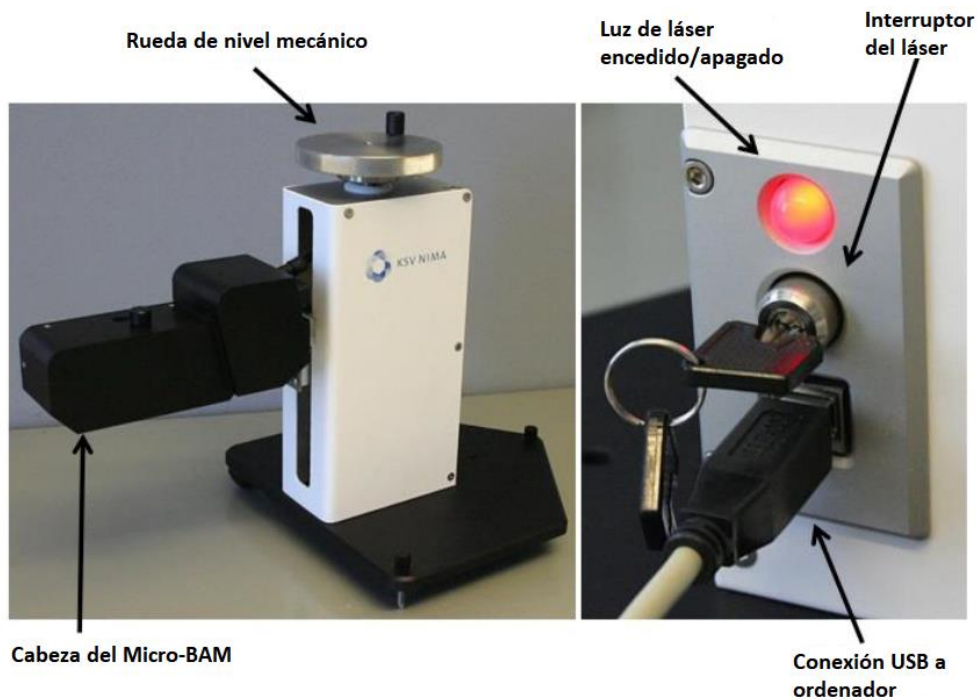


Fig. 3.4.2. Partes que componen el modelo KSV NIMA Micro-BAM.

Bajo la condición de Brewster solo la componente perpendicular al plano de incidencia de la luz incidente es reflejada, consecuentemente en el caso de interfaz pura no hay luz reflejada de la superficie y se recoge una imagen completamente oscura. Al formar una monocapa o película en la superficie del agua la condición de Brewster desaparece y se recoge luz reflejada en la cámara [97]. La Fig. 3.4.3 muestra un esquema del funcionamiento.

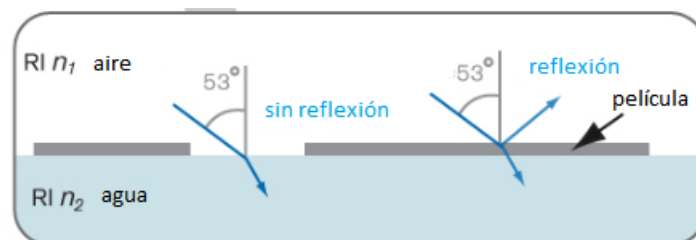


Fig. 3.4.3. Principio de la condición de Brewster en la interfaz de aire-agua [98].

Con esta técnica se puede observar en directo el comportamiento de la monocapa, la homogeneidad, transición y separación de fases, tamaño de dominios, formas y empaquetamiento de las moléculas en la superficie.

Para poder obtener y guardar las imágenes obtenidas con el Micro-BAM se necesita instalar el software del dispositivo en el ordenador donde previamente está ya instalado el software de la balanza de Langmuir. Para ello, se necesita conectar el Micro-BAM con el ordenador desde el puerto USB e instalar el software siguiendo los pasos que te indica el instalador.

Tras la instalación, se abre la aplicación 'BAM', cuya interfaz se muestra en la Fig. 3.4.4.

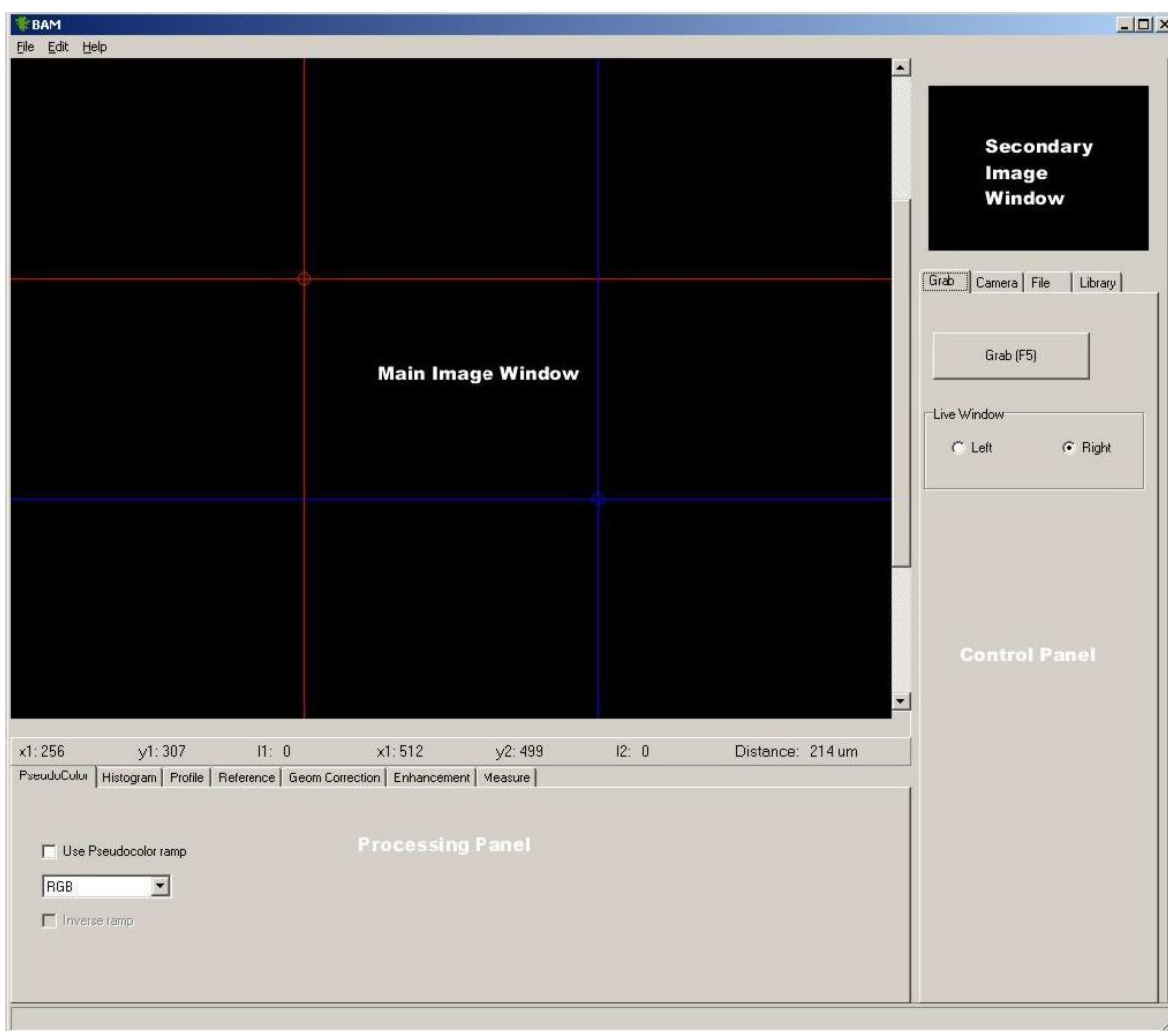


Fig. 3.4.4. Interfaz de la aplicación 'BAM', que permite controlar el funcionamiento del Micro-BAM.

Esta interfaz consiste en una ventana de imagen principal donde se muestra la imagen recogida de la cámara en tiempo real, y una ventana de imagen secundaria donde

muestra las imágenes que se van guardando en el experimento. También tiene un panel de procesamiento donde se pueden controlar los parámetros de la cámara y la imagen, y un panel de control que permite tomar capturas de la cámara y guardarlo en la memoria, así como asociarlo a un experimento de la Balanza de Langmuir.

Por último, antes de empezar un experimento con el Micro-BAM es muy importante realizar un calibrado correcto del sistema para tener la condición de Brewster. Para ello, se utilizan los dos tornillos de la base del dispositivo (Fig. 3.4.2) para regular la orientación, y observando el nivel que se encuentra en la parte superior de la cabeza (Fig. 3.4.5).

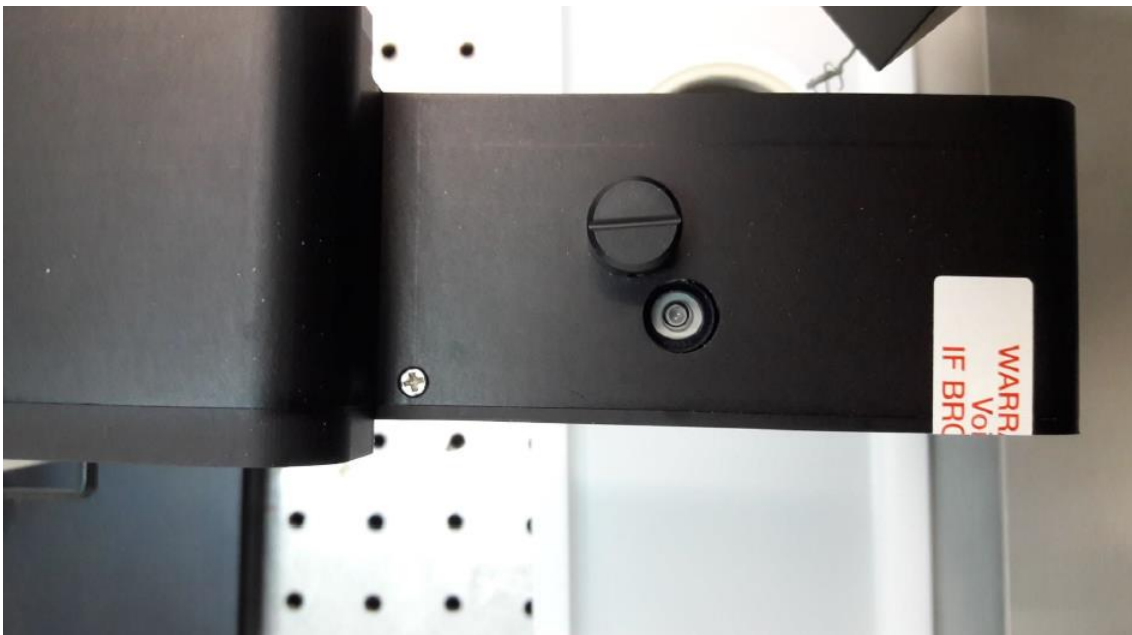


Fig. 3.4.5. Nivel situado en la parte superior de la cabeza del Micro-BAM.

Aparte, para un calibrado más fino, se debe hacer el ajuste del nivel junto con la imagen en directo que capta la cámara, sabiendo que en la interfaz pura de aire-agua, bajo la condición de Brewster, la imagen tiene que ser totalmente oscura.

Debido a que el canal de la balanza de Langmuir tiene poca profundidad, la cámara puede capturar luz reflejada por la superficie del canal y no de la interfase. Para solucionar este problema se utiliza una placa de vidrio negro, que viene con el dispositivo, la cual adsorbe el 99% del láser transmitido que se coloca en el canal de la balanza dentro de la subfase de agua como se muestra en la Fig. 3.4.6.

Hay que tener en cuenta que existen pequeñas variaciones del índice de refracción de ambos medios a distintas temperaturas, por lo que el ángulo de Brewster θ_B varía,

haciendo que la inclinación del dispositivo cambie ligeramente en función de la temperatura. Sin embargo esto se puede arreglar fácilmente ajustando finamente con la imagen en directo del Micro-BAM en interfaz pura.

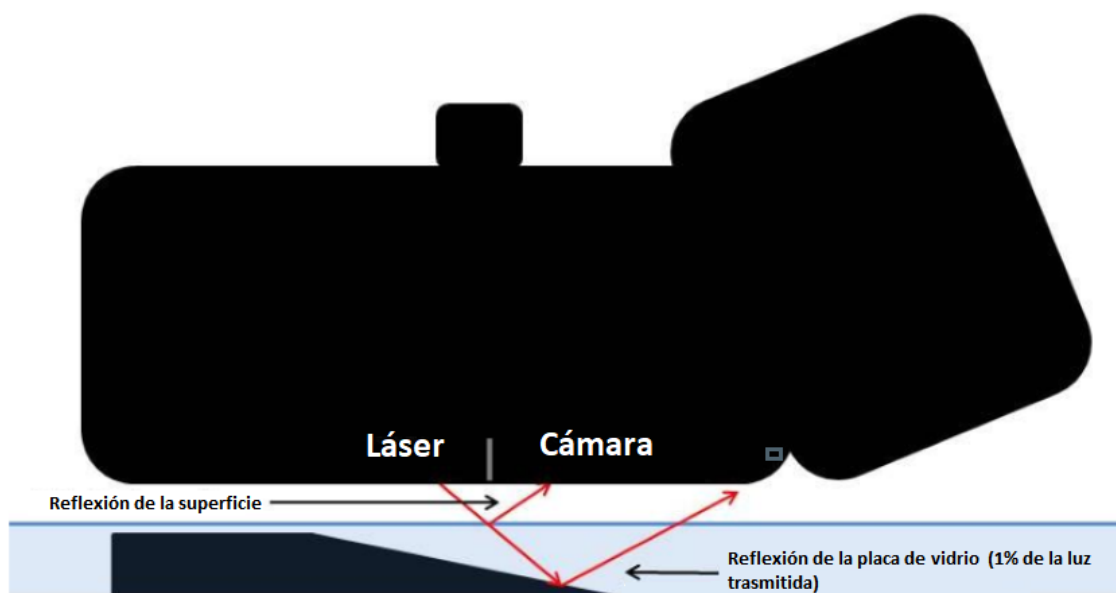


Fig. 3.4.6. Posición de la placa de vidrio negro para absorber el 99% de la luz transmitida en la interfaz aire-agua.

Finalmente, para demostrar el correcto funcionamiento del dispositivo se realizaron en primer lugar pruebas con el ácido pentadecanoico ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$) como sistema modelo, muy estudiado con las técnicas de balanza de Langmuir y el BAM [99,100]. Para ello se midió la isoterma de compresión junto con varias imágenes de Micro-BAM a distintas presiones superficiales y estados de la monocapa. En la Fig. 3.4.7 se muestran 4 imágenes obtenidas con Micro-BAM, una para cada fase de la monocapa, donde se puede apreciar claramente los cambios de dominio, el aumento del grosor de la monocapa y la variación estructural de la monocapa del ácido pentadecanoico, concordando con los resultados de la bibliografía [99,100].

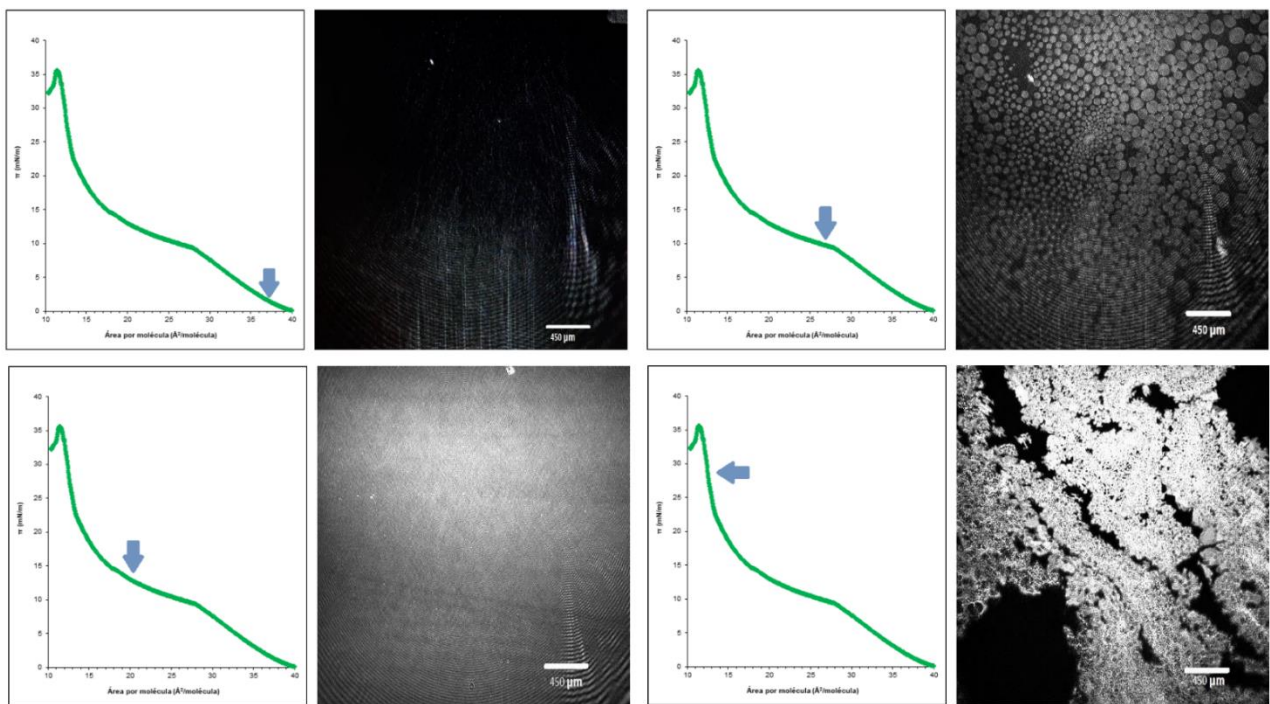


Fig. 3.4.7. Isotherma de compresi3n e im3genes de Micro-BAM del 3cido pentadecanoico a distintas presiones superficiales y fases de la monocapa.

3.5 Tensiómetro de Gota Pendiente

El tensiómetro de Gota Pendiente permite realizar medidas muy precisas de la tensión interfacial en las interfases líquido-líquido o líquido-aire. Esta técnica presenta diversas ventajas frente a otros métodos para medir la tensión superficial, principalmente porque se requiere una cantidad mucho menor de muestras para realizar los experimentos, mejorando el control de las condiciones experimentales y la reproducibilidad de las medidas. El dispositivo de Gota Pendiente en el departamento de Física Aplicada que se ha utilizado en esta Tesis Doctoral, ha sido diseñado y ensamblado íntegramente en la UGR. Se trata de un dispositivo automático controlado por los programas DINATEN y CONTACTO, también desarrollados en la UGR por el Profesor Antonio Holgado Terriza [20].

La técnica del tensiómetro de Gota Pendiente se basa en el análisis de la forma de una gota colgando de un capilar. La forma de las gotas formadas en el capilar poseen una curvatura característica que está en función de la gravedad g y la tensión superficial, siguiendo la ecuación de Young-Laplace:

$$\Delta P = \gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (3.5.1)$$

Siendo ΔP la diferencia de presión en la interfaz y R_1, R_2 los radios principales de curvatura. Para el caso de la gota pendiente, suponiendo que solo interfiere la fuerza gravitatoria, ΔP es una función lineal de la elevación z de la gota y la diferencia de presión en el vértice u origen ΔP_0 :

$$\Delta P = \Delta P_0 + (\Delta \rho)gz \quad (3.5.2)$$

Para obtener la tensión superficial γ de la ecuación de Young-Laplace, es necesario primero obtener el perfil de la gota pendiente mediante una cámara. En nuestro laboratorio de superficies se utiliza una video cámara Pixelink® con resolución de 1280x1024 píxeles con 256 niveles de gris. Y segundo, resolver la ecuación de Young-Laplace encontrando el perfil teórico que mejor se ajuste al perfil de la gota obtenida de la cámara.

Para resolver la ecuación de Young-Laplace se necesita primero definir los dos radios principales de curvatura R_1, R_2 . Estos dos radios se pueden definir en cualquier punto

de una superficie curvada definiendo la normal de este punto respecto de la superficie. En general, la línea de intersección entre un plano (que contenga la normal) y la superficie, está curvada, lo que genera el primer radio de curvatura R_1 . El segundo radio de curvatura R_2 se puede obtener haciendo pasar otro plano que contenga la normal y siendo perpendicular al primer plano [101]. En la Fig. 3.5.1 se muestra el caso para cuando se escogen los radios principales de curvatura R_1 , R_2 en el punto (x_i, z_i) .

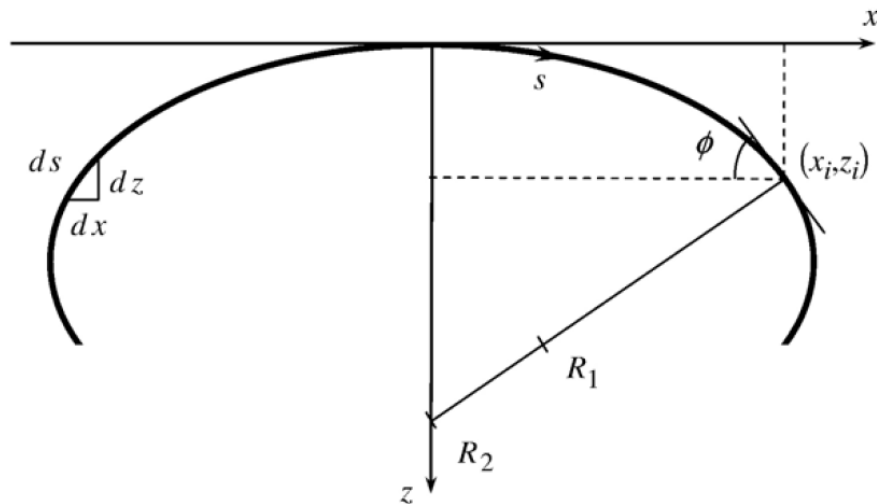


Fig. 3.5.1. Definición de las coordenadas de una superficie curvada de una interfaz entre dos fluidos en el plano xz. Los radios de curvatura principales R_1 , R_2 se escogen en el punto (x_i, z_i) , donde ϕ es el ángulo de la tangente a la superficie en este punto y s es la longitud de arco. R_1 es el radio de curvatura en el plano xz y R_2 es el radio de curvatura en el plano perpendicular al plano xz [101].

La curvatura K de una superficie curva es la inversa del radio de curvatura R , que se define como el límite cuando la variación de longitud de arco Δs tiende a cero para una variación del ángulo tangente $\Delta\phi$ entre la Δs .

$$K = \frac{1}{R} = \lim_{\Delta s \rightarrow 0} \frac{\Delta\phi}{\Delta s} \quad (3.5.3)$$

Observando la Fig. 3.5.1 se puede ver que los radios de curvatura principales R_1 , R_2 se definen como:

$$K_1 = \frac{1}{R_1} = \frac{d\phi}{ds} \quad (3.5.4)$$

$$K_2 = \frac{1}{R_2} = \frac{\text{sen } \phi}{x} \quad (3.5.5)$$

Debido a la simetría axial en el eje z de la interfase, ambos radios de curvatura en el vértice son equivalentes.

$$\frac{1}{R_1} = \frac{1}{R_2} = \frac{1}{R_0} = K_0 \quad (3.5.6)$$

Siendo K_0 la curvatura en el vértice. Con la ecuación (3.5.1) sabemos que la diferencia de presión en el vértice de la curvatura es:

$$\Delta P_0 = 2K_0\gamma \quad (3.5.7)$$

Con estas las ecuaciones (3.5.4), (3.5.5) y (3.5.7) se puede reescribir la ecuación (3.5.1) como:

$$\frac{d\phi}{ds} = 2K_0 + \frac{(\Delta\rho)gz}{\gamma} - \frac{\text{sen } \phi}{x} \quad (3.5.8)$$

Esta última ecuación junto con las relaciones geométricas:

$$\frac{dx}{ds} = \cos \phi \quad (3.5.9)$$

$$\frac{dz}{ds} = \text{sen } \phi \quad (3.5.10)$$

Forma un conjunto de ecuaciones diferenciales de primer orden para x , z y ϕ en función de la longitud de arco s , con las siguientes condiciones de contorno:

$$x(0) = z(0) = \phi(0) = 0 \quad (3.5.11)$$

$$\left(\frac{d\phi}{ds}\right)_{s=0} = K_0 \quad (3.5.12)$$

Este conjunto de ecuaciones diferenciales junto con las condiciones de contorno, y valores dados de K_0 se pueden resolver mediante métodos numéricos, como el método de Newton-Raphson y el método de Levenberg-Marquardt [101–103]. Como resultado se obtiene el valor de la tensión superficial γ , así como el volumen V y el área superficial A de la gota.

Una configuración experimental para el tensiómetro de Gota Pendiente está compuesta de varios componentes. Un sistema de iluminación que se basa en una fuente de luz y un difusor para iluminar la gota; un componente de adquisición de imagen como la cámara; la configuración de control ambiental; dispositivo de control de flujo de líquido, la configuración antivibración; y la unidad de procesamiento.

La configuración de control ambiental se consigue con una cubeta de vidrio (Hellma[®], donde se forma la gota) insertado dentro de una célula, con temperatura controlada, encima de un microposicionador de tres ejes, lo que permite el manejo de la configuración en cualquier dirección. El dispositivo de control de flujo de líquido es un microinyector o una jeringa que empuja la solución o el líquido, manual o automáticamente, a una velocidad de flujo especificada en un capilar de teflón hasta que se forma una gota colgante en la punta. Finalmente, la configuración de antivibración incluye todos los componentes del instrumento para evitar vibraciones que pueden afectar la medición.

La unidad de procesamiento es un dispositivo informático que permite la planificación, control y seguimiento de todo el experimento con la ayuda de un programa integrado de Windows (Dinaten[®]) [20]. Este programa fue implementado por la Universidad de Granada en el departamento de Física Aplicada, la cual incluye la posibilidad de trabajar con el doble capilar coaxial y el dispositivo de intercambio múltiple de subfase.

El sistema de doble capilar coaxial es una configuración en la que el capilar estándar se ha sustituido por dos capilares coaxiales de modo que los capilares externo e interno están conectados de forma independiente a dos microinyectores. Cada microinyector puede funcionar de forma independiente, lo que permite la modificación del área interfacial cambiando el volumen de la gota, así como el intercambio del contenido de la subfase [20].

Por lo tanto, el intercambio de subfase de la gota se puede llevar a cabo extrayendo simultáneamente líquido del capilar exterior e inyectando la nueva solución a través del interior. Este procedimiento permite un reemplazo en subfase de la fase global sin perturbación de la interfaz, preservando el volumen de la gota y el área de superficie durante todo el intercambio de subfase. La adición del sistema de doble capilar coaxial y el doble microinyector en el tensiómetro de Gota Pendiente permite la realización de estudios cinéticos no invasivos de adsorción de bicapas, desorción de moléculas anfifílicas solubles y penetración en películas adsorbidas y reacciones interfaciales [104–106].

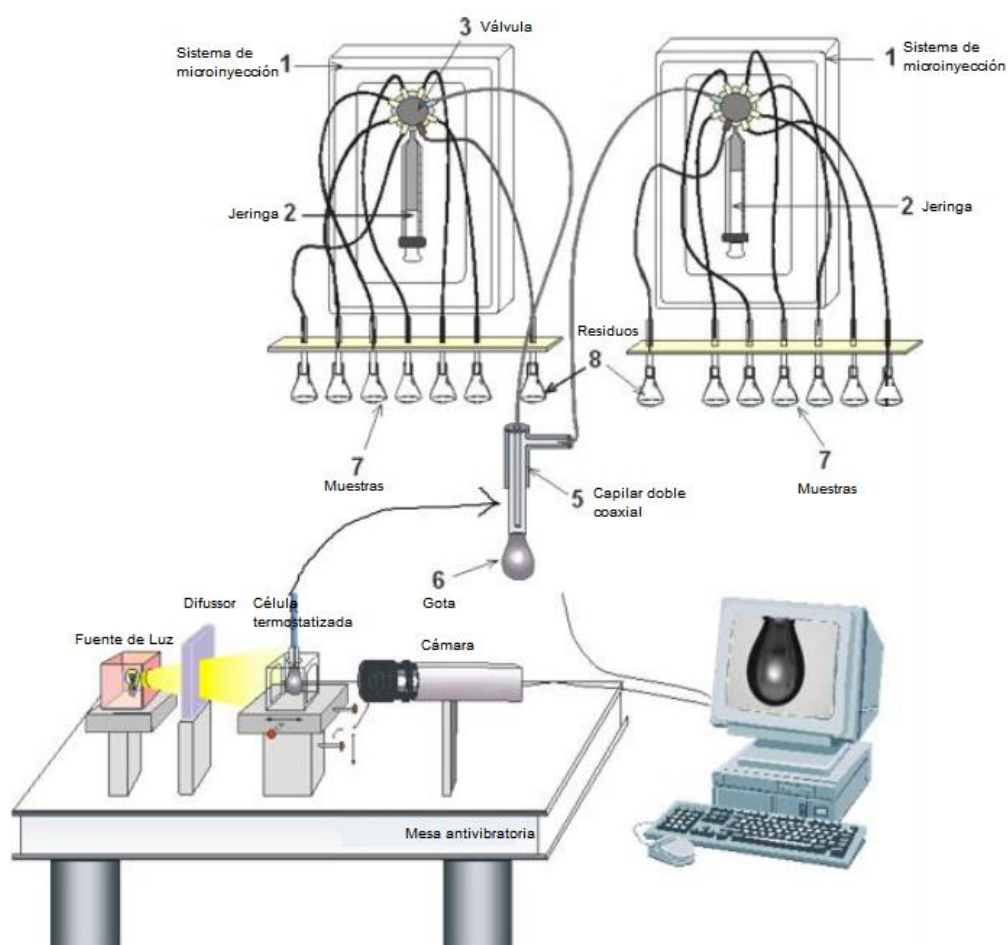


Fig. 3.5.2. Esquema del tensiómetro de Gota Pendiente y el dispositivo de intercambio múltiple de subfase.

El OCTOPUS es la evolución del dispositivo de Gota Pendiente con intercambio de la subfase a un intercambio múltiple. El dispositivo de intercambio múltiple de subfase OCTOPUS consta de dos sistemas de microinyección independientes (bombas de jeringa PSD/3, Hamilton) con una válvula donde cada una de las dos jeringas está conectada a

8 canales independientes. Los dos capilares coaxiales se conectan a los dos canales de los microinyectores de válvula de 8 puertos. Cada jeringa puede funcionar de forma independiente y permitir el intercambio automático, no invasivo y completo de la subfase de la gota cambiando varias veces el contenido de la subfase. Esta implementación permite un estudio más detallado de multicapas, desorción e interacciones superficiales [107]. En la Fig. 3.5.2 se muestra un esquema del tensiómetro de Gota Pendiente junto con el dispositivo de intercambio múltiple de subfase.

Por otro lado, El tensiómetro de Gota Pendiente también permite estudiar la reología dilatacional del sistema aplicando perturbaciones oscilatorias a la superficie, que consisten en inyectar y extraer volumen de la subfase de la gota, mientras se mide la tensión superficial. Midiendo la variación de la tensión superficial debido a esta deformación en el área de la gota se puede calcular el módulo dilatacional (E) de la capa superficial, que es una variable compleja definida por:

$$E = E' + iE'' = \varepsilon + i\nu\eta \quad (3.5.13)$$

Siendo E' el módulo de almacenamiento que es equivalente a la elasticidad de la capa interfacial ε , y E'' el módulo de pérdida que es el producto de la viscosidad η y la frecuencia angular ν de la oscilación aplicada en la inyección y extracción [108].

Al igual que la balanza de Langmuir, la limpieza del dispositivo experimental es fundamental por lo que antes de realizar cada experimento con el Tensiómetro de Gota Pendiente se debe realizar un proceso de limpieza de todos los capilares primero con propanol y con agua Milli-Q 50 ciclos. La ausencia de impurezas se determina midiendo la tensión superficial de una gota de agua Milli-Q hasta obtener una tensión superficial 72 mN m^{-1} a 20°C .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 4: Caracterización Interfacial y en Disolución de Microgeles de PNIPAM

Las partículas de microgel poseen una densidad de polímeros entrecruzados que varía a lo largo de la partícula, desde un núcleo densamente reticulado hasta una corona débilmente reticulada (Fig.3.1.1). Por lo tanto, las partículas de microgeles poseen cierta deformabilidad, con una capa exterior que debería ser más deformable, mientras que el núcleo, en menor medida, es deformable hasta cierto punto. Además, estas partículas coloidales adsorbidas en la interfaz proporcionan un medio anisótropo que afecta a la morfología y a las interacciones entre las partículas de microgel. Por consiguiente, se espera que la actividad superficial de los microgeles de PNIPAM dependa de sus propiedades estructurales determinadas por la temperatura y la electrostática del sistema que parecen estar interconectados de una manera compleja. Geisel et al. utilizaron monocapas de microgeles de PNIPAM cargados en la interfaz de aceite-agua para estudiar la influencia de la carga en la compresión lateral [109]. En particular, fijaron la temperatura a 20°C y analizaron las isothermas de compresión resultantes de microgeles de poli (N-isopropilacrilamida-co-ácido metacrílico) (P(NIPAM-co-MAA)) con diferente densidad de carga y arquitectura. Como resultado, observaron que los microgeles cargados se comprimían más fácilmente que los microgeles no cargados, ya que las isothermas de compresión de los microgeles cargados se desplazaban a áreas normalizadas más pequeñas. Este fenómeno se justificó en términos de la diferencia de tamaño efectiva de los microgeles en los estados cargados y no cargados [109].

Por el contrario, Picard et al. usó microgeles de poli (N-isopropilacrilamida-co-ácido acrílico (PNIPAM-co-AA) para mostrar que la carga no afecta a las interacciones entre las partículas en la interfaz y tampoco a la dinámica de adsorción de las partículas de microgel hacia la interfaz aire-agua para una temperatura fija de 25°C [44]. Mediante el estudio del efecto de la adición de sal y la variación del pH en los microgeles de PNIPAM-co-AA, obtuvieron un efecto menor de la electrostática sobre las propiedades interfaciales. Muy recientemente, Tatry et al. examinaron la cinética de adsorción de microgeles PNIPAM-co-AA en interfaces de fluido-líquido a temperatura ambiente, con el fin de comprender el papel de la electrostática y la deformabilidad [110]. Estos autores evidenciaron la existencia de una concentración crítica por encima de la cual los microgeles se adsorben de manera espontánea. Además, demostraron que esta concentración crítica depende de la electrostática, y es mayor para los microgeles cargados. Es importante resaltar que, en todos los estudios mencionados, los autores fijaron la temperatura para enfocarse en el efecto de la carga. Por el contrario, el efecto

de la temperatura sobre la actividad interfacial y la respuesta mecánica de los microgeles es un estudio bastante menos analizado en la bibliografía y se requiere de mayor número de resultados experimentales en este aspecto.

En relación a la estabilidad de emulsiones Mickering, Ngai et al. han demostrado que el estado más cargado e hinchado de los microgeles adsorbidos en la interfaz aceite-agua puede mejorar la estabilidad de la emulsión[22]. En general, la estabilidad de las emulsiones que utilizan microgeles de PNIPAM disminuye por encima de la VPTT [111,112]. Monteux et al. afirman que esta desestabilización de la emulsión con la temperatura se debe a sutiles reordenamientos de los microgeles en la interfaz de aceite-agua y no a una importante desorción de partículas [113]. Por otro lado, Maestro et al. señaló que el tamaño vertical de las monocapas de PNIPAM en la interfaz de aire-agua disminuye a medida que aumenta la temperatura por encima de la VPTT. Según estos autores, este efecto corresponde a las partículas que colapsan en la dirección vertical al expulsar el agua y concentrar el polímero en la interfaz [46]. En este sentido, Matsuoka et al. estudiaron el comportamiento de la compresión de monocapas de microgeles de PNIPAM a diferentes temperaturas cerca de la VPTT, enfocando sus estudios en la nanoestructura del PNIPAM sumergida en la parte acuosa en la interfaz aire-agua [43]. Los resultados que se muestran allí evidencian que el número de moléculas de agua que se encuentra entre las nanoestructuras de PNIPAM se reduce a medida que se aumenta la temperatura. Li et al. demostraron que la cinética de adsorción de microgeles basados en PNIPAM en la interfaz aceite-agua se puede ajustar mediante la temperatura, la densidad de reticulación y la morfología [114]. Más recientemente, Maldonado Valderrama et al. han estudiado el impacto del estado de hinchamiento en la conformación interfacial de monocapas de microgeles iónicos termosensibles basados en Poli (N-vinilcaprolactama) (PVCL) en la interfaz aire-agua [23]. Según estos resultados, la cantidad total de microgeles adsorbidos aumenta a medida que se aumenta la temperatura por encima de la VPTT. En relación con estudios anteriores, se han estudiado por separado los efectos de la carga y la temperatura sobre el comportamiento interfacial de la monocapa de microgeles termosensibles. Por tanto, el papel de la electrostática en la actividad superficial y el hinchamiento de las partículas de microgel permanece bastante inexplorado y, por tanto, poco claro. En consecuencia, en esta parte de la tesis el objetivo es investigar el comportamiento de microgeles cargados basados en PNIPAM en la interfaz aire-agua a diferentes temperaturas y también evaluar el impacto de las interacciones electrostáticas al agregar diferentes concentraciones de electrolito a la fase acuosa. Para ello, las monocapas de microgeles se miden con la balanza de Langmuir y se observan *in situ* mediante el Micro-BAM. Además, estos resultados se relacionarán con medidas del diámetro hidrodinámico y la movilidad electroforética de los microgeles de PNIPAM en disolución.

Comprender el comportamiento de los microgeles iónicos termosensibles en las interfaces requiere abordar la compleja interconexión entre electrostática, temperatura,

interfaces y volumen. De esta manera, se ofrece una nueva perspectiva hacia el desarrollo y uso racional de microgeles en emulsiones y espumas termosensibles.

4.1 Propiedades de los microgeles en Disolución

En la Fig. 4.1.1 se muestran las medidas de tamaño y movilidad electroforética de los microgeles de PNIPAM en agua pura en función de la temperatura del medio. Para realizar estas medidas se diluye la muestra de microgel de PNIPAM a 1:20 y se dispersa en ultrasonido durante 1 minuto para evitar agregaciones. Las medidas son tomadas cada 2°C, desde los 20°C a 50°C, para considerar todos los tamaños que puede adoptar los microgeles. Para cada temperatura se toman 6 medidas independientes considerando la correspondiente desviación estándar para el error experimental.

Generalmente, la naturaleza hidrófila/hidrófoba de los microgeles de PNIPAM es muy dependiente de la temperatura. Para temperaturas por debajo de la VPTT las partículas de microgeles permiten que el agua esté entre sus cadenas poliméricas y adoptan un estado hinchado. Cuando la temperatura aumenta, la naturaleza hidrófoba de los polímeros que conforman los microgeles aumenta también, y para las temperaturas por encima de la VPTT las moléculas de agua que se encontraban entre las cadenas poliméricas del microgel son expulsadas. Consecuentemente, los puentes de hidrógeno dentro de las partículas de microgeles se rompen llevando el sistema al estado colapsado [27,115]. Como se puede observar en la Fig. 1, D_h se mantiene constante para temperaturas por debajo de los 30°C y por encima de los 38°C, y disminuye progresivamente en la VPTT donde las partículas de microgeles pasan del estado hinchado al estado colapsado.

En términos de D_h el tamaño de la partícula decrece de 614 ± 6 nm a 388 ± 6 nm, cuando la temperatura aumenta desde los 30°C a 38°C, respectivamente. Por lo tanto, la VPTT de los microgeles de PNIPAM se encuentra alrededor de los 32°C, que coincide con otros resultados reportados en la bibliografía para microgeles basados en PNIPAM sintetizados de manera similar [44,47,80,116].

Respecto a las medidas de movilidad electroforética que también se muestran en la Fig. 4.1.1, el signo negativo es debido a que el iniciador aniónico KPS utilizado en la síntesis dota a los microgeles de carga efectiva negativa. Observando las medidas es importante notar que el valor absoluto de μ_e incrementa cuando los microgeles colapsan. En concreto, μ_e cambia de $-(2.2 \pm 0.1) \cdot 10^{-8} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $-(4.5 \pm 0.5) \cdot 10^{-8} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, cuando la temperatura incrementa de los 30°C a 38°C, respectivamente. Resultados similares ya se habían obtenido por otros autores quienes lo justificaron en términos de una reducción de la fricción entre las partículas cuando estos colapsan [117].

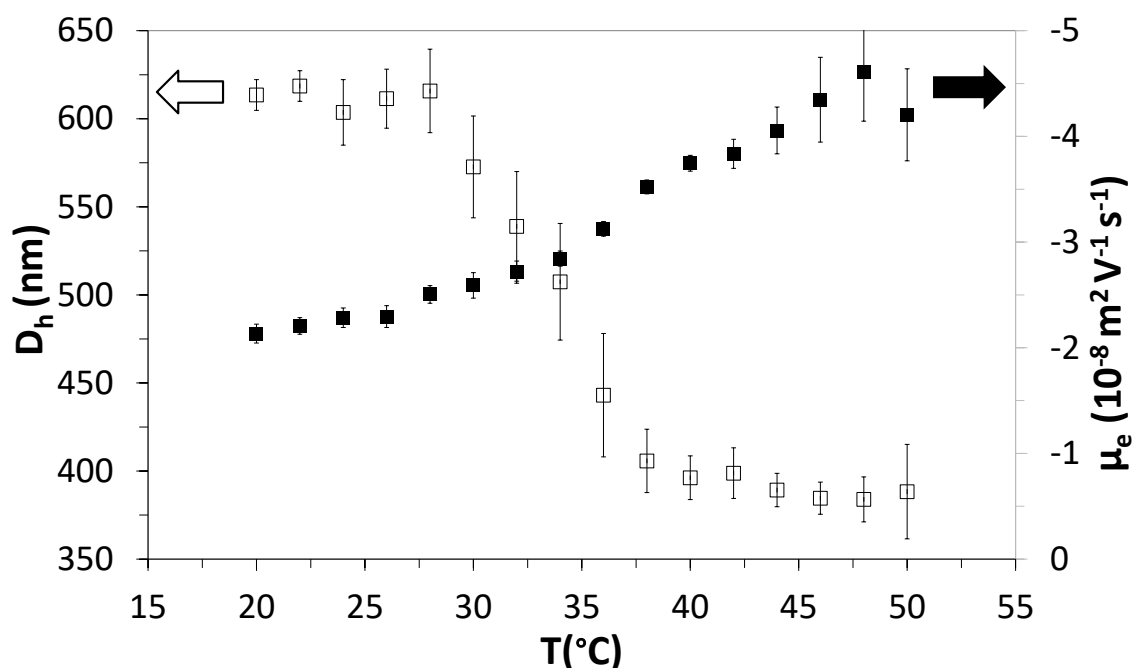


Fig. 4.1.1. Diámetro hidrodinámico (cuadrados huecos) y movilidad electroforética (cuadrados sólidos) del microgel de PNIPAM, en agua ultrapura, en función de la temperatura.

Este comportamiento electrocinético también concuerda con resultados obtenidos mediante simulación de Monte Carlos de nanogel cargados en una disolución libre de iones [118]. Según estas simulaciones, el valor absoluto del potencial electrostático superficial de las partículas (proporcional a μ_e), incrementa con la temperatura en las mismas regiones donde hay un decaimiento del radio del nanogel. Dado que el potencial electrostático es proporcional a la densidad de carga de los microgeles, si el aumento de la temperatura provoca una reducción en el tamaño de las partículas, sus densidades de carga serán mayores. En definitiva, la Fig. 4.1.1 muestra el comportamiento termosensible del tamaño y la carga efectiva de los microgeles en disolución acuosa. Estas características de los microgeles en disolución serán usadas para explicar y relacionar resultados obtenidos en la caracterización interfacial de monocapas de microgeles de PNIPAM cargadas en la interfaz aire-agua.

4.2 Caracterización interfacial

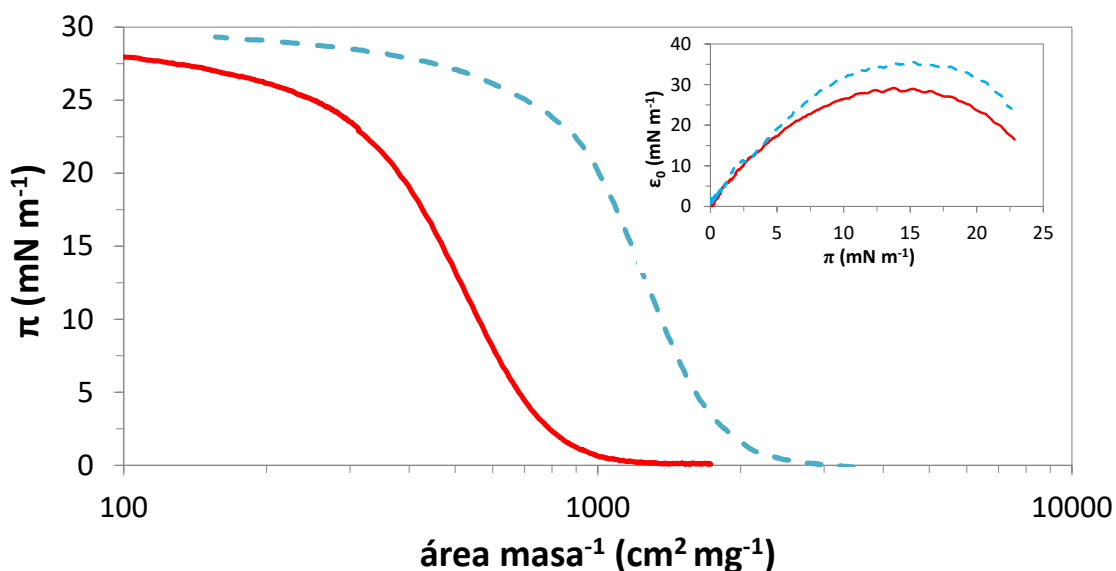


Fig. 4.2.1. Isotermas de compresión y elasticidad de Gibbs del microgel de PNIPAM en la interfaz aire-agua. Estado hinchado a 23°C (línea azul discontinua) y estado colapsado a 50°C (línea roja continua). Las isotermas mostradas son el valor medio de tres experimentos independientes con una desviación estándar <5%.

En la Fig. 4.2.1 se muestran las isotermas de compresión (isoterma $\pi - A$) de los microgeles de PNIPAM obtenidas a temperaturas por debajo y por encima de la VPTT (23°C y 50°C respectivamente). Las muestras se incuban en la temperatura correspondiente durante 15 minutos antes de utilizarse. Después, la suspensión de microgel es cuidadosamente depositada en la superficie del agua utilizando una microjeringa de Hamilton®. Tras un tiempo de equilibrio de 15 minutos, la isoterma de presión superficial-área ($\pi - A$) se registra mediante compresión uniaxial simétrica de las barreras a una velocidad constante de 10 mm min⁻¹. Para obtener toda la isoterma de compresión a cada temperatura, se depositan distintas muestras con masas sólidas diferentes. En concreto, se han depositado suspensiones de partículas de PNIPAM con masa sólida entre 56-420 μg a 23°C, mientras que a 50°C se han depositado 140-420 μg . Para el caso a 50°C se han realizado 3 medidas obteniendo una desviación estándar <2%, mientras que para 23°C se han realizado más repeticiones obteniendo una desviación del 5%.

Las isotermas obtenidas están normalizadas por la masa de microgel de PNIPAM depositada en la superficie, al igual que han hecho otros autores, suponiendo que todas las partículas de microgel se adsorben en la superficie [44,109,119]. De la Fig. 4.2.1 se pueden distinguir tres dominios de interacción en ambas isotermas en función de la

distancia entre partículas en la superficie. En el primer dominio, la π se mantiene próximo a cero y las partículas de microgel no interaccionan entre ellas. En el segundo dominio, la presión superficial π empieza aumentar suavemente y los microgeles se encuentran aplanados en la superficie. La transición desde el primer dominio al segundo dominio está marcado por el incremento de π debido a las interacciones entre las capas poliméricas externas de los microgeles. Al continuar la compresión y reducir la distancia entre partículas de microgel, se aumenta el recubrimiento de la superficie de la monocapa y disminuye el aplanamiento de las partículas de microgel. En el tercer dominio, π se mantiene prácticamente constante mientras se comprime la superficie, indicando que existe prácticamente un recubrimiento constante de la superficie mientras ésta se comprime.

De forma más detallada, las partículas de PNIPAM en el estado hinchado (23°C) muestra un primer dominio de compresión correspondiente a áreas normalizadas mayores de 2500 cm² mg⁻¹ donde las partículas de microgel no interaccionan entre ellas dando valores de π cercanas a cero. El segundo dominio comprende áreas normalizadas desde 2500 cm² mg⁻¹ a 1000 cm² mg⁻¹ y está caracterizado por un aumento suave de π . Según la bibliografía, en este dominio los microgeles de PNIPAM empiezan a interaccionar y forman un sistema cristalino hexagonal en 2D donde los polímeros de la capa externa empiezan a solapar y estar mutuamente interpenetradas [21,47]. Al comprimir más la superficie se llega al tercer dominio, donde se mantiene el sistema hexagonal con un cambio continuo de la constante cristalina (parámetro de red). Finalmente, la isoterma alcanza una zona plana alrededor de 28 mN m⁻¹ de π .

Por otro lado, la isoterma de compresión de las partículas de microgel en el estado colapsado (50°C) tiene una forma completamente similar al obtenido para el estado hinchado. La isoterma de compresión en el estado colapsado aparece desplazado a áreas normalizadas menores y el primer dominio donde no hay interacción entre las partículas de microgel se mantiene hasta áreas normalizadas de 1000 cm² mg⁻¹. El segundo dominio abarca las áreas desde 1000 a 300 cm² mg⁻¹, donde finalmente alcanza el tercer dominio caracterizado por la misma zona plana de 28 mN m⁻¹ de presión superficial. A pesar del desplazamiento significativo de la isoterma a áreas normalizadas menores para los microgeles colapsados, la forma de la isoterma no es afectada por la temperatura como podemos ver en la Fig. 4.2.1. Esto indica que la compresión proporciona dominios de interacción similares en los que tanto los microgeles de PNIPAM hinchados como colapsados, se aplanan en la superficie con los polímeros exteriores que se interpenetran a medida que aumenta la densidad de la superficie. La zona plana de π que se encuentra en el tercer dominio posiblemente se origina por la desorción de segmentos y la formación de bucles en la subfase como se sugiere en la bibliografía [96,109,119]. Este dominio de interacción se mantiene tanto para los microgeles hinchados y colapsados, incluso en los estados de compresión más altos. Esta característica contrasta con los resultados previos obtenidos para microgeles de poli (N-

vinilcaprolactama) (PVCL) cargados donde se observó un segundo aumento en π para microgeles hinchados atribuidos a la interacción de núcleos en un estado más condensado de la monocapa [23]. En este aspecto, otros autores han propuesto de la formación de una segunda fase hexagonal con un parámetro de red menor debido a interacciones atractivas entre núcleos o entre partículas a medida que se vuelven menos deformables.

En nuestro caso, los microgeles de PNIPAM muestran una carga efectiva significativa, especialmente en el estado colapsado (ver Fig. 4.1.1). En consecuencia, creemos que la repulsión electrostática entre partículas de microgel puede estar evitando la formación de una estructura empaquetada cerrada, especialmente en el estado colapsado, en el que prevalece la desorción y la formación de bucles. Además, la forma similar de las isothermas de compresión sugiere que las partículas colapsadas retienen una estructura menor débilmente entrecruzadas tras la adsorción.

Para profundizar en los orígenes del tercer dominio de interacción de las isothermas de compresión en la Fig. 4.2.1, se ha explorado aún más en los mecanismos de desorción de los microgeles en estado hinchado y colapsado mediante la técnica de intercambio de subfase con el tensiómetro de Gota Pendiente y el OCTOPUS. Para realizar este estudio se preparó una muestra madre de PNIPAM disuelta en agua Milli-Q con una concentración de 1 g/L. A partir de esta disolución madre se prepara una disolución más diluida de 0.1 g/L para realizar los experimentos de intercambio de subfase. Estas muestras se dejan un mínimo de 24 horas en la nevera antes de ser utilizados para asegurar la hidratación de los microgeles.

Al empezar el experimento, una gota de la disolución es formada en la punta de una capilaridad doble que permite el intercambio completo de la subfase de la gota, y en todo momento se mide el área y la tensión superficial de la gota. En las Fig. 4.2.2 y Fig. 4.2.3 se muestran el área y la tensión superficial de la gota a lo largo del experimento a 23°C (gráficas A) y 50°C (gráficas B).

Como se pueden observar en estas gráficas, el experimento consta de cuatro fases distintas. La primera fase (color violeta) corresponde a una fase de adsorción donde los microgeles se adsorben a la superficie de la gota, reduciendo la tensión superficial como se puede ver en la Fig. 4.2.3 y manteniendo el área constante (Fig. 4.2.2), y tras 1000 segundos se llega a un estado estacionario para ambas temperaturas. En este estado hay recubrimiento total de la superficie por las partículas de microgel y la tensión superficial se mantiene constante para tiempos mayores. Tras 1200 segundos, donde ya se puede asegurar que el sistema está en estado estacionario, se inicia la segunda fase de intercambio de subfase (color verde). Esta fase consta de 10 procesos de intercambio de la subfase de la gota por agua Milli-Q pura. En la Fig. 4.2.2 se observa pequeñas fluctuaciones en el área debido a que la extracción de subfase y la inyección de agua

Milli-Q no son totalmente simétricas, sin embargo, en la Fig. 4.2.3 se ve que esta pequeña fluctuación no afecta a los valores de tensión superficial.

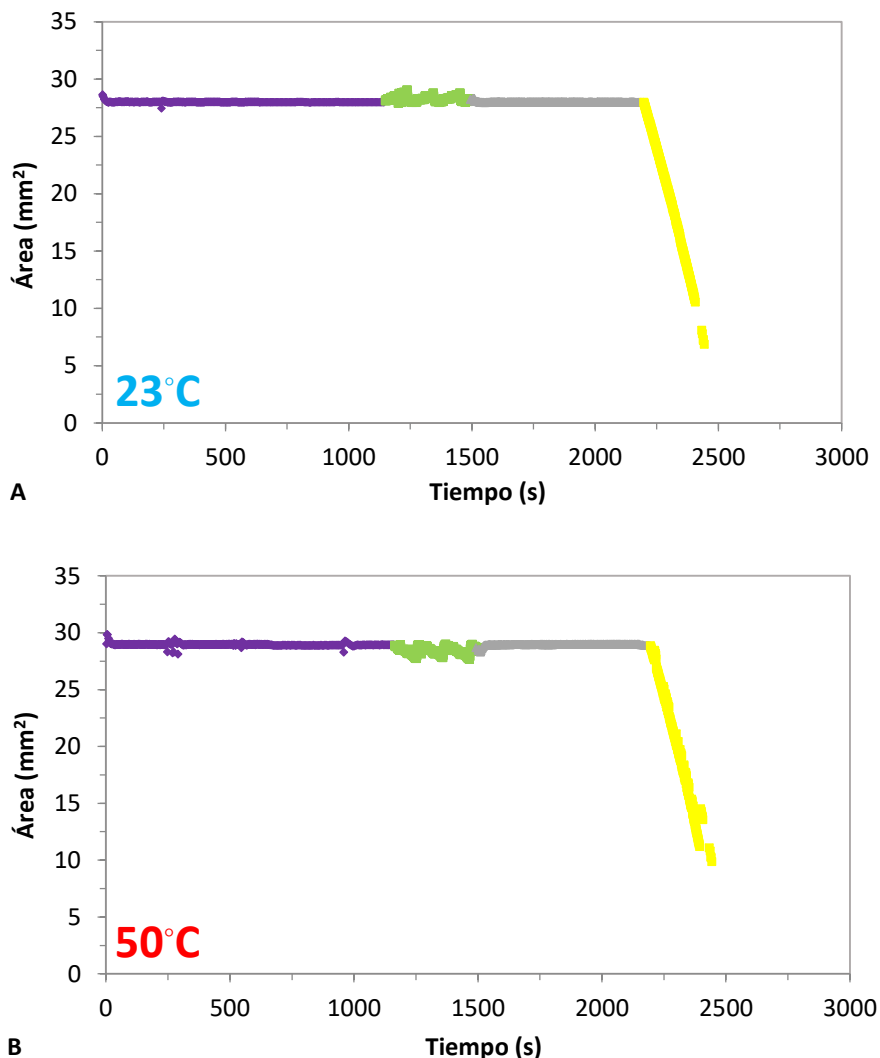


Fig. 4.2.2. Evolución temporal del área superficial de la gota durante el experimento de intercambio de subfase y de compresión a 23°C y 50°C.

Tras esta fase de intercambio de subfase, comienza la fase de desorción espontánea (color gris) que dura 1000 segundos, para observar si existe desorción de las partículas de microgeles de PNIPAM a la subfase de agua pura, y en tal caso observar un aumento de la tensión superficial. Observando la Fig. 4.2.3, se ve que para ambas temperaturas la tensión superficial se mantiene constante en la fase de desorción. Esto demuestra que las partículas de microgel de PNIPAM no se desorben de manera espontánea hacia la subfase de agua pura, concordando con resultados experimentales similares realizados por Pinaud et al. [96].

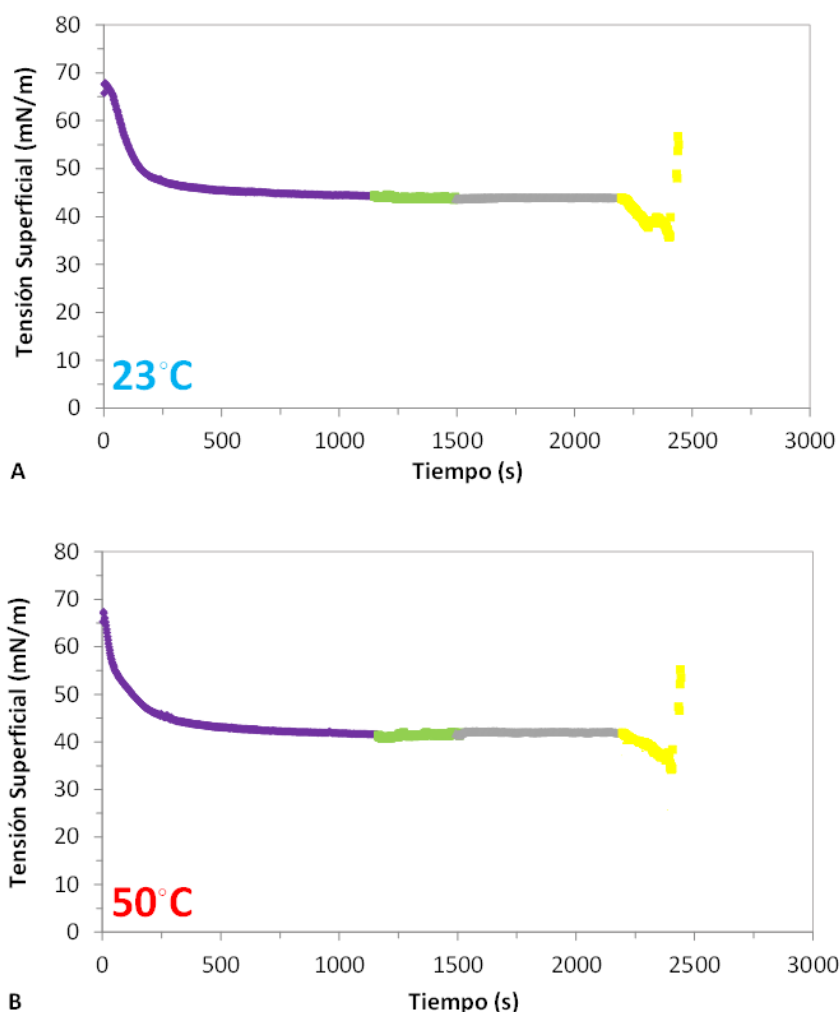


Fig. 4.2.3. Evolución temporal de la tensión superficial de la gota durante el experimento de intercambio de subfase y de compresión a 23°C y 50°C.

Por último, se realiza una fase de compresión de la gota (color amarillo), que consiste en extraer a una velocidad constante la subfase de agua con el fin de evaluar la desorción forzada. En la Fig. 4.2.2 vemos que se produce una disminución de la tensión superficial aproximadamente lineal al disminuir el área superficial de la gota para ambas temperaturas. Debido a que la superficie está siendo comprimida y se está reduciendo el área disponible, la concentración superficial de partículas de microgel aumenta. Al no observar en ningún caso un aumento significativo de la tensión superficial en el proceso de compresión, se deduce que las partículas de microgel de PNIPAM no se desorben en este intervalo. Después de la zona de disminución de tensión superficial aparece un pequeño intervalo en el que la tensión superficial se mantiene aproximadamente constante (Figura 4.2.3). Esta zona se observa con más claridad para los microgeles hinchados (Figura 4.2.3A) mientras que en caso de microgeles deshinchados es prácticamente inexistente (Figura 4.2.3B). En esta zona, ante la compresión las

partículas se desorben de manera parcial reteniendo una estructura débilmente reticulada tras la adsorción. De hecho, como sugiere Pinaud et al., una vez que se alcanza la compresibilidad máxima de los microgeles adsorbidos, es más favorable que los microgeles se desorban de manera parcial en la subfase acuosa o formen multicapas. Además, cabe destacar que en la última parte de la fase de compresión de la gota se han medido valores altos de tensión superficial (Fig. 4.2.3, color amarillo), pero esto es debido a que en esas áreas la gota tiene un tamaño tan pequeño que el modelo ADSA para calcular la tensión superficial de Young-Laplace ya no funciona, por lo que no tiene sentido tener en cuenta estos últimos puntos del experimento.

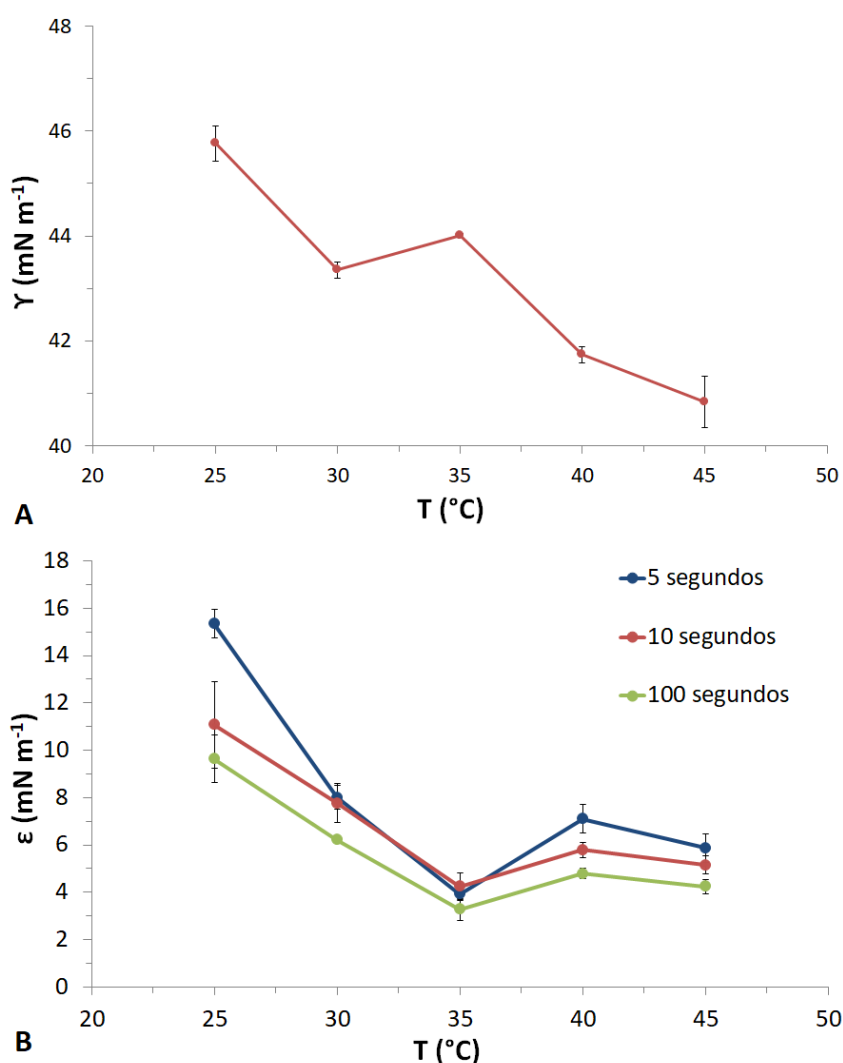


Fig. 4.2.4. Tensión superficial y elasticidad superficial de la capa adsorbida de microgel de PNIPAM en función de la temperatura. Para las medidas de elasticidad se realizan a tres periodos de inyección y extracción diferentes: 5 s, 10 s y 100 s de periodo.

Por otro lado, también se ha medido con el tensiómetro de Gota Pendiente la tensión superficial junto con la elasticidad superficial de la capa adsorbida de microgel de PNIPAM en función de la temperatura. Para realizar estas medidas se utiliza una disolución de PNIPAM con una concentración de 0.1 g L^{-1} , que se calienta a la temperatura deseada, y se procede a formar la gota en el tensiómetro de Gota Pendiente. A cada temperatura se realizan 3 medidas.

Los resultados se muestran en la Fig. 4.2.4, en la cual se puede observar como la tensión superficial disminuye de forma continua con la temperatura, excepto a temperaturas cercanas al VPTT, donde se puede observar un pequeño aumento de la tensión superficial (Fig. 4.2.4A). Este comportamiento de la tensión superficial es debido al aumento de la densidad del microgel en la superficie. A temperaturas por encima de la VPTT las partículas de microgel adoptan el estado colapsado permitiendo que un mayor número de partículas se adsorban en la superficie reduciendo la tensión superficial.

En la Fig. 4.2.4B se muestran las medidas de elasticidad superficial en función de la temperatura a tres periodos diferentes. Para los periodos de 5 y 10 segundos las medidas son muy similares ya que a esas frecuencias el comportamiento elástico de la monocapa es muy similar. Mientras que para periodo de 100 segundos los resultados de elasticidad tienden a ser menores debido a que la monocapa tiene tiempo suficiente para amortiguar la deformación. Se puede observar que hay una reducción continua de la elasticidad superficial con la temperatura, con un mínimo local cerca de la VPTT a 35°C , que coincide con el máximo local de la tensión superficial en la Fig.4.2.4A. Este mínimo denota un estado de mínima elasticidad que ocurre en la temperatura de transición del microgel.

Volviendo a las isotermas de compresión, la diferencia principal entre las isotermas en el estado hinchado y el estado colapsado en la Fig. 4.2.1 es el desplazamiento hacia áreas normalizadas menores obtenidas para temperaturas mayores de la VPTT. Para ello se mide el *“lift off area”* de cada isoterma de compresión, que se obtiene extrapolando la isoterma en el estado de líquido expandido a $\pi = 0$, cuyo valor corresponde al área normalizado donde las partículas de microgel empiezan a interactuar y aumenta el valor de la presión superficial [95,120]. El valor del *“lift off area”* también coincide en este caso con el área normalizada donde acaba el primer dominio de interacción mencionado anteriormente, a saber, $2500 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$ en estado hinchado y $1000 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$ en el estado colapsado. Debido a que el *“lift off area”* está marcado por el momento cuando las partículas de microgel empiezan a interactuar, este está relacionado con el diámetro efectivo de las partículas de microgel [23]. Consecuentemente, el desplazamiento a áreas normalizadas menores es razonable teniendo en cuenta que el diámetro hidrodinámico de los microgeles se reduce casi a la mitad para temperaturas mayores de VPTT (Fig. 4.1.1). Para el caso de microgeles de PNIPAM, hasta donde nosotros sabemos, todavía no hay trabajos en la bibliografía enfocados específicamente a estudiar el comportamiento termosensible de las monocapas por debajo y por encima

de la VPTT. Sin embargo, si hay muchos trabajos que estudian las propiedades de las partículas de microgel en el estado hinchado, cuando la temperatura es menor de la VPTT [44,96,109,119]. Por ejemplo, Geisel et al. estudiaron la compresibilidad de partículas de microgeles de PNIPAM cargados en la interfaz de aceite-agua en función de la carga [109,119]. Estos autores no estudiaban específicamente el efecto de la temperatura pero observaron que las partículas de microgel de PNIPAM cargados se comprimen más fácilmente que los microgeles sin carga ya que las isothermas de las partículas cargadas aparecían desplazadas a áreas normalizadas menores. Este resultado concuerda con los mostrados en la Fig. 4.2.1 donde los microgeles colapsados, que presentan una carga efectiva mayor que las partículas de microgel hinchado (Fig. 4.1.1), se comprimen más fácilmente. Sin embargo, a diferencia de estos resultados, Picard et al. obtuvieron que la carga de las partículas de microgel no tiene ningún efecto sobre el comportamiento interfacial de los microgeles de P(NIPAM-co-AA) [44]. Estos autores compararon dos conjuntos de muestras de microgeles de P(NIPAM-co-AA), uno cargado y otro sin carga, observando que la presencia de carga no afecta a las interacciones o al empaquetamiento lateral los cuales se estudiaron a través de las isothermas de compresión y la compresibilidad de las monocapas en la interfaz aire-agua. Teniendo en cuenta todos estos resultados de la bibliografía, el papel de la carga en la monocapas de microgeles cargados es un tema controvertido, ya que parece importante en algunos casos pero insignificantes en otros. Para profundizar en este aspecto, se abordará el efecto del electrolito sobre las isothermas de compresión de microgeles de PNIPAM cargados en la siguiente sección. Pero antes, examinemos con más detalle la compresión de microgeles cargados en ausencia de electrolito.

La conformación de microgeles en los diferentes dominios puede evaluarse adicionalmente mediante la elasticidad de Gibbs (ϵ_0), que se calcula directamente de las isothermas de compresión por la ecuación (2). La Fig. 4.2.1 también muestra la ϵ_0 de las monocapas de partículas de PNIPAM registrado por encima y por debajo de la VPTT. Ambas curvas muestran un único máximo de acuerdo con la existencia de un único régimen conformacional de microgeles aplanados en la superficie en ambos casos. Según la bibliografía, la elasticidad de la superficie tiene su origen en la densidad de cadenas estiradas e interpenetradas en la interfaz [23,96,121]. La elasticidad máxima corresponde a una conformación plana en la que se adsorbe un número máximo de segmentos en la superficie. Una mayor compresión de la monocapa conduce a la desorción de segmentos o formación de bucles, lo que disminuye la densidad de microgeles adsorbidos y, por lo tanto, la elasticidad disminuye. Picard et al. mostraron que la elasticidad de la monocapa aumenta a medida que aumenta la deformabilidad del microgel [44]. Esto concuerda con los hallazgos de la Fig. 4.2.1 en la que la curva obtenida para las partículas de microgel hinchados (23°C) aparece ligeramente más alta dentro de todo el intervalo de compresión, consistente con una conformación más blanda para $T < VPTT$. Además, esta tendencia se correlaciona de manera importante con las partículas de microgel que se comprimen más fácilmente en el estado colapsado,

como se deduce del desplazamiento de la isoterma de compresión a 50°C a áreas normalizadas menores (Fig. 4.2.1). La estructura de partículas más densamente empaquetada en el estado colapsado debería evitar la formación de redes y el estiramiento en la superficie. De hecho, que se haya obtenido un valor de ϵ_0 más bajo para las partículas de PNIPAM a temperaturas mayores de la VPTT posiblemente sea debido por una interacción reducida como consecuencia de la mayor carga efectiva de las partículas colapsadas (Fig. 4.1.1). Por el contrario, la interacción de la capa exterior menos densa de las partículas en el estado hinchado promueve la interpenetración de los polímeros de la capa externa (ϵ_0 alto) y esta interacción se ve favorecida por la carga efectiva más baja de los microgeles hinchados (Fig. 4.1.1).

4.3 Imágenes de Micro-BAM

La Fig. 4.3.1 muestra una serie de imágenes representativas de Micro-BAM de la monocapa de partículas de PNIPAM hinchadas y colapsadas en la interfaz de aire-agua tomadas en diferentes estados de compresión. Los diferentes dominios de interacción en las monocapas se distinguen en las imágenes de Micro-BAM por la diferencia en la reflectividad. Las películas pueden diferir en la orientación de las moléculas y, por tanto, en el espesor de la monocapa. Una fase más gruesa aparece más clara (más reflectante) que una fase delgada que aparece más oscura (menos reflectante). En los estados de compresión más bajos de la monocapa, donde la monocapa está compuesta por una capa de partículas que no interactúan, encontramos imágenes muy oscuras (Fig. 4.3.1A y D).

En los estados de compresión más altos (Fig. 4.3.1B y E), las imágenes permanecen muy oscuras y continuas, correlacionándose con moléculas aplanadas en la superficie en el segundo dominio de compresión de una monocapa (líquido extendido) (Fig. 4.2.1). La Fig. 4.3.1E aparece ligeramente más clara que la Fig. 4.3.1B, lo que posiblemente indica la formación de una película ligeramente más gruesa de partículas colapsadas [116]. Las Fig. 4.3.1C y F muestran las imágenes de Micro-BAM tomadas en los estados de compresión más altos en la zona de π constante (Fig. 4.2.1). El área normalizada es muy pequeña en este dominio en el cual tiene lugar la desorción de segmentos y la formación de bucles. Las imágenes de Micro-BAM revelan algunas diferencias entre microgeles hinchados y colapsados. En $T < VPTT$, se puede apreciar claramente que hay dominios donde coexisten zonas menos concentradas (oscuros) y zonas más densas (claras) (Fig. 4.3.1C) de microgeles, mientras que en $T > VPTT$ solo aparecen puntos claros más pequeños (Fig. 4.3.1F). La presencia de áreas claras más grandes en los microgeles hinchados, para altas densidades superficiales (Fig. 4.3.1C), posiblemente esté relacionada con la formación de bucles mayores debido a que poseen una capa externa polimérica más extendida que los microgeles colapsados. Además, al tener una carga

efectiva menor (Fig. 4.1.1), podría favorecer las interacciones de las cadenas poliméricas externas para la formación de bucles, dando lugar al tercer dominio de presión superficial constante [122].

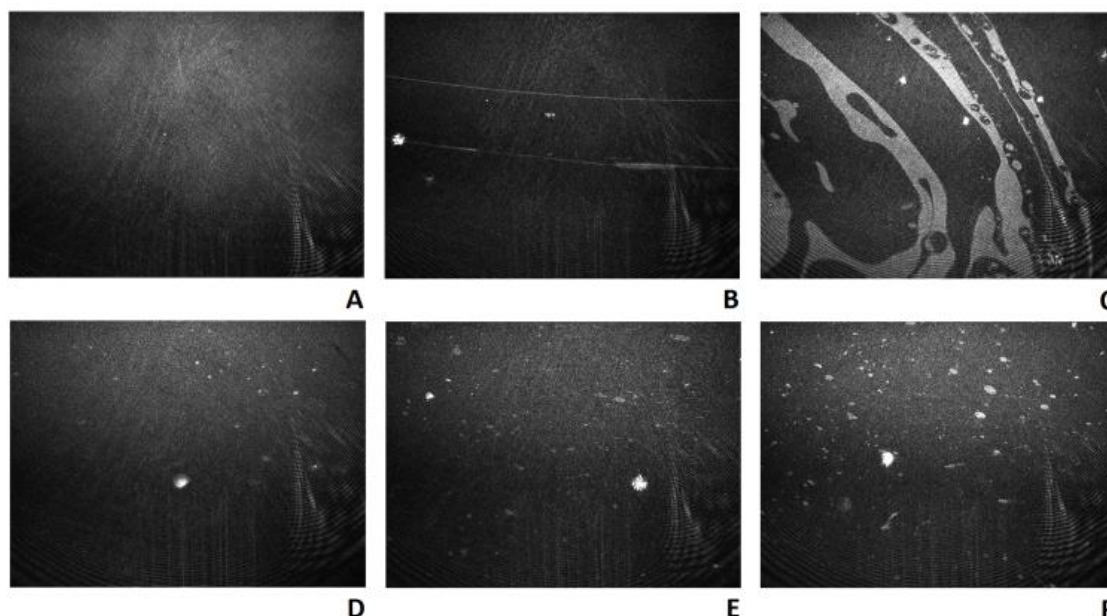


Fig. 4.3.1. Imágenes de micro-BAM de partículas de microgel de PNIPAM cargadas en la interfaz aire-agua a 23°C (A, B, C) y a 50°C (D, E, F). Las imágenes corresponden a las isothermas mostradas en la Fig. 4.2.1 en diferentes estados de compresión: A, D en $\pi = 1 \text{ mN m}^{-1}$; B, E en $\pi = 18 \text{ mN m}^{-1}$; C, F en $\pi = 24 \text{ mN m}^{-1}$. Las dimensiones de cada imagen son $3.6 \text{ mm} \times 4.0 \text{ mm}$.

Por otro lado, las monocapas de microgeles colapsados son posiblemente más gruesas y la capa exterior polimérica de las partículas más corta, lo que da como resultado un menor contraste en la formación del bucles. Nuevamente, la alta carga efectiva en $T > VPTT$ estaría evitando la formación de una capa más condensada de partículas de microgel, por lo que tienden a la desorción parcial hacia la subfase. La coexistencia de zonas de distinta densidad superficial, correspondiente a posible zonas de desorción de segmentos solo en el colapso de microgeles en estado hinchado ($T < VPTT$), concuerda además con los resultados de la Figura 4.2.3 en la que el intervalo lineal solo aparece en microgeles hinchados.

4.4 Caracterización electrocinética

Como ya se ha mencionado anteriormente, el efecto de la electrostática sobre el comportamiento de las partículas de microgel cargados en las interfases fluido-líquido es un tema controvertido en la bibliografía. Los efectos provocados por electrolito y variaciones de pH en microgeles de PNIPAM con grupos acrílicos o metacrílicos puede resultar en efectos contradictorios en distintos trabajos bibliográficos [44,109]. Para profundizar en este aspecto se han realizado nuevas medidas de isothermas de compresión y medidas de diámetro hidrodinámico D_h y movilidad electroforética μ_e con distintas concentraciones de sal. En este caso, se han evaluado los efectos de la sal monovalente NaNO_3 a concentraciones de 1 y 10 mM. La Fig. 4.4.1 muestra las isothermas de compresión obtenidas para partículas de microgeles de PNIPAM hinchados (Fig. 4.4.1A) y colapsados (Fig. 4.4.1B), medidas a diferentes concentraciones de NaNO_3 en la subfase. Claramente, la adición de electrolito a la subfase acuosa desplaza las isothermas de compresión hacia áreas más grandes, para ambas temperaturas (Fig. 4.4.1A y B). En otras palabras, cuando los iones apantallan la repulsión electrostática entre las partículas de microgel, estos se comprimen con menor facilidad. Estos resultados concuerdan con la explicación dada por Geisel et al. para microgeles de PNIPAM-co-MAA, los cuales observan que los microgeles cargados se comprimen más fácilmente que los microgeles no cargados [109]. Estos autores midieron el diámetro de las partículas de microgel cargado y no cargado utilizando imágenes de Criomicroscopía electrónica de barrido (crio-SEM) de FreSCa (*Freeze-fracture shadow-casting*), y estudiaron también el aplanamiento del microgel en la interfaz aceite-agua, obteniendo un diámetro similar en ambos casos. Aun así, afirman que la compresibilidad de los microgeles no está directamente determinada por la repulsión electrostática, sino que el parámetro clave es la diferencia de tamaño efectivo de los microgeles en los estados cargados y no cargados que presentan las partículas en la monocapa [123]. Para explicar este comportamiento contradictorio, propusieron que los microgeles cargados poseen un área efectiva menor y un tamaño efectivo más pequeño. Además, también señalaron que la densidad de las cadenas de polímero en la corona de los microgeles es diferente en el estado cargado y no cargado. Como consecuencia, una mayor deformabilidad de los microgeles cargados facilitaría la compresión de los microgeles [109].

Por el contrario, Picard et al. opinan que el cambio de las isothermas observado por Geisel et al. podría deberse a la contribución adicional de especies moleculares, que presentan actividades interfaciales dependientes del pH [44]. En su estudio, Picard et al. encontraron que la electrostática juega un papel menor en la interacción de las partículas de microgel en la interfaz, a pesar de su diferencia en la proporción de hinchamiento. En cambio, afirman que las interacciones entre partículas están dominadas por contribuciones estéricas.

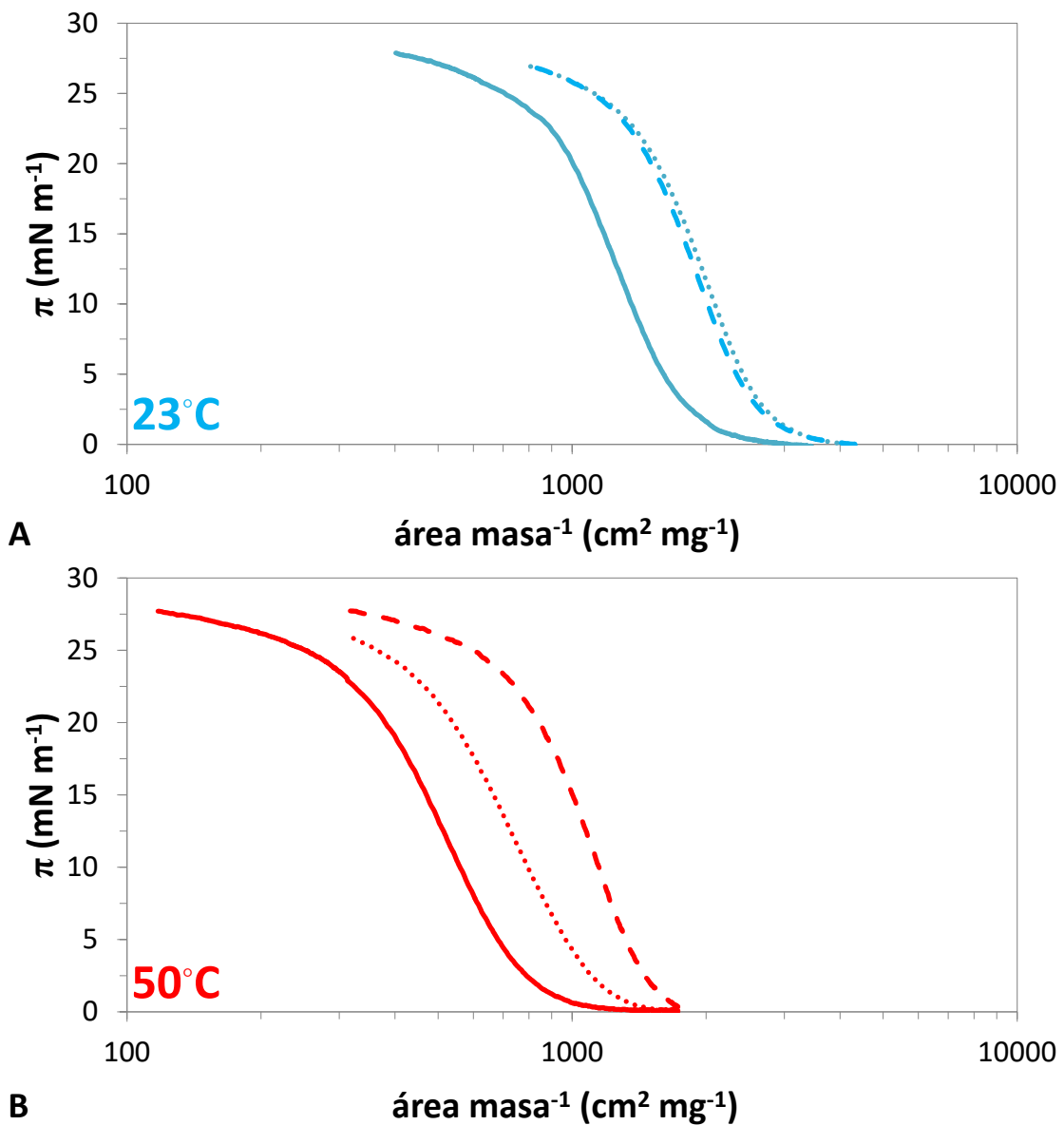


Fig. 4.4.1. Isothermas de compresión de microgeles de PNIPAM en la interfaz aire-agua en diferentes subfases. A) Partículas hinchadas: 23°C (líneas azules) B) Partículas colapsadas: 50°C (líneas rojas). Agua Milli-Q (líneas continuas), NaNO₃ 1 mM (líneas de puntos), NaNO₃ 10 mM (líneas discontinuas). Las líneas trazadas son valores medios de tres experimentos con desviación estándar <5%.

En este escenario, realizamos nuevos experimentos con el Malvern Zetasizer Nano zs, añadiendo a las muestras 1 y 10 mM de NaNO₃ a la disolución, siguiendo la misma metodología. Los resultados de diámetro hidrodinámico y movilidad electroforética de los microgeles de PNIPAM con NaNO₃ se muestran en la Fig. 4.4.2. De la Fig. 4.4.2A se puede apreciar que D_h es prácticamente independiente de los valores de concentración de NaNO₃ usados en este estudio. Las tres curvas prácticamente coinciden, lo que

significa que el hinchamiento de las partículas de microgel de PNIPAM permanece inalterado en disolución en presencia de NaNO_3 . Sin embargo, la presencia de electrolito tiene una gran influencia en las curvas de movilidad electroforética (Fig. 4.4.2B). Por un lado, para $T < \text{VPTT}$, μ_e disminuye en valor absoluto hacia valores cercanos a cero tanto para 1 mM como para 10 mM de NaNO_3 (Fig. 4.4.2B), debido al apantallamiento de la carga eléctrica de las partículas de microgel por los iones. Por lo tanto, en estas condiciones, se espera que los microgeles se comporte como partículas sin carga. De hecho, las isotermas de compresión mostradas en la Fig. 4.4.1 se desplazan a áreas más grandes de acuerdo con los resultados de Geisel et al. para partículas de microgel sin carga [109]. Además, a $T < \text{VPTT}$ los valores de μ_e mostrados en la Fig. 4.4.2B para 1 y 10 mM prácticamente se solapan y esto coincide con la superposición de las isotermas mostradas en la Fig. 4.5.1A a 1 y 10 mM. En contraste con este comportamiento, en la Fig. 4.5.2B se observa que μ_e ahora depende de la concentración de electrolito para $T > \text{VPTT}$. A 1 mM, el $|\mu_e|$ aumenta con T para converger con la correspondiente al agua pura (Fig. 4.4.2B).

A 10 mM, $|\mu_e|$ de las partículas también aumenta con T pero en menor medida siendo menor que en el caso del agua pura y de 1 mM de sal. Por lo tanto, a 10 mM de concentración de NaNO_3 y $T > \text{VPTT}$, los iones pueden apantallar parcialmente la carga eléctrica de las partículas. De hecho, esta interpretación explicaría el gran desplazamiento de la isoterma visto para 10 mM en la Fig. 4.4.1B. Además, de acuerdo con este razonamiento, el hecho de que la isoterma $\pi - A$ de los microgeles de PNIPAM a $T < \text{VPTT}$ en la subfase de agua pura (Fig. 4.4.1A) se sitúe en áreas normalizadas muy cercanas a las registradas para microgeles de PNIPAM a $T > \text{VPTT}$ en la subfase de NaNO_3 10 mM (Fig. 4.4.1B), se puede justificar en términos de valores similares de μ_e mostrados en ambos casos en la Fig. 4.4.2B.

De acuerdo con lo discutido anteriormente, creemos que la influencia de la electrostática en las propiedades interfaciales de las monocapas de PNIPAM cargadas depende de lo significativa que sea la carga de las partículas. En este sentido, Tetry et al. han demostrado recientemente que para los microgeles cargados de PNIPAM-c-AA, la electrostática es responsable de una barrera de adsorción en la interfaz aire-agua. Esta barrera puede ser modulada por la presencia de sal, lo que permite que cantidades pequeñas de microgeles puedan lograr la adsorción espontánea [110]. Sin embargo, hay que enfatizar que solo con la electrostática no se puede explicar el comportamiento de los microgeles cargados en las interfases, sino que también el tipo de microgel y las condiciones experimentales deben ser cuidadosamente considerados.

Por ejemplo, Picard et al. encontraron irrelevante el papel de la electrostática en las isotermas de compresión de microgeles basados en P(NIPAM-co-AA) [44] a pesar de sus valores significativos de μ_e en estado hinchado en presencia de 1 mM de KCl [124]. Dado que los iones monovalentes utilizados en estos estudios son diferentes a los utilizados en esta Tesis Doctoral, los efectos de contraiones específicos también podrían

desempeñar un papel importante. De hecho, la movilidad de las partículas de microgel de PNIPAM cargadas es extremadamente sensible a la naturaleza del electrolito [125]. Este resultado ha sido confirmado por simulaciones de grano grueso muy recientes de nanogeles termosensibles cargados en presencia de diferentes contraiones [125]. Por lo tanto, este tipo de efecto debe ser tenido en cuenta con el fin de dilucidar el comportamiento complejo de los microgeles cargados en las interfaces.

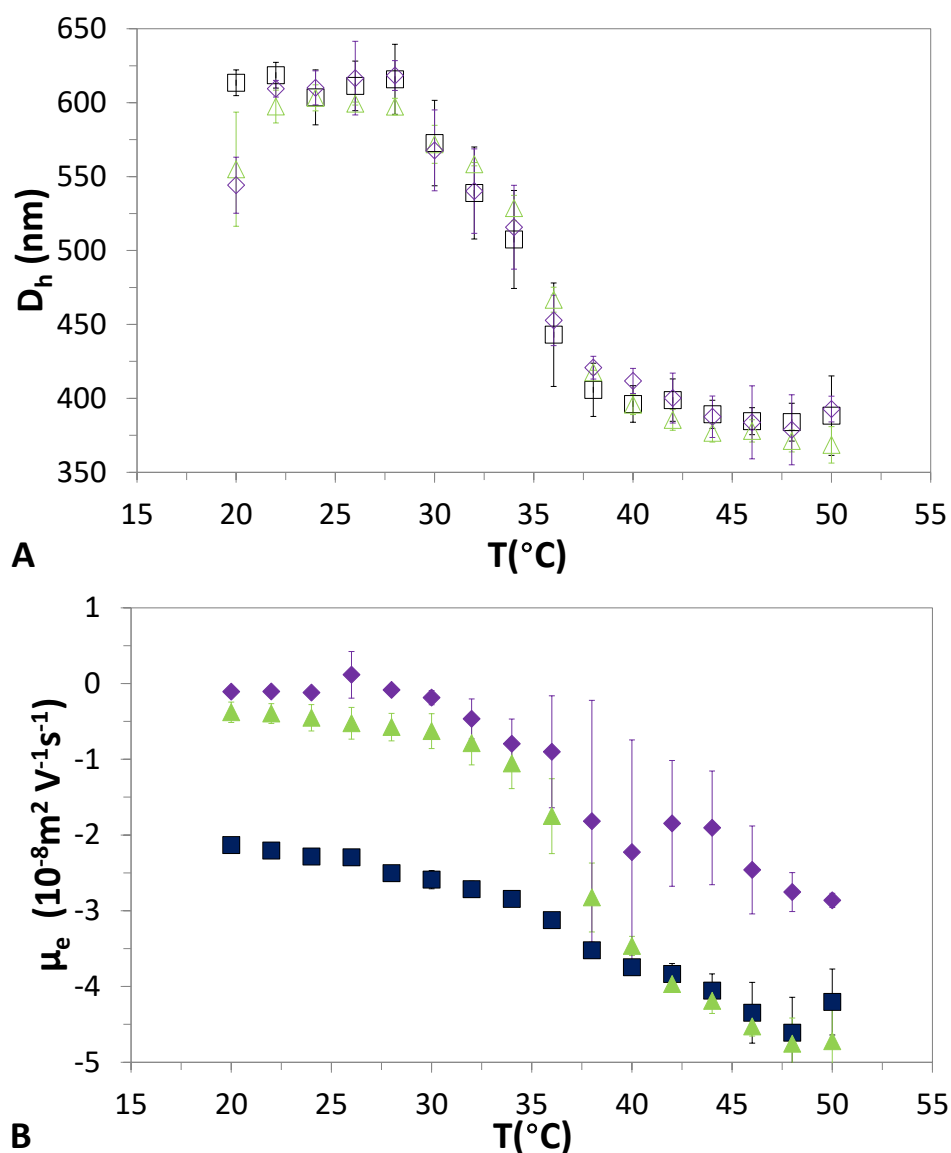


Fig. 4.4.2. A) Diámetro hidrodinámico (símbolos huecos) y B) movilidad electroforética (símbolos sólidos) de microgeles de PNIPAM en función de la temperatura. Cuadrados negros: agua Milli-Q, Triángulos verdes: NaNO_3 1 mM, Rombo púrpuras: NaNO_3 10 mM.

CAPÍTULO 5: Caracterización Interfacial y en Disolución de Microgeles de PNIPAM-PEG

Para estudiar los efectos específicos de la naturaleza del microgel en las interfases y estudiar los efectos de la carga, se ha realizado la misma caracterización interfacial y en disolución de otro microgel basado en los mismos polímeros de PNIPAM pero sintetizado también con polímeros de metacrilato de poli (etilenglicol) (PEG). Estos polímeros poseen otras propiedades en comparación al PNIPAM y aportan al microgel de PNIPAM-PEG otras características. De base, los polímeros de PEG son hidrófilos y se disuelven en agua, pero su tiempo de degradación se puede controlar en el proceso de síntesis lo que permite, por ejemplo, un suministro de fármaco continuado a largo plazo en el lugar deseado si se utilizan los microgeles con PEG como transporte de fármacos [33,49]. Además, los polímeros de PEG también se utilizan en otras áreas, como en el tratamiento de quimioterapia contra el cáncer, donde se ha visto que la presencia de PEG en los liposomas de transporte del agente anticancerígeno mejora y potencia el efecto del agente en los tejidos afectados [126]. En medicina, también son la base de varios laxantes [127], y también se está investigado la posibilidad de que estos polímeros sean usados para reparar daños en las células nerviosas [128,129]. También son usados con frecuencia en los laboratorios de química y biología, y de forma comercial se encuentra en varias cremas de piel, lubricantes y pasta de dientes. Dado el interés que hay alrededor del PEG en las aplicaciones biomédicas e industriales, es interesante conocer las características interfaciales que este polímero puede inducir cuando forman parte de microgeles poliméricos como los estudiados hasta el momento.

5.1 Propiedades de los microgeles en Disolución

En la Fig. 5.1.1 se muestran las medidas de tamaño y movilidad electroforética de los microgeles de PNIPAM-PEG en agua pura en función de la temperatura del medio, utilizando el mismo procedimiento experimental utilizado para los microgeles de PNIPAM.

Se puede observar que los microgeles de PNIPAM-PEG poseen una naturaleza hidrófila/hidrófoba similar a los microgeles de PNIPAM, ambos dependientes de la temperatura. Para temperaturas por debajo de la VPTT adopta un estado hinchado, y cuando aumenta la temperatura por encima de la VPTT los microgeles adoptan un estado colapsado, debido a la naturaleza hidrófoba a temperaturas altas. Se puede observar también de la Fig. 5.1.1 que el tamaño hidrodinámico se mantiene constante para temperaturas por debajo de los 30°C y por encima de los 38°C, y disminuye progresivamente en la VPTT de la misma forma que los microgeles de PNIPAM (Fig.

4.1.1). Sin embargo, los valores de diámetro hidrodinámico medidos para este microgel son de 788 ± 20 nm para el estado hinchado y 284 ± 7 nm en el estado colapsado, mientras que si posee la misma VPTT alrededor de los 32°C .

Comparando la Fig. 4.1.1 y la Fig. 5.1.1 se ha visto que la VPTT se encuentra para la misma temperatura alrededor de los 32°C , e igualmente, el D_h se mantiene constante para temperaturas por debajo de los 30°C y por encima de los 38°C , con una disminución progresiva en la VPTT donde las partículas de ambos microgeles pasan del estado hinchado al estado colapsado. Respecto a los valores de diámetro hidrodinámico, la proporción de hinchamiento del microgel de PNIPAM-PEG es mayor que los microgeles de PNIPAM, ya que el sistema con PEG varía desde los 788 ± 20 nm a 284 ± 7 nm en la VPTT mientras que el microgel de PNIPAM varía de 614 ± 6 nm a 388 ± 6 nm (Fig. 4.1.1).

Observando las medidas de movilidad electroforética que también se muestran en la Fig. 5.1.1, este microgel también poseen carga eléctrica negativa, y el valor absoluto de μ_e también incrementa cuando los microgeles colapsan. En este caso, μ_e cambia de $-(0.57 \pm 0.07) \cdot 10^{-8} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $-(3.8 \pm 0.3) \cdot 10^{-8} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, cuando la temperatura incrementa de los 30°C a 38°C respectivamente. Por lo tanto en valores absolutos, este microgel posee una carga efectiva menor que el microgel de PNIPAM tanto en estado hinchado como colapsado (de $-(2.2 \pm 0.1) \cdot 10^{-8} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $-(4.5 \pm 0.5) \cdot 10^{-8} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, cuando la temperatura incrementa de los 30°C a 38°C (Fig.4.1.1)).

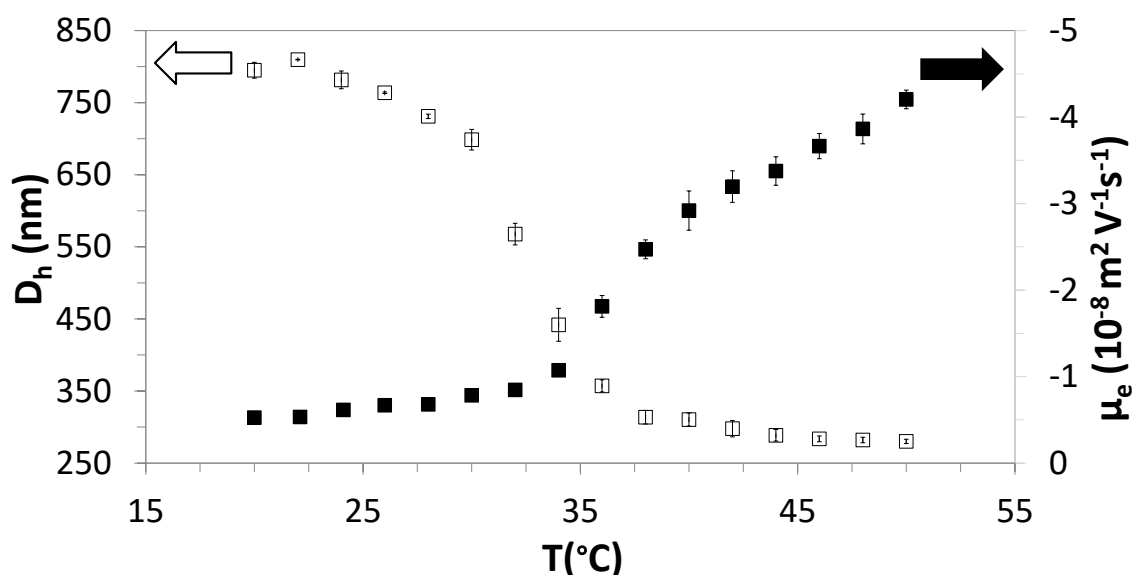


Fig. 8. Diámetro hidrodinámico (rectángulos abiertos) y movilidad electroforética (rectángulos sólidos) de los microgeles de PNIPAM-PEG, en agua Milli-Q, en función de la temperatura.

Esta disminución de la carga efectiva en valor absoluto de los microgeles de PNIPAM-PEG respecto de los microgeles de PNIPAM es posiblemente debido a la presencia de los monómeros neutros de PEG, que reduce la densidad de carga efectiva en ambos estados del microgel.

De acuerdo con lo visto anteriormente para las partículas de microgel de PNIPAM, esta reducción en la carga efectiva supone una mayor interpenetración de los polímeros de la corona del microgel en el estado hinchado, permitiendo formar una estructura más compacta en la interfaz por compresión lateral que los microgeles de PNIPAM. Respecto al estado colapsado en condiciones de alta compresión, la formación de bucles por agrupación de las partículas de microgel será más probable que la desorción de segmentos o partículas hacia la subfase, por haber menor repulsión electrostática entre las partículas de microgel de PNIPAM-PEG.

5.2 Isotermas de Compresión

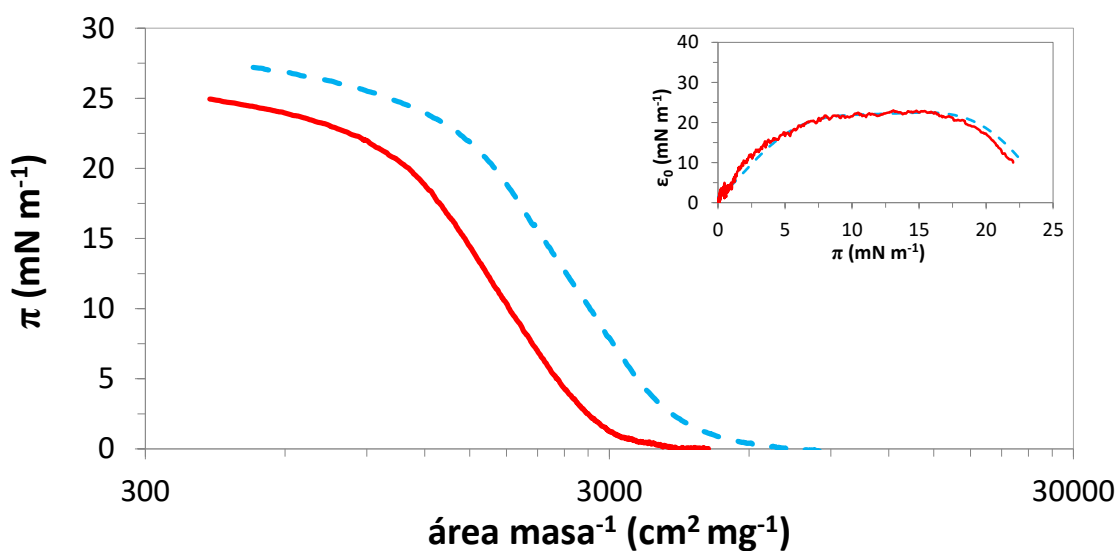


Fig. 5.2.1. Isotermas de compresión y elasticidad de Gibbs de microgeles de PNIPAM-PEG en la interfaz aire-agua. Estado hinchado a 23°C (línea azul discontinua) y estado colapsado a 50°C (línea roja continua). Las isotermas mostradas son el valor medio de tres experimentos independientes con una desviación estándar <2%.

En la Fig. 5.2.1 se muestran las isotermas $\pi - A$ de los microgeles de PNIPAM-PEG obtenidas a temperaturas por debajo y por encima de la VPTT (23°C y 50°C respectivamente), utilizando el mismo procedimiento que se ha usado para los microgeles de PNIPAM. Para cubrir toda la isoterma de compresión a cada temperatura, se ha depositado para este microgel una masa sólida de 30-80 μg a 23°C, y 40-80 μg a

50°C. Para ambas temperaturas se han realizado 3 medidas obteniendo una desviación estándar es <2%.

En Fig. 5.2.1 también se distinguen los tres mismos dominios encontrados en la Fig. 4.2.1. Un primer dominio en el cual las partículas de microgel no interaccionan entre ellas y el valor de la π es próximo a cero, un segundo dominio en el cual éstas partículas empiezan a interaccionar marcada por un aumento suave de la presión superficial, y un tercer dominio en el cual la π es prácticamente constante. De estas isothermas se puede apreciar que las propiedades interfaciales bajo compresión lateral entre los microgeles de PNIPAM y PNIPAM-PEG son muy parecidas, con la diferencia de que las partículas de microgel de PNIPAM-PEG ocupan un área superficial mucho mayor y los intervalos de los dominios en áreas normalizadas son muy diferentes. Para este microgel en el estado hinchado (23°C), el primer dominio de compresión corresponde a áreas normalizadas mayores de $6000 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$, que es más del doble en comparación con los microgeles de PNIPAM. El segundo dominio se comprende entre áreas normalizadas desde $6000 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$ a $1500 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$ siendo este dominio mucho más grande que para el caso del PNIPAM. Esto quiere decir que los microgeles de PNIPAM-PEG empiezan a interaccionar entre ellos a distancias mayores que los microgeles de PNIPAM, permitiendo compresiones mayores antes de forma el sistema hexagonal en este dominio. Este fenómeno probablemente sea debido a que los microgeles de PNIPAM-PEG poseen un hinchamiento mayor, lo que dota del sistema de una compresibilidad más grande. También es posible que la presencia de PEG favorezca la extensión en la superficie. Las áreas normalizadas por debajo de $1500 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$ corresponden al tercer dominio en el cual el valor de la π tiende a ser constante alcanzando un valor similar al de los microgeles de PNIPAM (28 mN m^{-1}), donde se mantiene el sistema hexagonal de la segunda fase con un cambio continuo del parámetro de red.

Al igual que el caso anterior, la isoterma de compresión de las partículas de microgel en el estado colapsado (50°C) posee una forma similar al estado hinchado, y también se encuentran desplazada a áreas normalizadas menores. Esto indica nuevamente que la compresión proporciona dominios de interacción similares en los que tanto los microgeles de PNIPAM-PEG hinchados como colapsados se extienden en la superficie con los polímeros exteriores que se interpenetran a medida que aumenta la densidad de la superficie tal y como sucede con los microgeles de PNIPAM. El primer dominio, en el cual no hay interacción entre las partículas de microgeles, se mantiene ahora hasta áreas de $4500 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$, el segundo de $4500 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$ a $900 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$, y el tercer dominio para áreas menores de $900 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$. Aunque los valores de áreas normalizadas sean diferentes, se puede observar que el efecto de la temperatura en ambos microgeles es completamente similar; al aumentar la temperatura por encima de la VPTT, se desplaza la isoterma de compresión hacia áreas normalizadas menores, que en ambos casos ronda los $1500 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$ unidades en valor de área por masa (Fig. 4.2.1 y Fig. 5.2.1). Aunque los microgeles de PNIPAM-PEG poseen una carga efectiva menor que los

microgeles de PNIPAM en valores absolutos (Fig. 4.1.1 y Fig. 5.1.1), siguen siendo valores significativos por lo que la repulsión electrostática seguramente también favorezca la desorción y la formación de bucles en el tercer dominio.

La Fig. 5.2.1 también muestra la ϵ_0 de las monocapas de partículas de PNIPAM-PEG obtenida a temperaturas por encima y por debajo de la VPTT. Aunque ambas curvas muestren un único máximo, a diferencia del PNIPAM, éstas poseen una zona casi constante de ϵ_0 para presiones superficiales de 5 mN m^{-1} a 15 mN m^{-1} , que corresponde precisamente con el segundo dominio de las isothermas de compresión. Este resultado es debido a que en este dominio es donde se espera que la monocapa adopte una estructura hexagonal y su configuración óptica y extendida, dando lugar a que los valores de ϵ_0 en este dominio sean los más altos. El hecho de que solo haya un máximo absoluto muestra que en las isothermas de compresión existe un único régimen conformacional de microgeles extendidos en la superficie en ambos casos. Sin embargo, en este caso no se aprecian diferencias significativas en las gráficas de ϵ_0 en la Fig. 5.2.1 donde ambas curvas se superponen. Es decir, ambos estados de los microgeles de PNIPAM-PEG poseen una elasticidad similar durante todo el proceso de compresión. Esta diferencia con respecto a los microgeles de PNIPAM, donde ϵ_0 es algo menor en el estado colapsado, creemos que es debido a que las partículas de PNIPAM-PEG en el estado colapsado poseen un tamaño y carga efectiva menor en valor absoluto que las partículas de microgel de PNIPAM (Fig. 4.1.1 y Fig. 5.1.1). Esta reducción del tamaño y de la carga efectiva permite que estas partículas interactúen más fuertemente entre ellas, facilitando la interpenetración de los polímeros de la corona y permitiendo una conformación más extendida de la monocapa, lo que provoca un aumento de ϵ_0 igualando con los valores obtenidos para el estado hinchado.

Para los microgeles de PNIPAM-PEG también se han realizado medidas de la tensión superficial y la elasticidad superficial en función de la temperatura con el tensiómetro de Gota Pendiente siguiendo el mismo procedimiento utilizado para los microgeles de PNIPAM. Los resultados se muestran en la Fig. 5.2.2 [130].

En la Fig. 5.2.2A se observa un comportamiento similar al obtenido para los microgeles de PNIPAM (Fig. 4.2.4A), en la cual la tensión superficial disminuye con la temperatura debido al colapso de las partículas de microgel, aumentando la densidad superficial, con un máximo local alrededor de la VPTT a 35°C . Por otro lado, en la Fig. 5.2.2B se puede ver que la elasticidad superficial también disminuye con la temperatura, con la diferencia de que en este caso la elasticidad superficial sufre un pequeño aumento, con un máximo local a 35°C , cuando el periodo es de 5 y 10 segundos, mientras que para el periodo de 100 segundos los valores de elasticidad son menores y no se observa el máximo. De los resultados obtenidos en las Figs. 4.2.4 y 5.2.2, se puede ver que las propiedades mecánicas de los microgeles de PNIPAM y PNIPAM-PEG son distintas, en especial a temperaturas cercanas de la VPTT. Aunque no se ha estudiado aquí en gran

detalle la adsorción de microgeles en la VPTT, es importante tener en cuenta estas diferencias mecánicas entre los dos sistemas para discutir los demás resultados.

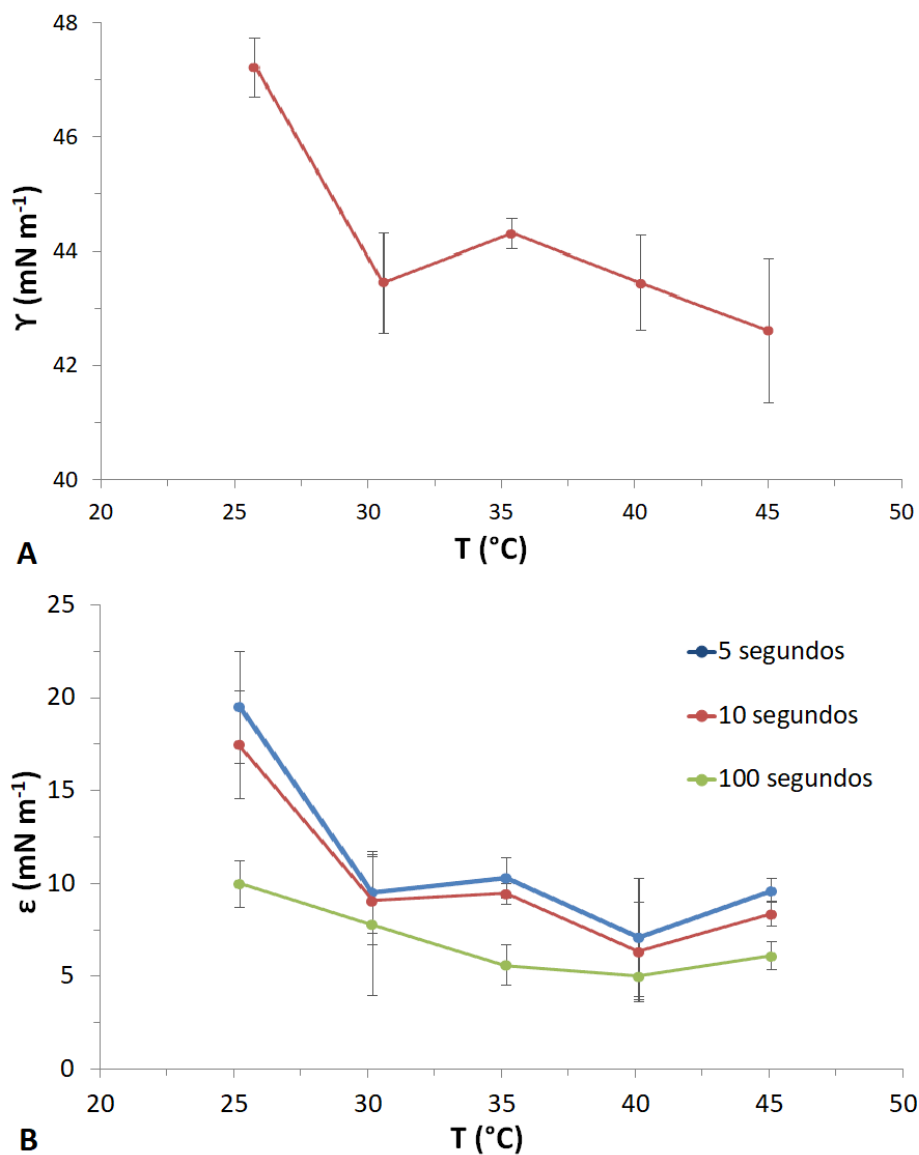


Fig. 5.2.2. Tensión superficial y elasticidad superficial de la capa adsorbida de microgel de PNIPAM-PEG en función de la temperatura. Para las medidas de elasticidad se realizan a tres periodos de inyección y extracción diferentes: 5 s, 10 s y 100 s de periodo [130].

5.3 Caracterización electrocinética

Con el fin de analizar cómo afecta la presencia de PEG sobre los efectos electrostáticos en las monocapas de microgel de PNIPAM-PEG, se han llevado a cabo medidas de isothermas de compresión, y de diámetro hidrodinámico D_h y movilidad electroforética μ_e en presencia de 1 y 10 mM de NaNO_3 .

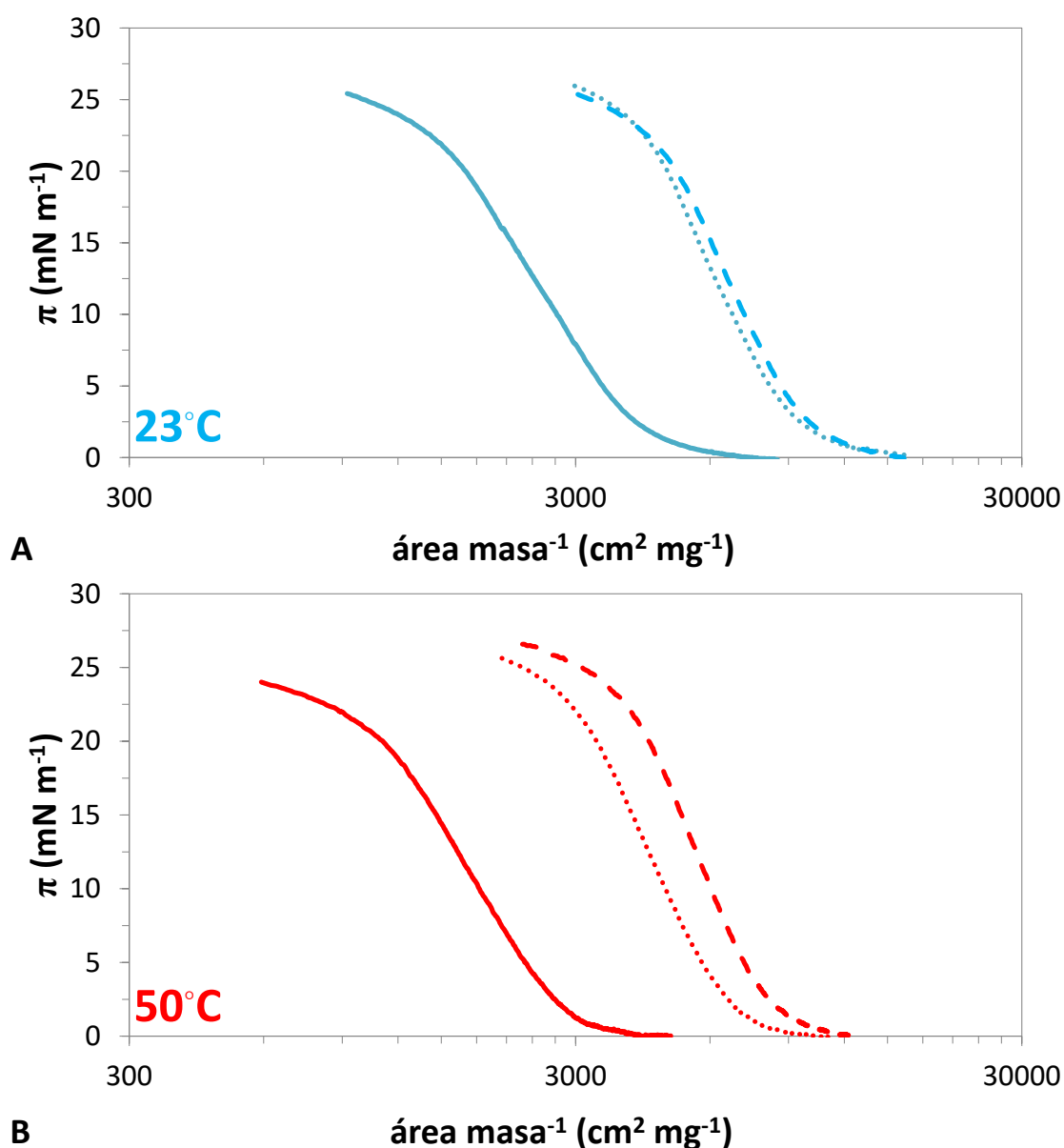


Fig. 5.3.1. Isothermas de compresión de microgeles de PNIPAM-PEG en la interfaz aire-agua en diferentes subfases. A) Partículas hinchadas: 23°C (líneas azules) B) Partículas colapsadas: 50°C (líneas rojas). Agua Milli-Q (líneas continuas), NaNO_3 1 mM (líneas de puntos), NaNO_3 10 mM (líneas discontinuas). Las líneas trazadas son valores medios de tres experimentos con desviación estándar <5%.

La Fig. 5.3.1 muestra las isothermas de compresión para partículas de microgeles de PNIPAM-PEG hinchados (Fig. 5.3.1A) y colapsados (Fig. 5.3.1B), medidas a diferentes concentraciones de NaNO_3 en la subfase. Vemos que en este caso, al añadir electrolito a la subfase, las isothermas de compresión también se desplazan hacia áreas normalizadas mayores para ambas temperaturas. Consecuentemente, observamos un comportamiento completamente similar al de los microgeles de PNIPAM. Ambos sistemas se comprimen con menor facilidad si se apantalla la repulsión electrostática por la presencia de iones.

En la Fig. 5.3.1 se observa que la repulsión electrostática tiene un efecto significativo en las isothermas de compresión de microgeles de PNIPAM-PEG para ambas temperaturas, al igual que ocurría para los microgeles de PNIPAM (Fig. 4.4.1). De hecho, el efecto del electrolito en los microgeles de PNIPAM-PEG es mayor en comparación con el efecto sobre los microgeles de PNIPAM. Mientras que para los microgeles de PNIPAM, al añadir 1 mM o 10 mM de NaNO_3 , el desplazamiento de las isothermas de compresión hacia áreas normalizadas mayores es como máximo de $1000 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$ para ambas temperaturas, para los microgeles de PNIPAM-PEG esta concentración de electrolito desplaza las isothermas de compresión a áreas mayores unos $7500 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$ en los dos estados del microgel. El origen de este fenómeno es complejo, pero pensamos que este aumento de la sensibilidad de las isothermas de compresión a la presencia de electrolitos podría ser debido a interacciones específicas del PEG con el electrolito.

De acuerdo con numerosos trabajos bibliográficos que los polímeros de PEG son de los sistemas más estudiados para la formación de sistemas bifásicos acuosos (ATPS) con otras sales [131–133]. Los ATPS se suelen formar cuando dos polímeros solubles son mezclados, o cuando un polímero y una sal se disuelven juntos en agua, la disolución se separa en dos fases inmiscibles con distintas composiciones y concentraciones de solutos [134]. Esta propiedad se utiliza en la purificación de biomateriales, extracción de iones de metales y la cristalización extractiva de sales inorgánicas [135,136]. Para los polímeros de PEG, se sabe que éste forma ATPS con sales como el carbonato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, entre otros; y también con grupos fosfatos, ácidos cítricos y sulfatos. Graber et al. también demostraron que los polímeros de PEG, a partir de una concentración muy baja, son capaces de formar ATPS con NaNO_3 utilizando PEG con distintos pesos moleculares, y en distintas condiciones ambientales [137,138]. Sin embargo, observaron que la distribución entre ambas fases inmiscibles de la ATPS tiene una concentración muy parecida de PEG y NaNO_3 , con una concentración de PEG mayor en la fase superior y una mayor concentración de NaNO_3 en la fase inferior. Por lo tanto, la presencia de NaNO_3 en la fase acuosa provoca un efecto de precipitación salina en los polímeros de PEG, reduciendo su solubilidad. Teniendo en cuenta estos resultados, pensamos que la presencia de NaNO_3 en la subfase en las medidas de las isothermas de compresión de los microgeles de PNIPAM-PEG, hace estos microgeles sean más

hidrófobos debido a la interacción específica del PEG con el NaNO_3 , aumentando su área efectiva y tamaño efectivo, disminuyendo la compresibilidad de las monocapas.

Para conocer a fondo los efectos específicos de la interacción electrostática, también se ha medido el tamaño hidrodinámico y la movilidad electroforética de los microgeles de PNIPAM-PEG añadiendo a las muestras 1 y 10 mM de NaNO_3 a la disolución (Fig. 5.3.2). De la Fig. 5.3.2 se puede observar que el diámetro hidrodinámico de las partículas de microgel de PNIPAM-PEG es prácticamente independiente de la concentración de NaNO_3 , obteniéndose una pequeña reducción de unos 100 nm para $T < VPTT$ y 50 nm para $T > VPTT$, provocado por el carácter más hidrófobo de los polímeros de PEG en presencia de NaNO_3 . Recordando las Fig. 4.2.1 y Fig. 5.2.1, el aumento de la temperatura, y consecuentemente la reducción de D_h (Fig. 4.1.1 y Fig. 5.1.1), provoca un desplazamiento de las isothermas hacia áreas normalizadas menores. Pero en la Fig. 5.3.1 vemos que en todos los casos donde hay NaNO_3 en la subfase, la isoterma se desplaza hacia áreas normalizadas mayores respecto al agua pura, poniendo de manifiesto que la interacción electrostática prevalece frente a esta pequeña diferencia en tamaño. Por otro lado, la influencia del electrolito en estos microgeles difiere bastante de los resultados obtenidos con los microgeles de PNIPAM (Fig. 4.4.2B y Fig. 5.3.2B). Para $T < VPTT$, la movilidad electroforética μ_e de las partículas de microgel de PNIPAM-PEG se mantiene constante independientemente de las concentraciones de NaNO_3 . Cabe mencionar que las partículas de microgel de PNIPAM-PEG a estas temperaturas en agua pura tiene una μ_e menor en valor absoluto que los microgeles de PNIPAM, y con valores cercanos a cero, por lo que el efecto de apantallamiento de carga en este caso puede ser inapreciable. Observando la Fig. 5.3.2B vemos que para el estado hinchado, el desplazamiento de las isothermas de compresión obtenidas en las Fig. 5.3.1A no proviene de una diferencia en la carga efectiva de las partículas de microgel, sino de efectos específicos de los polímeros de PEG con el NaNO_3 . Pero es interesante notar que las isothermas de compresión con 1 y 10 mM a 23°C están superpuestas entre ellas (Fig. 5.3.1A), al igual que los valores de μ_e obtenidos en las mismas condiciones (Fig. 5.3.2B). En cambio, para $T > VPTT$ se observa en la Fig. 5.3.2B que μ_e si depende de la concentración de electrolito. A diferencia de los microgeles de PNIPAM, en este caso si se observa una disminución continua del $|\mu_e|$ en función de la concentración de electrolito en el medio.

Este resultado justifica el razonamiento realizado para los resultados de los microgeles de PNIPAM, en el cual valores similares de μ_e correspondían a isothermas de compresión superpuestas. De hecho, esto se cumple también para microgeles de PNIPAM-PEG en estado hinchado en presencia de NaNO_3 . En este caso ambas isothermas $\pi - A$ se superponen y presentan valores similares de μ_e . Para el estado colapsado, al no tener la misma μ_e para 1 y 10 mM, las isothermas $\pi - A$ se desplazan. Este desplazamiento es más acusado para 10 mM debido a un mayor apantallamiento de la carga, concordando con los resultados de Geisel et al. donde los microgeles más cargados se comprimen con

mayor facilidad [109]. Además, también se puede observar en la Fig. 5.3.1B la interacción específica del PEG con el NaNO_3 , dando lugar al mismo desplazamiento hacia áreas mayores de las isoterma $\pi - A$ en los estados hinchado y colapsado (Fig. 5.3.1A), complementando los efectos derivados por de la interacción electrostática.

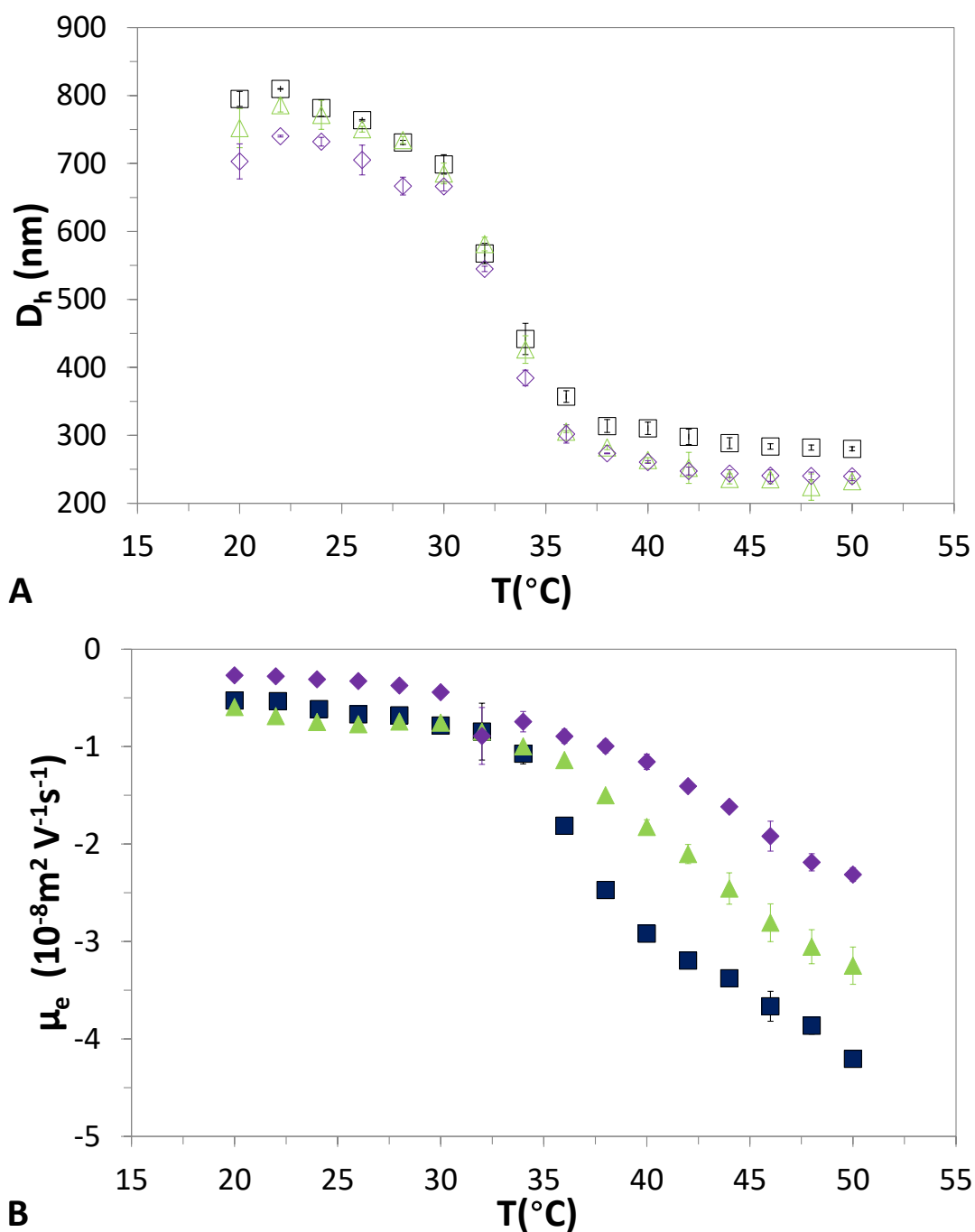


Fig. 5.3.2. A) Diámetro hidrodinámico (símbolos abiertos) y B) movilidad electroforética (símbolos sólidos) de microgeles de PNIPAM-PEG en función de la temperatura. Cuadrados negros: agua Milli-Q, Triángulos verdes: NaNO_3 1 mM, Rombos púrpuras: NaNO_3 10 mM.

Con los microgeles de PNIPAM y PNIPAM-PEG hemos podido observar que el comportamiento de los microgeles en la interfaz aire-agua no solo depende de la electrostática, sino que otros efectos específicos entre los polímeros, electrolito y subfase también pueden afectar a las características interfaciales. Por ejemplo, los polímeros de PEG muestran propiedades muy distintas cuando está en contacto con distintas sales, y esto es un campo muy investigado para comprender los ATPS [131,133,135,137,138], las cuales también pueden afectar a las características interfaciales como se ha visto en este estudio. Por último, se ha podido comprobar con estos dos sistemas de microgeles que la carga efectiva y las propiedades interfaciales de las partículas de microgel están fuertemente relacionadas, y en concreto para estos dos microgeles, bajo las mismas condiciones experimentales la carga efectiva puede predecir la posición relativa de las isothermas resultantes.

CAPÍTULO 6: Lípidos: DPPC, DPPS y Colesterol

El efecto de condensación y la capacidad del colesterol para inducir orden dentro de las cadenas de hidrocarburos de muchas películas lipídicas es un tema de investigación muy estudiado en la bibliografía mediante las películas de Langmuir [62–64]. El colesterol es un componente importante en las membranas celulares de la mayoría de los vertebrados y es un componente principal de la membrana plasmática de las células eucariotas. También interviene en procesos celulares que tienen lugar en las membranas como el transporte de moléculas o procesos de señalización [52–54]. Por otro lado, el colesterol también modula la fluidez de las membranas celulares, ya que su efecto de condensación reduce los defectos e incrementa la densidad de las monocapas, lo que afecta a la organización de la monocapa dotándole de otras propiedades [139,140].

Por ejemplo, se ha investigado recientemente el papel que desempeña el colesterol en la organización de las membranas biológicas que rodean las gotas de lípidos en la leche, llamadas membrana de glóbulos de grasa de la leche [141–144]. En estos estudios se observa que la concentración de colesterol facilita la separación de fases y reduce la resistencia mecánica a la ruptura de fases coexistentes en el modelo de bicapa de la membrana de los glóbulos de grasa. Esto es debido a que el colesterol afecta fuertemente la organización de las monocapas de lípidos en esta membrana al condensar las moléculas de lípidos polares, disminuyendo la diferencia de altura entre los dominios en las fases no condensadas y promoviendo la formación de numerosos dominios pequeños en la fase condensada.

Numerosos estudios sobre las interacciones de lípido-colesterol utilizan técnicas complementarias como las películas de Langmuir, el Microscopio de Fuerza Atómica (AFM) y el Microscopio de Ángulo de Brewster (BAM) [145–149]. Aunque estas técnicas proporcionan una correlación directa entre la topografía y el mapeo de fuerzas, el mecanismo exacto de la interacción del colesterol con los lípidos individuales aún no se comprende completamente. Lo que se sabe a ciencia cierta es que la presencia del colesterol aumenta el orden de la cohesión y del empaquetamiento de los lípidos vecinos, a la vez que contribuye al incremento de la fluidez de la bicapa facilitando, por ejemplo, la difusión lateral [150,151]. Esta doble funcionalidad del colesterol en las películas lipídicas se puede controlar mediante la presencia de iones en la subfase líquida. Por ejemplo, Korchowicz et al. demostraron que la presencia de iones de Na^+ y Ca^{2+} incrementa la condensación, la estabilidad y la densidad de empaquetamiento de las monocapas formadas por el lípido 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3 fosfoetanolamina (DPPE) en presencia del colesterol, observando un efecto mayor para el caso del Ca^{2+} [152]. Otros autores como Wydro et al. estudiaron monocapas que contenían colesterol, fosfatidiletanolamina saturada (PE) y fosfatidilserina (PS) en presencia de Na^+ ,

observando que este ion mejoraba las interacciones entre los lípidos [153]. En estos estudios se ha visto que la presencia de iones en el medio provoca cambios significativos en las estructuras de la bicapa lipídica con colesterol. Es más, tanto para las monocapas como las bicapas, las interacciones de los lípidos con los iones dependen fuertemente de la naturaleza del ion, del grupo lipídico y del grado de saturación de las cadenas de hidrocarburos lipídicos [154–161]. En esta área, se ha trabajado recientemente en el grupo de investigación el efecto de diferentes sales (NaI, NaCl, CaCl₂, y MgCl₂) en monocapas de colesterol puro, tanto de forma experimental como teórica [162]. En ese trabajo se realizaron medidas de isothermas de compresión mediante la balanza de Langmuir en presencia de los distintos iones, junto a simulaciones de dinámica molecular. Con estas técnicas se observó que las isothermas de compresión resultante dependían de la naturaleza del ion alterando la forma y las características de la isoterma. Concretamente, los resultados experimentales de ese trabajo mostraron que las isothermas $\pi - A$ eran cualitativamente similares para las sales NaCl y CaCl₂, pero substancialmente diferentes para las formas observadas con las sales de MgCl₂ y NaI. El hecho de que las isothermas muestren diferencias para cada electrolito hace que sea difícil proponer una serie o clasificación del efecto de los iones, desde los que tienen más impacto a los que tienen menor impacto sobre las isothermas, al contrario de lo que se suele hacer para los efectos específicos de los iones. Por otro lado, las simulaciones realizadas de dinámica molecular también revelaron evidencias claras de efectos iónicos específicos y proporcionaron detalles a nivel molecular sobre interacciones específicas de iones con las monocapas de colesterol puro.

Por lo tanto, en esta parte de la tesis se pretende extender y profundizar en los resultados previos de las interacciones del colesterol, realizando una caracterización superficial basada en medidas de isothermas de compresión y la visualización de las monocapas mediante el Microscopio de Ángulo de Brewster. Para este estudio se evalúa la interacción del colesterol con la mezcla de los lípidos 1,2-dipalmitoil-snglicero-3-fosfatidilcolina (DPPC) y 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (DPPS), dos fosfolípidos que forman las membranas celulares, en presencia de diferentes iones en la subfase. La cantidad de colesterol en las muestras es de 0, 30%, 70% y 100%, y las sales utilizadas son NaCl, CaCl₂, MgCl₂ y LaCl₃, con el objetivo de investigar la condensación de los lípidos modelo por el colesterol y estudiar cómo las interacciones específicas con los iones pueden alterar las propiedades interfaciales.

6.1 Isothermas de Compresión

La isoterma de compresión de una monocapa lipídica proporciona una caracterización fundamental de las propiedades interfaciales de la película, incluyendo información en las interacciones laterales así como la elasticidad superficial de Gibbs (ϵ_0) de la

monocapa. Para realizar estos experimentos, las muestras de lípidos, una vez preparadas con una concentración de 0.5 g L^{-1} , se conservan en congelador por debajo de los 0°C . Antes de depositar la muestra en la superficie se debe dejar la muestra a temperatura ambiente durante 15 minutos. Cuando la muestra ya está a temperatura ambiente de 23°C , se depositan $50 \mu\text{L}$ en la superficie utilizando una microjeringa de Hamilton®. Tras 20 minutos de equilibrio para asegurar que todo el disolvente se evapore, la isoterma de presión superficial-área ($\pi - A$) se registra mediante compresión uniaxial simétrica de las barreras a una velocidad constante de 5 mm min^{-1} . En estas isotermas de compresión se representa la π frente al área molecular media (MMA). En estas isotermas, el “*lift off area*” corresponde a la extrapolación a 0 de la curva en el estado líquido-expandido (LE), el área molecular límite (LMA) corresponde a la extrapolación a 0 de la curva en el estado líquido-condensado (LC), y la presión superficial de colapso (π_{coll}) es el valor de π en el estado de compresión más alto de la monocapa antes de que colapse.

En la Fig.6.1.1 se muestran las isotermas obtenidas para las distintas mezclas de lípidos (las proporciones exactas están en la sección 3.2 de materiales) en la interfaz de aire-agua. Para los lípidos puros de DPPC:DPPS sin colesterol (línea de puntos azul) se pueden apreciar claramente los distintos estados por los que adopta la monocapa en la compresión. Al inicio de la compresión la monocapa adopta un estado gaseoso (G) donde los valores de π son cercanas a 0. Al comprimir, se llega a un segundo estado de líquido-expandido (LE) en el cual las moléculas de lípido empiezan a interactuar entre sí, caracterizado por un aumento suave de π y valores bajos de ϵ_0 . El tercer estado de líquido-condensado (LC) se caracteriza por un aumento brusco de π , en el cual las moléculas empiezan a compactarse dando lugar a valores más altos de ϵ_0 . Se puede observar también una región de coexistencia en la transición de fase entre LE-LC caracterizada por una zona plana de valores de π . Al comprimir más allá del estado LC la monocapa colapsa a un estado tridimensional en π_{coll} .

Utilizando la misma metodología se obtienen las isotermas $\pi - A$ con diferentes electrolitos en la subfase de agua, con la concentración tal que todas las disoluciones posean la misma fuerza iónica de 15 mM . De esta forma, centramos el estudio en las interacciones específicas de cada electrolito con los lípidos. En la Fig. 6.1.2 se muestran las isotermas $\pi - A$ de las diferentes muestras de DPPC:DPPS:Colesterol en la interfaz aire-agua en presencia de los distintos electrolitos. Observando las Figs. 6.1.1 y 6.1.2 se ve que la adición de colesterol en las muestras de lípidos desplaza las isotermas hacia áreas moleculares menores, en proporción a la cantidad de colesterol presente, lo que indica el efecto de condensación de las monocapas lipídicas por el colesterol como menciona la bibliografía. Sin embargo, este efecto de la condensación en subfases con electrolito depende de la naturaleza del ion como se puede apreciar de la Fig. 6.1.2. En la Tabla 6.1.1 se muestran los valores de LMA, π_{coll} , y ϵ_0 de cada monocapa representada

en la Fig. 6.1.2 para cada electrolito, lo que permitirá analizar los efectos específicos de cada ion de forma más detallada.

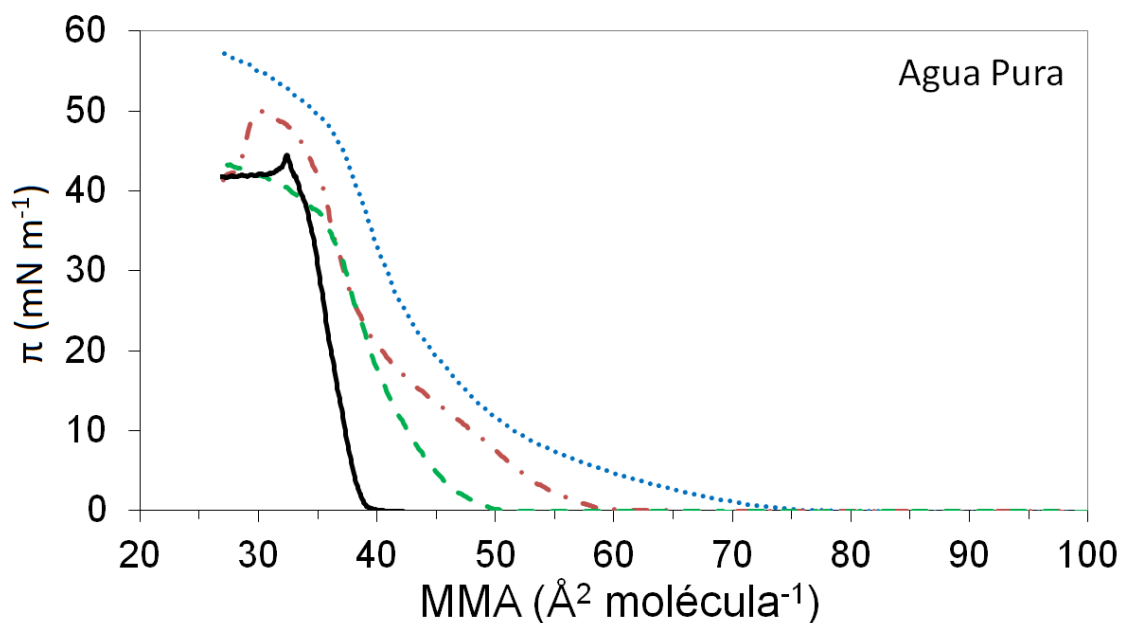


Fig. 6.1.1. Isotermas de compresión de DPPC:DPPS:Coolesterol en la interfaz aire-agua. DPPC:DPPS (línea de puntos azul), <DPPC:DPPS:Coolesterol-30 (línea roja discontinua con puntos), DPPC:DPPS:Coolesterol-70 (línea verde discontinua), Coolesterol (línea negra continua). Las isotermas mostradas son el valor medio de tres experimentos independientes con una desviación estándar <5%, a T=23°C.

La Fig. 6.1.2A muestra el impacto del NaCl en el efecto de condensación del coolesterol en las monocapas de DPPC:DPPS. Estas isotermas muestran que la presencia de coolesterol condensa las monocapas de forma gradual en función de su concentración, siendo la isoterma de DPPC:DPPS:Coolesterol-30 cerca de la isoterma de DPPC:DPPS 4:1 y la isoterma de DPPC:DPPS:Coolesterol-70 cerca de la isoterma de coolesterol puro. Para la isoterma de DPPC:DPPS 4:1 se puede observar la coexistencia de fase entre LE-LC al igual que se observa en la Fig. 6.1.1 para la subfase de agua pura, siendo las isotermas con NaCl las más parecidas a las obtenidas en agua pura (Fig.6.1.1 y Fig. 6.1.2A).

La presencia de coolesterol en la muestra DPPC:DPPS:Coolesterol-30 reduce la región de coexistencia de fase de LE-LC en DPPC:DPPS 4:1, manteniendo un LMA similar. Por otro lado, la muestra de DPPC:DPPS:Coolesterol-70 y la de coolesterol puro muestran un comportamiento muy similar con isotermas casi superpuestas, dando valores similares de LMA. Consecuentemente, el LMA de las monocapas lipídicas en presencia de iones Na⁺ decrece en función de la concentración de coolesterol hasta coincidir con la monocapa de coolesterol puro. Esto también se observa para los valores de π_{coll} , mientras que ϵ_0 aumenta con la concentración de coolesterol.

La Fig. 6.1.2B muestra el efecto de condensación del colesterol a las monocapas de DPPC:DPPS en presencia de Ca^{2+} . En este caso, las muestras DPPC:DPPS:Colesterol-30 y DPPC:DPPS:Colesterol-70 muestran un estado LE muy reducidos con valores de LMA similares entre ambas muestras, pero siendo mayores que para la monocapa de colesterol puro. Los sistemas ternarios también muestran un valor de π_{coll} menor en comparación con los dos sistemas puros. Mientras que la ϵ_0 en este caso muestra un comportamiento más complejo, en el cual la elasticidad decrece suavemente para la muestra de DPPC:DPPS:Colesterol-30, y después aumenta para DPPC:DPPS:Colesterol-70 hasta casi igualar el valor para el colesterol puro.

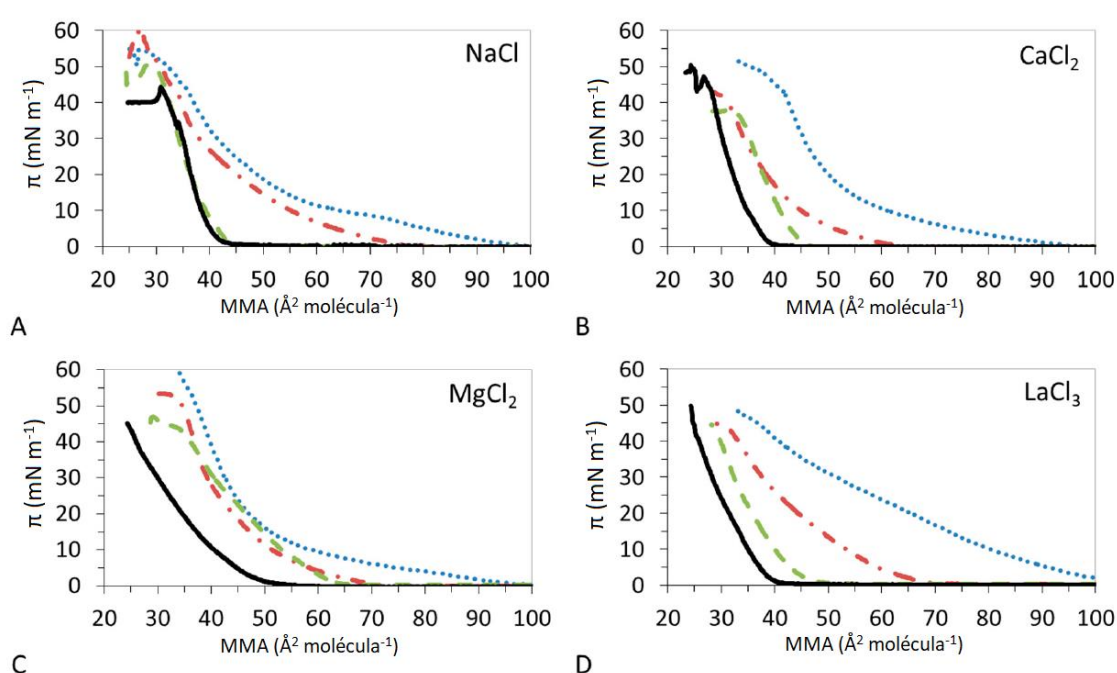


Fig. 6.1.2. Isotermas de compresión de DPPC:DPPS:Colesterol en la interfaz aire-agua con fuerza iónica $I = 15$ mM en la subfase ((A) NaCl (B) CaCl_2 (C) MgCl_2 (D) LaCl_3). DPPC:DPPS (línea de puntos azul), DPPC:DPPS:Colesterol-30 (línea roja discontinua con puntos), DPPC:DPPS:Colesterol-70 (línea verde discontinua), Colesterol (línea negra). Las isotermas mostradas son el valor medio de tres experimentos independientes con una desviación estándar $<5\%$, a $T=23^\circ\text{C}$.

Los efectos provocados por el ion Mg^{2+} en las monocapas lipídicas son muy diferentes, pese a tener la misma valencia que el Ca^{2+} . Para el ion Mg^{2+} las isotermas de DPPC:DPPS:Colesterol-30 y DPPC:DPPS:Colesterol-70 son muy similares que la isoterma de DPPC:DPPS 4:1, y el efecto principal de la presencia de colesterol parece limitarse a una pequeña reducción del estado LE. Los valores de LMA para los sistemas ternarios permanecen cercanos a los obtenidos para los lípidos puros, siendo ligeramente mayores. Por otro lado, las π_{coll} para los sistemas ternarios tienen valores intermedios entre las muestras de lípido puro, mientras que la ϵ_0 de la película ahora decrece con la

concentración de colesterol, indicando un estado menos cohesivo de la película por la presencia de colesterol.

Por último, la presencia de ion La^{3+} su presencia en la subfase afecta la forma de la isoterma de DPPC:DPPS 4:1 y colesterol puro (Fig. 6.1.2D), afectando también el efecto de condensación del colesterol, que en presencia de este ion aumenta de forma gradual con la concentración de colesterol, reduciendo los valores de LMA de forma progresiva. Las formas de las isotermas medidas en este sistema son muy similares, todas con un incremento suave de la presión superficial, y con valores cercanos de π_{coll} . La presencia de La^{3+} también reduce la ϵ_0 de la monocapa de colesterol pura como hace el ion Mg^{2+} , sin embargo, el efecto de condensación del colesterol sobre las películas de DPPC:DPPS en presencia de La^{3+} mejora nuevamente la elasticidad de la película, en contraste con el Mg^{2+} , y similar a Na^+ , mientras que el Ca^{2+} muestra un comportamiento más complejo.

NaCl 15 mM			
Muestra	LMA (\AA^2 molécula$^{-1}$)	π_{coll} (mN m$^{-1}$)	ϵ_0 (mN m$^{-1}$)
DPPC:DPPS 4:1	52 ± 5	59 ± 5	134 ± 20
DPPC:DPPS:Colesterol-30	48 ± 5	59 ± 3	150 ± 10
DPPC:DPPS:Colesterol-70	40 ± 2	53 ± 4	180 ± 25
Colesterol	40 ± 2	44 ± 2	245 ± 20
CaCl₂ 5 mM			
Muestra	LMA (\AA^2 molécula$^{-1}$)	π_{coll} (mN m$^{-1}$)	ϵ_0 (mN m$^{-1}$)
DPPC:DPPS 4:1	55 ± 1	52 ± 1	190 ± 10
DPPC:DPPS:Colesterol-30	48 ± 2	42 ± 2	150 ± 15
DPPC:DPPS:Colesterol-70	45 ± 2	38 ± 2	210 ± 15
Colesterol	40 ± 2	46 ± 1	230 ± 15
MgCl₂ 5 mM			
Muestra	LMA (\AA^2 molécula$^{-1}$)	π_{coll} (mN m$^{-1}$)	ϵ_0 (mN m$^{-1}$)
DPPC:DPPS 4:1	50 ± 5	64 ± 1	174 ± 20
DPPC:DPPS:Colesterol-30	55 ± 5	50 ± 1	180 ± 20
DPPC:DPPS:Colesterol-70	56 ± 5	50 ± 2	80 ± 20
Colesterol	45 ± 1	46 ± 1	140 ± 20
LaCl₃ 2.5 mM			
Muestra	LMA (\AA^2 molécula$^{-1}$)	π_{coll} (mN m$^{-1}$)	ϵ_0 (mN m$^{-1}$)
DPPC:DPPS 4:1	85 ± 3	47 ± 5	115 ± 20
DPPC:DPPS:Colesterol-30	64 ± 1	50 ± 5	100 ± 20
DPPC:DPPS:Colesterol-70	45 ± 2	45 ± 5	170 ± 20
Colesterol	40 ± 1	45 ± 1	150 ± 20

Tabla 6.1.1. Valores de área molecular límite (LMA), presión de colapso (π_{coll}), y elasticidad máxima de Gibbs (ϵ_0) para las monocapas de DPPC:DPPS:Colesterol depositadas en subfases con 15 mM de NaCl (Fig. 13A), 5 mM de CaCl₂ (Fig. 13B), 5 mM de MgCl₂ (Fig. 13C), y 2.5 mM de LaCl₃ (Fig. 13D).

6.2 Imágenes de Micro-BAM

Las Fig. 6.2.1 y Fig. 6.2.2 muestran un conjunto de imágenes tomadas con el Micro-BAM de las monocapas mostradas en la Fig. 6.1.2 bajo las mismas condiciones experimentales.

La Fig.6.2.1 muestra una serie de imágenes representativas de Micro-BAM tomadas en los estados de compresión más bajos de las monocapas mostradas en la Fig. 6.1.2, con $\pi < 2 \text{ mN m}^{-1}$, o lo que es lo mismo, a altas MMA. A estas presiones superficiales, la monocapa de lípidos pasa por una transición de fase de primer orden mientras la densidad superficial va aumentando debido a la reducción del MMA. Los diferentes estados por las que pasa las monocapas lipídicas son distinguibles en las imágenes de Micro-BAM por una diferencia en la reflectividad. Los estados gaseosos, LE y LC de las películas lipídicas difieren en la orientación de las moléculas, y por lo tanto, en el grosor de la monocapa. El estado de la monocapa más grueso de LC aparece más claro (más reflexiva) que el estado más fino de LE o gaseosa las cuales aparecen más oscuras (menos reflexiva).

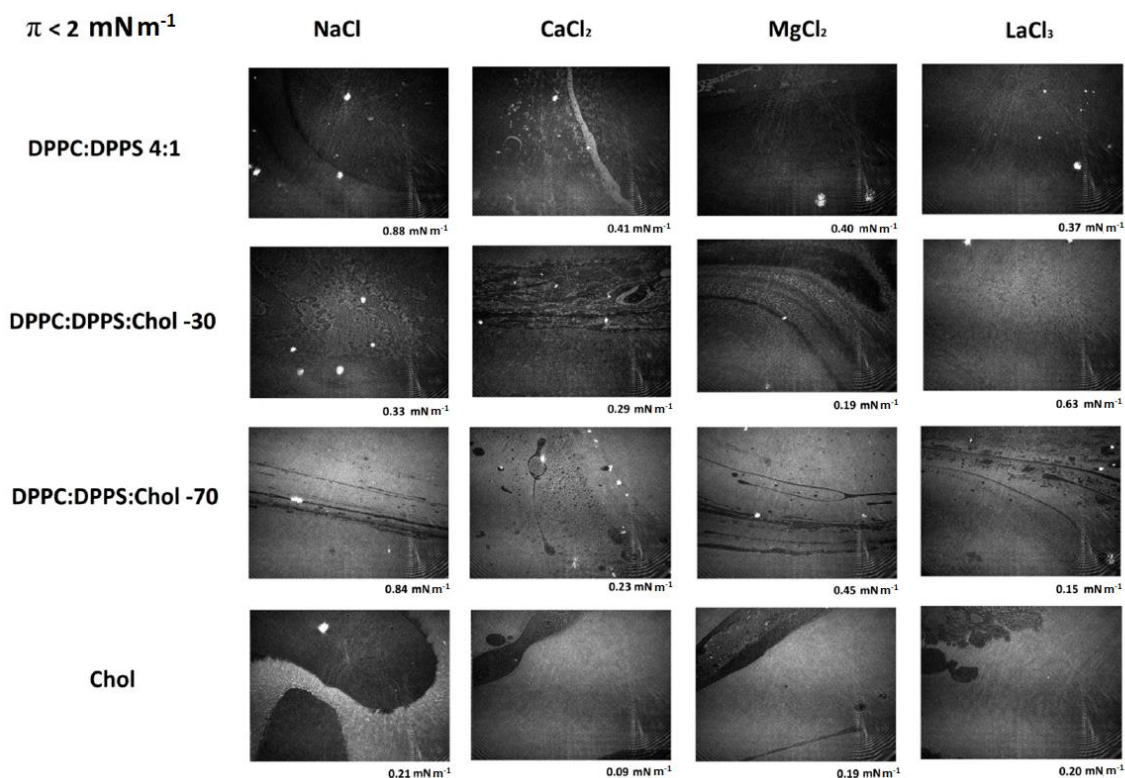


Fig. 6.2.1. Imágenes de Micro-BAM del efecto del electrolito en monocapas de DPPC:DPPS:colesterol en estados de compresiones bajas ($\pi < 2 \text{ mN m}^{-1}$). Las imágenes corresponden a las isotermas $\pi - A$ trazadas en la Figura 6.1.2. Las dimensiones de cada imagen son 3.6 mm \times 4.0 mm.

Durante una transición de fase, se pueden observar dominios de diferentes niveles de grises de forma simultánea en las imágenes de Micro-BAM (Fig. 6.2.1 y Fig. 6.2.2). En la Fig. 6.2.1, la claridad de las imágenes aumenta a medida que aumenta la cantidad de colesterol en la mezcla. En el caso de colesterol puro, se pueden ver grandes dominios fluidos de fases coexistentes de gas-LE (oscuro) y LC (claro), correspondiente a una transición de fase de segundo orden. Estos dominios también aparecen en los sistemas compuestos por DPPC:DPPS:colesterol, cuya frecuencia aumenta con la concentración de colesterol en el sistema, mientras que son apenas visibles para la muestra de DPPC:DPPS 4:1 puro.

La Fig. 6.2.2 muestra una serie de imágenes representativas de Micro-BAM tomadas en los estados de compresión más altos de las monocapas mostradas en la Fig. 6.1.2, con $\pi > 35 \text{ mN m}^{-1}$, o es lo mismo, a MMA bajos cerca del colapso. El MMA ahora es muy pequeño y los lípidos en la monocapa están muy empaquetados. Las imágenes de Micro-BAM revelan la presencia de puntos claros a medida que aumentamos la cantidad de colesterol en la mezcla. Las monocapas de compuestos insolubles como estos lípidos se pueden comprimir para formar estructuras muy compactas a bajas MMA.

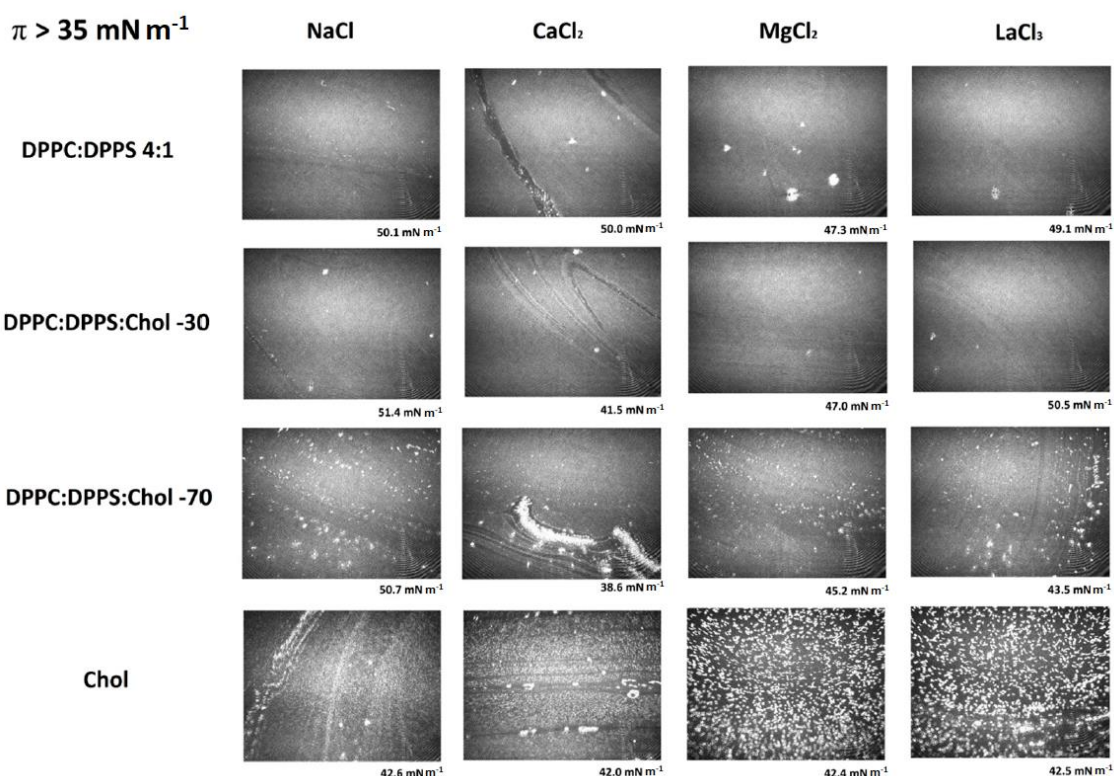


Fig. 6.2.2. Imágenes de Micro-BAM del efecto del electrolito en monocapas de DPPC:DPPS:colesterol en estados de compresiones altas ($\pi > 35 \text{ mN m}^{-1}$). Las imágenes corresponden a las isothermas $\pi - A$ trazadas en la Figura 6.1.2. Las dimensiones de cada imagen son $3.6 \text{ mm} \times 4.0 \text{ mm}$.

Más allá de la densidad superficial máxima, la monocapa comienza a torcerse y sufre un colapso donde aparecen una variedad de estructuras colapsadas. Las imágenes del colapso de una monocapa de colesterol puro concuerdan con otros resultados de la bibliografía, donde se muestra las estructuras colapsadas como dominios y cristales claras [145,152]. La aparición de manchas muy claras, o blancas para las muestras de DPPC:DPPS:Colesterol podría ser indicativo del cambio de orientación de las moléculas debido a la condensación por colesterol. Estas manchas blancas solo aparecen en presencia de colesterol a medida que avanza la condensación y son más visibles en el caso del Ca^{2+} debido a la alta condensación alcanzada.

6.3 Efecto del electrolito

Para observar de forma más detallada los efectos específicos de los iones en el efecto de condensación del colesterol sobre los lípidos DPPC:DPPS, se representan nuevamente en la Fig. 6.3.1 las isothermas de la Fig. 6.1.2, ahora agrupando las isothermas de la misma muestra con distintos iones en el medio.

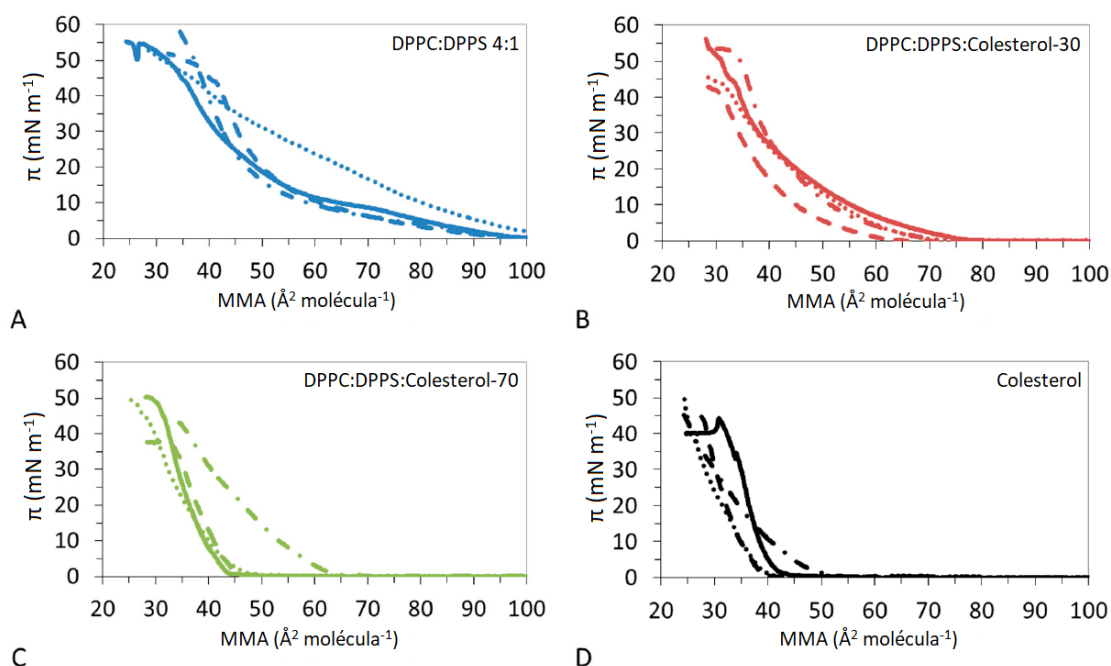


Fig. 6.3.1. Isothermas de compresión de DPPC:DPPS:Colesterol en la interfaz aire-agua con fuerza iónica $I = 15$ mM en la subfase de las distintas monocapas lipídicas ((A) DPPC:DPPS 4:1 (B) DPPC:DPPS:Colesterol-30 (C) DPPC:DPPS:Colesterol-70 (D) Colesterol). 15 mM NaCl (líneas continuas), 5 mM CaCl_2 (líneas discontinuas), 5 mM MgCl_2 (líneas discontinuas con puntos), 2.5 mM LaCl_3 (líneas de puntos).

La Fig. 6.3.1A muestra como la monocapa sin colesterol de DPPC:DPPS 4:1 presenta claramente una transición de fase entre LE-LC en presencia de cualquier ion, salvo para

el ion La^{3+} donde desaparece esta transición. Este resultado corrobora los resultados de ϵ_0 mostrados en la Tabla 6.1.1, donde se ha obtenido para las otras 3 sales valores mayores de ϵ_0 que para el La^{3+} . En la Fig. 6.3.1B se puede observar como las monocapas de DPPC:DPPS:Colesterol-30 permanecen en el estado LE en todo el proceso de compresión independientemente del electrolito presente en la subfase, pero se puede ver que la ϵ_0 sigue siendo menor en presencia del ion La^{3+} . Para la Fig. 6.3.1C se puede ver claramente que existe una interacción específica del Mg^{2+} con la muestra DPPC:DPPS:Colesterol-70 en comparación con los otros iones. En presencia de Mg^{2+} , la monocapa permanece en el estado LE en toda la compresión mientras que para los otros iones la monocapa pasa del estado gaseoso al estado LC bruscamente. Esta interacción también puede ser originada por interacciones específicas del Mg^{2+} con el colesterol por su alta concentración. Por último, en la Fig. 6.3.1D se pone de manifiesto que las monocapas de colesterol puro permanecen en el estado gaseoso durante gran parte del proceso de compresión, hasta que la monocapa entra de una forma muy brusca en el estado LC. Aunque para el caso del Mg^{2+} se puede ver que el cambio de estado se produce más suavemente comparado con otras sales o en agua pura, dando nuevamente indicios de que el Mg^{2+} interacciona de forma específica con el colesterol.

En estos experimentos hemos demostrado que el efecto de condensación del colesterol persiste aun en presencia de sal en el medio, independientemente de su naturaleza como se puede ver en la Fig. 6.1.2. Sin embargo, también hemos demostrado que la presencia del ion afecta significativamente en cómo se da lugar el efecto de la condensación del colesterol. A partir de estos datos experimentales, podemos ver que el efecto del electrolito en monocapas lipídicas en mezcla de lípidos y colesterol es doble. Por una parte, la presencia de electrolito es capaz de modificar la estructura de las monocapas lipídicas en ausencia de colesterol como se puede ver en la Fig. 6.1.2 tanto para los iones divalentes como para el La^{3+} . Por otra parte, cuando hay colesterol en la monocapa de lípidos, los iones empiezan a competir con el colesterol en su interacción con los otros lípidos, y en este caso concreto formado por DPPC:DPPS:Colesterol, las propiedades superficiales resultantes dependen en gran medida de la naturaleza del ion así como de la concentración de colesterol (Fig. 6.3.1B y C).

En la bibliografía existen algunos trabajos similares. Por ejemplo, Ross et al. investigaron los efectos que produce el Ca^{2+} en las monocapas de DPPC:DPPS 4:1 en la interfaz aire-agua, utilizando microscopio de fluorescencia junto a la balanza de Langmuir y microscopio electrónico de barrido (SEM) [163]. Comprobaron que el ion Ca^{2+} se unía a las moléculas de DPPS con carga negativa, sin embargo, esta interacción específica del ion con el DPPS no afectaba las isotermas $\pi - A$ de DPPC:DPPS 4:1 en presencia de Ca^{2+} , manteniendo la forma de la isoterma de acuerdo con los resultados en la Fig. 6.1.2B. Por otro lado, la presencia del ion trivalente La^{3+} afecta significativamente la forma de las isotermas de los lípidos (Fig. 6.1.2D) en contraste con los iones Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} . Este efecto puede deberse a un modo de unión diferente del catión trivalente a los lípidos

PC y PS en comparación con los cationes monovalentes y divalentes como apunta la bibliografía [154,156]. Las diferentes constantes de unión están relacionadas con la diferente capacidad de deshidratación de cada ion en diferentes lípidos. En el caso de La^{3+} , las mediciones calorimétricas muestran que la unión de este catión a los lípidos PS es endotérmica y está impulsada por la entropía [66]. La contribución entrópica dominante se debe principalmente a la liberación de moléculas de agua de los grupos de lípidos. Para el caso de los lípidos de PC, las mediciones calorimétricas dan valores de energía libre mayores que en el caso de PS.

Sin embargo, estas interacciones específicas entre ion-lípido cambian drásticamente cuando se añade colesterol a la película de lípidos. El efecto de condensación provocado por las moléculas de colesterol cuando interactúan con otros lípidos, está directamente relacionado con la orientación de las moléculas de colesterol [60,151,164,165]. La localización de las moléculas de colesterol en las monocapas lipídicas depende en gran medida de la carga eléctrica del grupo hidrófilo del lípido más que del orden de las colas de hidrocarburo [166]. La interacción electrostática tiende a potenciar la estabilidad de las películas lipídicas, siendo esta interacción eléctrica modulada por la presencia de cationes. En este sentido, la presencia de sal en la subfase juega un papel importante aumentando la condensación, la elasticidad, la estabilidad y la densidad de empaquetamiento de la monocapa, especialmente para el caso de cationes divalentes [62]. Estos resultados se reflejan en los datos de las Fig. 6.1.2-Fig. 6.3.1 y en valores de la tabla. 6.1.1, donde se puede apreciar un efecto mayor de los cationes divalentes sobre las estructuras de las monocapas en comparación con los cationes monovalente y trivalente. En particular, los resultados obtenidos con el Mg^{2+} indican que este ion puede debilitar el proceso de condensación inducido por el colesterol (Fig. 6.1.2C). Además, el comportamiento irregular del ϵ_0 de la monocapa mostrada en la tabla. 6.1.1 es consecuencia de efectos opuestos provocados por la presencia de colesterol y Mg^{2+} que compiten por interactuar con los lípidos de la monocapa. De la Fig. 6.1.2 también se puede apreciar que el Mg^{2+} es el único ion que desplaza la transición de fase de la isoterma de colesterol puro hacia MMA mayores. Indicando que la interacción específica del Mg^{2+} con el colesterol provoca un estado de empaquetamiento menos condensado de la monocapa.

Por su parte, el ion Ca^{2+} también muestra un comportamiento complejo cuando interactúa con los lípidos en presencia de colesterol. De la Tabla. 6.1.1 se puede ver que para este ion la ϵ_0 disminuye a concentraciones bajas de colesterol respecto de la monocapa de DPPC:DPPS pura, y aumenta progresivamente con la concentración de colesterol, acercándose a valores cercanos de la monocapa pura. Por otro lado, el efecto de la condensación que provoca el colesterol en las monocapas de DPPC:DPPS, en presencia de Ca^{2+} , no ocurre hasta que las monocapas alcanzan el estado de LC, provocado por interacciones específicas del Ca^{2+} con el colesterol y los lípidos.

CAPÍTULO 7: Ácido Hialurónico y Polidocanol

El ácido hialurónico es un candidato interesante como aditivo para mejorar la acción esclerosante del polidocanol en la escleroterapia por espuma, ya que esta molécula no presenta actividad superficial y mejora la viscosidad así como la estabilidad de la espuma [74]. Estudios realizados en el grupo de investigación utilizando técnicas como el método de la doble jeringa (formación de la espuma), microscopio óptico (estudio de la distribución de las burbujas), y el tensiómetro de Gota Pendiente (caracterización superficial) han permitido observar diferentes propiedades que dota el ácido hialurónico a las espumas estabilizadas por el polidocanol [167]. En este trabajo se estudió la estabilidad de la espuma de polidocanol puro y también en presencia de HA. Para el caso de polidocanol puro, se demostró que para concentraciones por debajo del 0.1% de polidocanol en la disolución no se formaba espuma, mientras que a partir de 0.5% de polidocanol se obtiene una estabilidad de la espuma casi constante con una vida media entre 200 – 250 segundos, coincidiendo con resultados de la bibliografía [72]. También se evaluó la concentración crítica de HA en el medio para poder apreciar efectos significativos en la espuma, ya que la concentración de aditivos en los medicamentos debe ser mínima. Se vio que por debajo de 0.3% de HA en la disolución no se observa efectos significativos de estabilidad, mientras que para concentraciones iguales o mayores mejoraba la estabilidad de la espuma de polidocanol, duplicando la vida media respecto al polidocanol puro (390 – 480 segundos). Conocer las propiedades interfaciales del polidocanol en presencia de HA permitiría saber las características que este polisacárido induce en las monocapas para futuras aplicaciones en la escleroterapia por espuma. En este capítulo se evalúan las monocapas de Polidocanol y el efecto del HA en la subfase, con el fin de dilucidar la naturaleza de la interacción obtenida a nivel interfacial.

7.1 Isotermas de Compresión

Para realizar las isotermas se prepara una disolución en agua Milli-Q de polidocanol con una concentración de 0.5 g L^{-1} , que se deposita en la subfase de agua pura, o en una subfase de agua con una concentración de HA de $3 \cdot 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ (0.3% de HA) mediante una micropipeta. Tras depositar la muestra de polidocanol en la superficie se deja el sistema en equilibrio durante 15 minutos, y posteriormente se comprime mediante compresión uniaxial simétrica a una velocidad constante de 10 mm min^{-1} . Para obtener toda la isoterma de compresión a temperatura ambiente se ha utilizado cantidades entre 10 – 200 μl de la disolución de polidocanol.

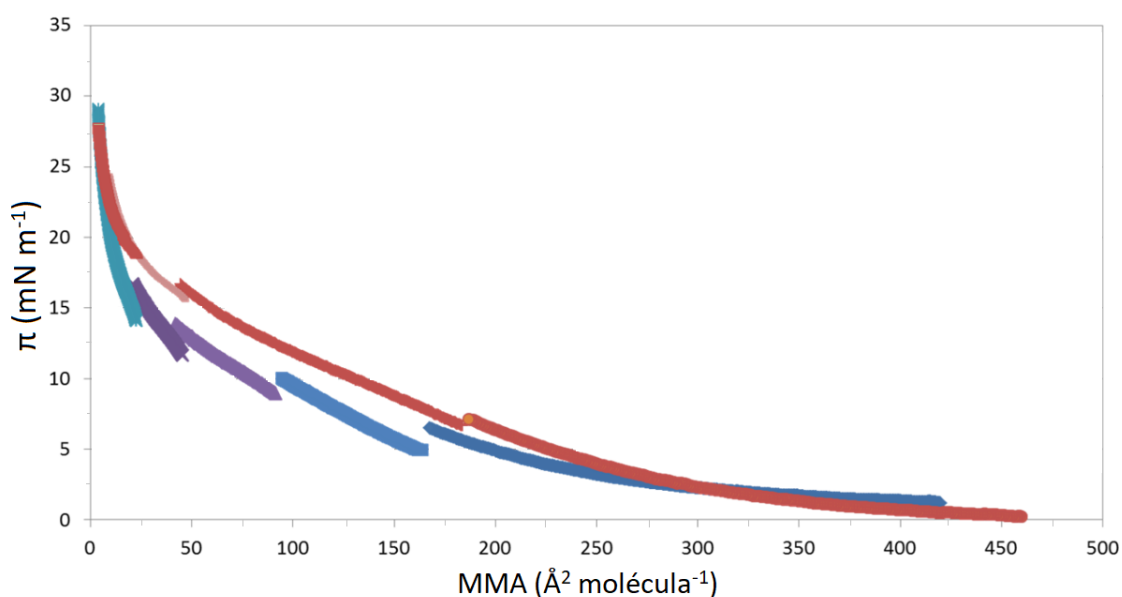


Fig. 7.1.1. Isothermas de compresión de monocapas de polidocanol en agua pura (líneas azules) y en subfase con HA $3 \cdot 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ (líneas rojas). Las isothermas mostradas son el valor medio de tres experimentos independientes con una desviación estándar $< 2\%$.

En la Fig. 7.1.1 se muestran las isothermas de compresión del polidocanol puro y en presencia de HA. Debido a la solubilidad del polidocanol en agua, se ha necesitado depositar distintas cantidades en la superficie para obtener la isoterma completa como se puede ver en la Fig. 7.1.1. Vemos que en ambas monocapas la presión superficial aumenta de forma continua y suave mientras se va reduciendo el MMA. Al principio de la compresión para valores altos de MMA, las moléculas de polidocanol permanecen en un estado gaseoso de la monocapa hasta que empiezan a interaccionar las moléculas entre ellas y empieza a aumentar la presión superficial. Ambas isothermas poseen un área de elevación inicial similar indicando que la interacción entre las moléculas de polidocanol son similares tanto para una subfase de agua pura como para una subfase con HA a densidades superficiales bajas, cuando la presión superficial es menor de 5 mN m^{-1} . Lo mismo ocurre cuando las densidades superficiales son muy altas, para presiones superficial mayores de 20 mN m^{-1} , donde ambas isothermas coinciden indicando que para altas densidades superficiales las interacciones entre moléculas de polidocanol son similares independientemente de la concentración de HA.

Sin embargo, para densidades superficiales intermedias con presión superficial entre 5 y 20 mN m^{-1} , la isoterma obtenida en subfase con HA aparece desplazada hacia áreas mayores que en subfase de agua pura. Esto demuestra que en presencia de HA las moléculas de polidocanol poseen mayor interacción lateral en la superficie. Este incremento de la interacción superficial puede ser debido a la existencia de interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de polidocanol con el HA en las cercanías

de la superficie [66]. Estas isothermas también muestran que la presencia de HA en la subfase reduce la solubilidad del polidocanol, otorgando mayor estabilidad a la monocapa y a la espuma resultante. Consecuentemente, se han necesitado menos medidas para obtener la isoterma de compresión completa con HA como se puede ver en la Fig. 7.1.1.

7.2 Imágenes de Micro-BAM

Las imágenes de Micro-BAM permiten analizar los cambios morfológicos de la monocapa a medida que se está comprimiendo y observar los efectos de la presencia del HA sobre la monocapa de polidocanol. En la Fig. 7.2.1 se muestran imágenes de Micro-BAM para el sistema puro de polidocanol y en presencia de HA, a distintas presiones superficiales. Para densidad superficiales bajas, con presiones superficiales menores de 5 mN m^{-1} , se observan imágenes homogéneas y oscuras, que corresponde con un estado gaseosa de la monocapa donde hay pocas interacciones entre moléculas y una monocapa delgada en la superficie. Cuando se comprime el sistema y empieza aumentar π , las imágenes empiezan a ganar claridad debido al aumento de la reflectividad generado por una monocapa más gruesa. Para π alrededor de 12 mN m^{-1} , se aprecia este aumento de la claridad de la imagen, que es más notorio para el sistema en presencia de HA indicando un mayor grosor para esta monocapa, provocado por la reducción en la solubilidad del polidocanol. Aparte, con el ácido hialurónico se favorece la formación de agregados de polidocanol en la monocapa por el aumento de su carácter hidrófobo, por lo que se observan con mayor frecuencia a estas π puntos blancos en la monocapa. Por último, para presiones superficiales altas alrededor de 18 mN m^{-1} , las imágenes de Micro-BAM obtenidas para ambos sistemas son casi idénticas, mostrando características similares entre ambas monocapas a estas densidades superficiales. Estas imágenes concuerdan con los resultados de las isothermas de compresión obtenidas en la Fig. 7.1.1, donde a partir de estos valores de π , ambas isothermas concuerdan y solapan al final de la compresión.

A partir de estos resultados se puede concluir que la presencia de HA en las monocapas de polidocanol mejora su actividad superficial, reduciendo su solubilidad. Esto puede tener un importante efecto aumentando la estabilidad de la espuma resultante. Comparando el ácido hialurónico con otros agentes sin actividad superficial propuestos para mejorar la acción esclerosante del polidocanol, en la bibliografía se ha estudiado hasta ahora como candidatos la glicerina [66,72] y la Goma Xantana [72]. Estos sistemas sin actividad superficial tienen la ventaja de que aseguran la presencia del polidocanol en la superficie de las burbujas, maximizando la acción esclerosante. Nastasa et al. observaron que la presencia de glicerina o de xantano en la espuma mejora su estabilidad, debido al aumento de la viscosidad de la mezcla al igual que se ha visto con

el HA [72]. Sin embargo, estos agentes también aumentan el tamaño de las burbujas de la espuma. Este aumento de tamaño en la burbuja afecta fuertemente la acción esclerosante de la espuma ya que a mayor tamaño de burbuja, menor superficie de acción.

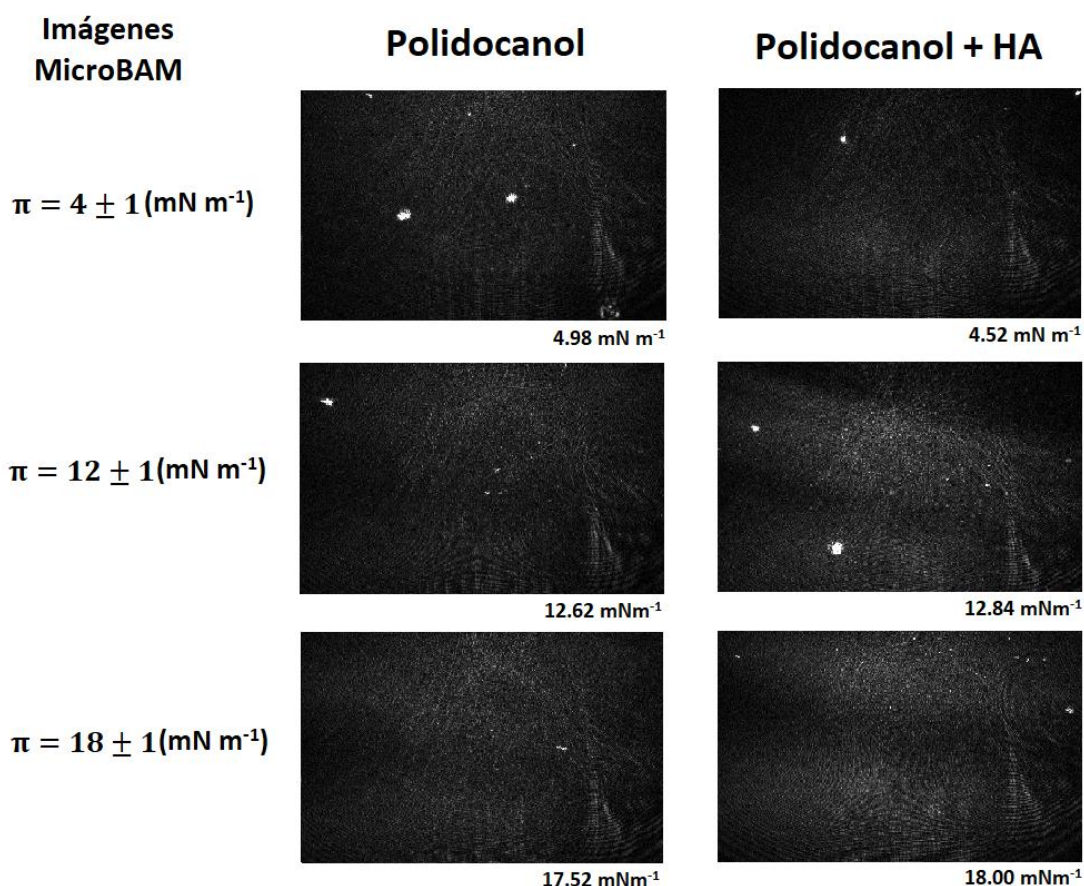


Fig. 7.2.1. Imágenes de Micro-BAM del polidocanol en subfase de agua pura y en subfase con HA a una concentración de $3 \cdot 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ a distintas presiones superficiales. Las dimensiones de cada imagen son 3.6 mm \times 4.0 mm.

Con la ayuda del microscopio óptico se observó anteriormente que este efecto de aumento de tamaño de las burbujas no ocurre en presencia de HA [167]. Es más, se ha observado que la presencia de HA disminuye ligeramente el tamaño de burbuja en la espuma, lo cual contribuye a aumentar el área interfacial y por tanto la concentración de polidocanol. Todas estas características que aporta la presencia de HA en las películas de polidocanol hace del HA un agente ideal para mejorar la acción esclerosante de este polímero.

CAPÍTULO 8: Ácido Hialurónico, BSA y HSA

En relación a las aplicaciones biomédicas y biotecnológicas, la albúmina sérica humana (HSA) posee un interés más notorio que la albúmina sérica bovina (BSA). En la biomedicina, la HSA es utilizada como biomarcador de muchas enfermedades, incluidos el cáncer, la artritis reumatoide o la isquemia entre otros [168–170]. También es utilizada para tratar varias enfermedades, como por ejemplo la hipovolemia, hemorragia o la insuficiencia hepática aguda [171,172]. Sin embargo, la mayoría de los estudios experimentales en la bibliografía se realizan con BSA debido a que es más fácil de obtener, más barata y en muchos de estos estudios asumen que ambas proteínas son lo suficientemente parecidas para tener un comportamiento análogo en la interfaz de aire-agua. En el caso de las proteínas, las isotermas de compresión son más complicadas de interpretar que las de lípidos analizadas en el capítulo 6 debido a la flexibilidad conformacional que poseen estas moléculas, y la variedad de estructuras interfaciales que pueden adoptar en la superficie [172]. Por lo tanto, aunque las diferencias estructurales entre la BSA y la HSA sean pequeñas, estas proteínas pueden adoptar conformaciones diferentes en la superficie, mostrando características interfaciales distintas.

En 2014 Crawford y Leblanc publicaron una extensa revisión del comportamiento de las proteínas albúminas mediante monocapas de Langmuir [173]. En esta revisión se incluían estudios de monocapas de Langmuir de HSA a diferentes fuerzas iónicas y pH de la subfase [174], monocapas de Langmuir de BSA y películas de Langmuir-Blodgett [175], y monocapas de Langmuir de lípido-HSA y BSA [176,177]. Estos últimos autores aparte de estudiar la mezcla de lípido-HSA y BSA con monocapas de Langmuir también utilizaron el Microscopio de Ángulo de Brewster. Con sus resultados observaron que diferentes parámetros como el pH de la subfase, la fuerza iónica, el disolvente de extensión y el método de extensión utilizado afectan fuertemente la estabilidad de la monocapa de proteínas en la interfaz aire-agua, impidiendo, en condiciones favorables, que la proteína se solubilice en la subfase de agua. Por otro lado, Campbell et al., mediante técnicas de reflectometría de neutrones, reflectometría de rayos X y microscopía de ángulo de Brewster, estudiaron la optimización, morfología y durabilidad de las películas de HSA en la interfaz aire-agua. Estudiando los diferentes métodos de extensión de las proteínas y comparando monocapas de Gibbs con monocapas de Langmuir, demostraron que las películas extendidas en la interfaz pueden durar varias horas de forma estable debido a la baja cinética de adsorción que adquiere por la estructura que adopta la proteína en la interfaz aire-agua [178].

En este capítulo de la tesis hemos elaborado una comparación directa de las propiedades interfaciales entre las proteínas de BSA y HSA, lo cual es importante para

conocer las similitudes y diferencias de estas proteínas en las interfases a la hora de aplicarlos en distintas aplicaciones biotecnológicas [75].

8.1 Isotermas de Compresión

Para profundar en las interacciones laterales de las proteínas de BSA y HSA, se realizan medidas de isotermas de compresión en subfase de agua con ambas proteínas a temperatura de 25°C. Posteriormente, para conocer los efectos que provoca el ácido hialurónico en las propiedades interfaciales de estas proteínas, se miden las isotermas de compresión en subfase de agua en presencia de HA.

Para la subfase de agua se utiliza buffer fosfato pH 7 (NaH_2PO_4 , 1.13 mM), y para las medidas con HA, este se disuelve también en el agua una concentración de $3 \cdot 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ de HA. Las proteínas de BSA y HSA se disuelven en la subfase para una muestra final con concentración de 0.5 g L^{-1} listo para depositar en la balanza de Langmuir. Para evitar que las proteínas se solubilizan en la subfase de agua, las medidas de las isotermas se han realizado siguiendo el método de Guastalla J.C. [179], que consiste en añadir a la disolución 0.1% de propanol antes de depositar, lo que mejora la estabilidad de la monocapa y aumenta su durabilidad. Para los experimentos de HSA se han depositado entre 30 – 40 μL , mientras que la HSA con HA entre 50 – 80 μL . Para la BSA puro entre 50 -80 μL , y con HA entre 70 – 100 μL .

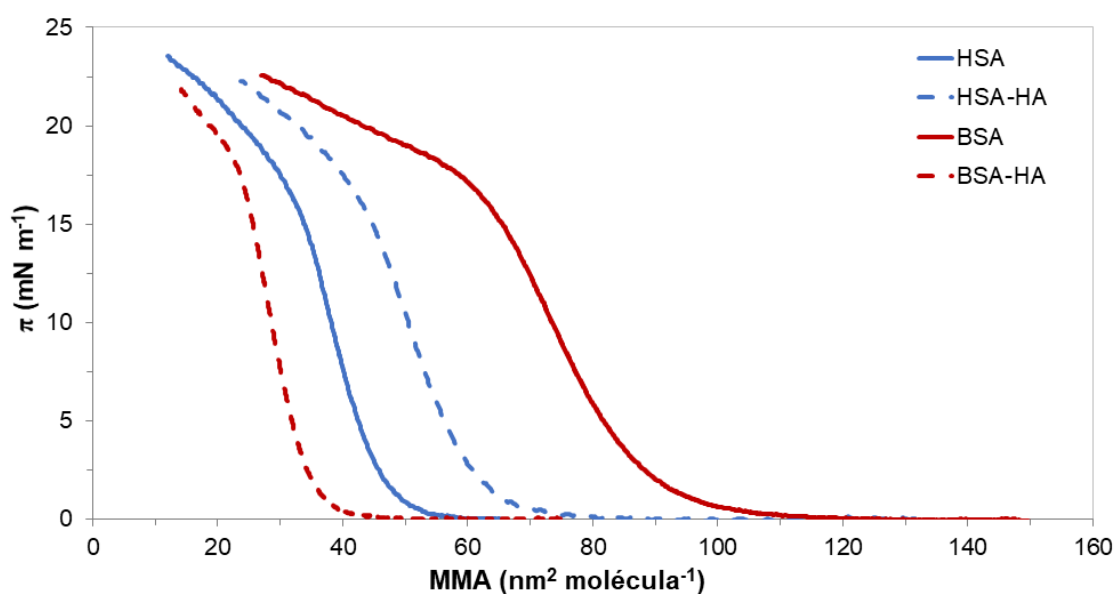


Fig. 8.1.1. Isotermas de compresión de BSA (línea roja sólida), HSA (línea azul sólida), BSA-HA (línea roja discontinua) y HSA-HA (línea azul discontinua), en subfase de agua pura a pH 7. Las isotermas mostradas son el valor medio de tres experimentos independientes con una desviación estándar <5%.

En la Fig. 8.1.1 se muestran las isothermas de BSA y HSA en presencia y ausencia de HA a pH 7, a temperatura de 25°C. Las 4 isothermas obtenidas poseen una forma casi idéntica en la que se pueden diferenciar varios dominios. Un primer dominio que empieza desde el principio de la compresión, caracterizada por un estado gaseoso de la monocapa donde las proteínas no interaccionan entre ellas, con valores de π cercanos a 0. En el segundo dominio, las proteínas empiezan a interaccionar entre ellas dando lugar a un incremento continuo de la π entre 2 a 17 mN m⁻¹, correspondiente a un estado de líquido expandido de la monocapa. Por último se encuentra un tercer dominio correspondiente a un estado condensado de la monocapa, en el cual las proteínas interaccionan fuertemente. En la Fig. 8.1.1 se aprecia este dominio por una disminución de pendiente del aumento de presión superficial, sin observar en ningún caso el colapso de la monocapa. Estos resultados de las isothermas de compresión coinciden con resultados previos de otros autores. Para el caso de la HSA Toimil et al. también obtienen una isoterma de compresión con tres dominios bien diferenciados y un tercer dominio con una disminución de la pendiente sin colapso [180]. Estos autores atribuyen este comportamiento de la monocapa de HSA en este dominio a un cambio conformacional de las moléculas, desde una configuración desplegada con todos los segmentos de aminoácidos ubicados en la interfaz aire-agua, a una configuración enrollada debido al plegamiento de las cadenas de aminoácidos, formando bucles y colas en la interfaz, con los grupos polares de HSA sumergidos en la subfase y las regiones hidrófobas orientadas hacia el aire. A medida que se comprime más esta monocapa aumentan el tamaño de los bucles y colas por lo que no se llega a colapsar la monocapa bajo compresión lateral. El mismo comportamiento superficial se observa para las proteínas de BSA, donde otros autores obtuvieron resultados similares, atribuyendo el efecto del tercer dominio a un cambio conformacional de la proteína de BSA similar para la HSA [175,181].

De las isothermas de la Fig. 8.1.1 también se obtienen los valores máximos de elasticidad de Gibbs y el área molecular límite. Estos resultados se muestran en la tabla 8.1.1.

Muestra	LMA (nm ² molécula ⁻¹)	ϵ_0 (mN m ⁻¹)
BSA	89 ± 5	52 ± 12
HSA	47 ± 3	50 ± 7
BSA-HA	34.5 ± 1.2	51 ± 16
HSA-HA	61 ± 4	50 ± 8

Tabla 8.1.1. Área molecular límite y máximo de elasticidad de Gibbs para las monocapas de BSA, HSA, BSA-HA y HSA-HA mostradas en la Fig. 8.1.1.

De la tabla 8.1.1 se puede observar que los valores de elasticidad para las cuatro monocapas son casi idénticos, corroborando que las propiedades interfaciales de los cuatro sistemas son muy parecidas como indicada la forma de las isothermas en la Fig. 8.1.1. Sin embargo, el área límite molecular entre la BSA y HSA pura varían significativamente, lo que se traduce en un desplazamiento de la isoterma de HSA hacia áreas moleculares menores respecto de la isoterma de BSA. Esto implica que la monocapa de HSA es más fácil de comprimir que la monocapa de BSA, permitiendo mayor número de moléculas en la superficie antes de interaccionar entre ellos debido a la compresión. Por otro lado, este resultado también puede indicar que las moléculas de HSA poseen menor actividad superficial que la BSA, ya que estas proteínas empiezan a interaccionan a densidad superficiales mayores. Este hecho fue observado por Lu et al. mediante reflexión especular de neutrones, demostrando que la concentración de BSA era mayor que la de HSA en la interfaz de aire-agua, mostrando una actividad superficial mayor del BSA [182]. Posteriormente, Campana et al. vieron que concentraciones muy pequeñas de BSA en la interfaz de aceite-agua perdían su estructura terciaria de la proteína, permitiendo un mejor empaquetamiento superficial, y por lo tanto un mayor actividad superficial que la HSA [51].

La presencia de HA en las monocapas de BSA y HSA provoca un efecto de desplazamiento de las isothermas, hacia MMA menores para la BSA y hacia MMA mayores para la HSA, como se puede ver en la Fig. 8.1.1. Para las proteínas de HSA, la presencia de HA en la subfase provoca un desplazamiento hacia áreas moleculares mayores, por lo que mejora su actividad superficial, mientras que para la BSA el desplazamiento es hacia áreas moleculares menores, reduciendo su actividad superficial.

Es evidente que el HA en la interfaz aire-agua interacciona más fuertemente con la BSA que con la HSA, ya que el desplazamiento en valores absolutos es mayor que para la HSA. Este efecto es debido posiblemente a que la proteína de BSA, al perder su estructura terciaria en la interfaz aire-agua [51], permitiría más puntos de unión con las moléculas de HA que la HSA. Estas uniones con el HA favorecen la formación de bucles y colas en la monocapa, permitiendo mayor números de moléculas en la superficie, y reduciendo la actividad superficial del BSA, desplazando la isoterma a áreas moleculares menores. Por el contrario, la HSA si mantiene parte de sus estructuras terciarias y secundarias en la interfaz aire-agua, impidiendo las interacciones con el HA, disminuyendo la solubilidad de la proteína, lo cual mejora su actividad superficial desplazando la isoterma de compresión hacia áreas moleculares mayores.

8.2 Imágenes de Micro-BAM

Para indagar más en las diferencias interfaciales entre la HSA y la BSA, y el efecto del HA, también se han tomados imágenes de Micro-BAM de las monocapas de la Fig. 8.1.1. La Fig. 8.2.1 muestran un conjunto de imágenes tomadas con el Micro-BAM para las monocapas de BSA y BSA puros y con HA. Para estos sistemas, se han obtenido imágenes muy homogéneas, con pequeñas diferencias en la reflectividad de las monocapas. Esto es debido a que las isothermas de estos sistemas presentan una única transición conformacional, cuando la monocapa pasa del estado gaseosa (imágenes oscuras de la primera columna de la Fig. 8.2.1) al estado líquido expandido-condensado (segunda y tercera columna). Cuando las moléculas de la monocapa empiezan a interactuar, la presión superficial empieza a aumentar de forma continua y sin cambios bruscos, lo que se traduce en una transición continua de imágenes de Micro-BAM más oscuras (poca reflectividad y monocapas delgadas) a unas imágenes más claras (más reflectividad y monocapas más gruesas). Resultados obtenidos mediante otras técnicas de imagen como el Microscopio de Fuerza atómica (AFM) también muestran películas de BSA y BSA homogéneas [183,184]. Las imágenes de Micro-BAM también muestran pequeños puntos claros o blancos en la monocapa, posiblemente generados por pequeñas agregaciones en superficie en forma de bucles y colas, presentes en todas las medidas.

Pero estos agregados se han encontrado con mayor frecuencia en las monocapas de HSA, lo cual corresponde con el hecho de que la HSA mantiene su estructura proteica nativa, formando bucles y colas de mayor tamaño en la interfaz de aire-agua, mientras que la BSA adopta una conformación más extendida en la superficie, dificultando la formación de agregaciones mayores [51]. Resultados recientes de la bibliografía también obtuvieron resultados similares en este aspecto. Ma et al. mediante técnicas de espectroscopia de Dicroísmo circular, DLS y resonancia de plasmón de superficie localizada, entre otros, han estudiado la estabilidad conformacional y el comportamiento de adsorción de tres proteínas albúminas, a saber, la HSA, la BSA y albúmina sérica de rata (RSA) [83]. Estos autores observaron que la BSA posee la menor estabilidad conformacional entre tres proteínas albúminas, perdiendo fácilmente su estructura terciaria y secundaria en el proceso de adsorción, mientras que la HSA tiene la mayor estabilidad conformacional. Sin embargo, esta baja estabilidad conformacional permite al BSA formar las agregaciones más pequeñas y homogéneas en la monocapa, dotándole de una gran estabilidad coloidal, mayores que la HSA, coincidiendo con los resultados de Micro-BAM obtenidos en este trabajo.

Finalmente, no se observa en las imágenes de Micro-BAM diferencias evidentes del efecto del HA sobre las monocapas de proteínas, lo cual es lógico ya que como se ha mencionado anteriormente, la presencia de HA desplaza las isothermas de compresión

pero mantienen su forma, y características interfaciales. Siendo el origen del desplazamiento las interacciones de las proteínas con el HA en la subfase.

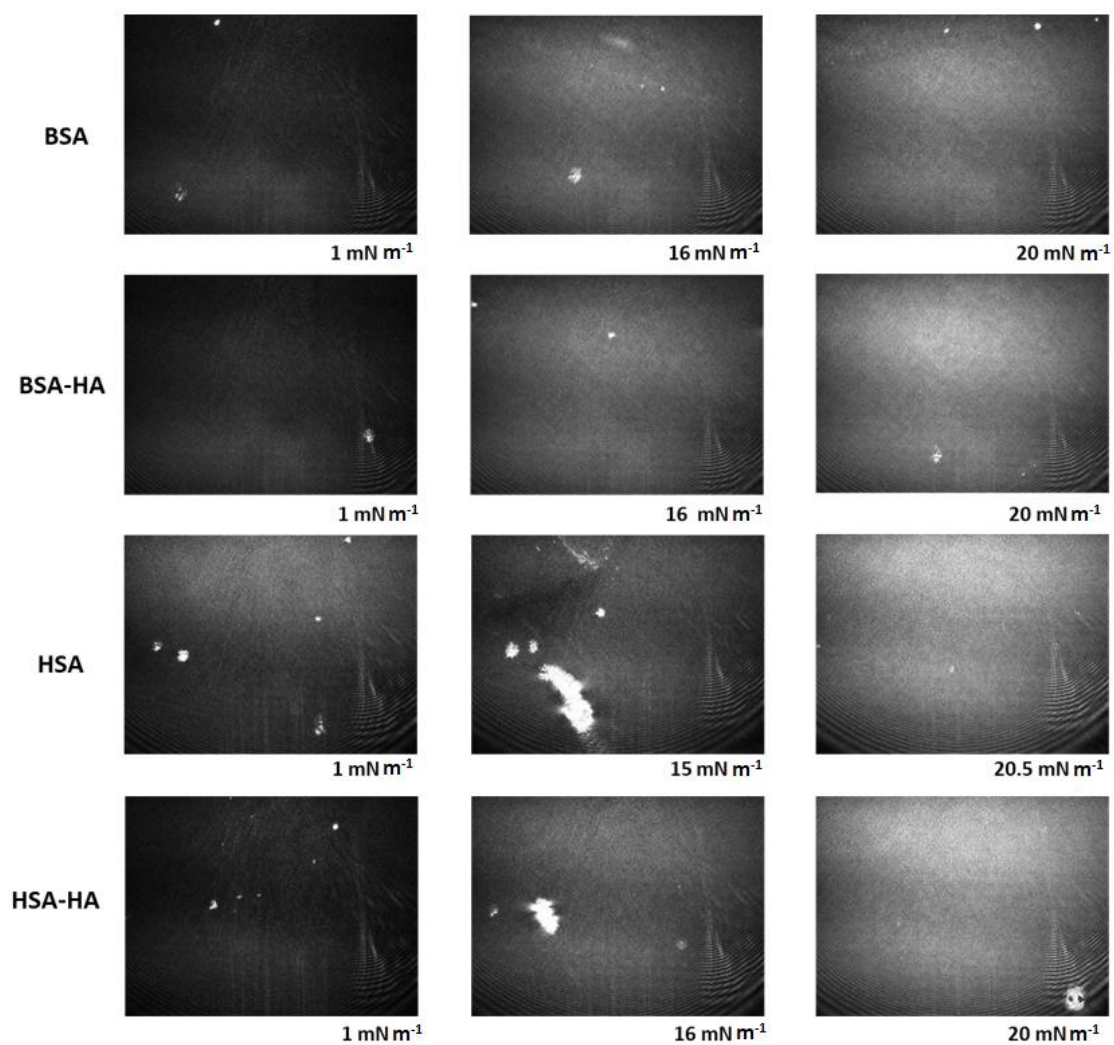


Fig. 8.2.1. Imágenes de Micro-BAM de las monocapas de BSA y BSA en agua pura y con HA en buffer de pH 7, en diferentes estados de compresión.

Conclusiones

En esta Tesis Doctoral se ha puesto a punto el Micro-BAM, que junto con los otros dispositivos ha permitido estudiar y caracterizar tres sistemas con actividad superficial. Cada uno de estos tres sistemas posee características particulares que se aprovechan para desarrollar y estudiar nuevas aplicaciones biotecnológicas.

Para los microgeles de PNIPAM y PNIPAM-PEG se ha realizado una caracterización superficial, utilizando distintos métodos experimentales, en función de la temperatura y a distintas concentraciones de electrolitos. Ambos microgeles poseen un estado hinchado a temperaturas por debajo de la VPTT y un estado colapsado a altas temperaturas en la cual aumentan su carga efectiva.

Las isotermas de compresión obtenidas para ambos sistemas muestran que en el estado colapsado con mayor carga efectiva, la monocapa es más fácil de comprimir que el estado hinchado, siendo el efecto más notorio en los microgeles de PNIPAM. El comportamiento de las monocapa de ambos microgeles bajo compresión lateral muestra características muy similares en ambos estados. Todas las medidas tienen un primer dominio sin interacción, un segundo dominio en la cual la presión superficial aumenta constantemente debido a la interpenetración de las partículas de microgel en la superficie, y un tercer dominio donde la repulsión electrostática entre las partículas de microgel evita la formación de estructuras más compactas favoreciendo la desorción parcial o la formación de bucles en la subfase.

Debido a la importancia que tiene los efectos electrostáticos en el último dominio, se caracteriza nuevamente ambos sistemas en presencia de electrolito a 1 y 10 mM de concentración. Se observó que para ambos microgeles, el tamaño es invariante en presencia de electrolito, mientras que para μ_e el efecto observado difiere entre los microgeles. En el caso del microgel de PNIPAM, para el estado hinchado la carga se apantalla en presencia de ambas concentraciones mientras que en el estado colapsado solo se apantalla a 10 mM. Por otro lado, los microgeles de PNIPAM-PEG en estado hinchado experimentan un pequeño efecto de apantallamiento independientemente de la concentración de electrolito, mientras que en el estado colapsado el apantallamiento aumenta con la concentración de electrolito.

Comparando los resultados de movilidad electroforética con las isotermas de compresión se ha observado que la carga efectiva modula el comportamiento de la monocapa de microgeles. La adición de electrolito provoca un efecto de apantallamiento de la carga efectiva, desplazando a la isoterma de compresión hacia áreas normalizadas mayores. De hecho, cuando los valores de μ_e de un microgel son similares, las isotermas obtenidas en las mismas condiciones experimentales están superpuestas. Estos resultados muestran que las propiedades superficiales de los

microgeles de PNIPAM y PNIPAM-PEG se pueden controlar a través de las interacciones electrostáticas. Las medidas del microgel de PNIPAM-PEG también muestra que las propiedades superficiales dependen de otros factores como la interacción específica entre el PEG el NaNO_3 , sin afectar los efectos electrostáticos.

Respecto a los resultados obtenidos con los lípidos DPPC, DPPS y colesterol, se ha comprobado que el efecto de condensación en la interfaz aire-agua, sobre la monocapa de DPPC:DPPS, aumenta en función de la concentración de colesterol.

Posteriormente se investiga los efectos e interacciones específicos que provoca la presencia de distintos iones en la subfase, estudiando estos sistemas a la misma fuerza iónica.

En presencia del ion Na^+ , la monocapa de DPPC:DPPS sufre una condensación gradual con la concentración de colesterol, similar al caso de agua pura. Para el ion La^{3+} , la monocapa de DPPC:DPPS sufre nuevamente una condensación gradual con la concentración de colesterol, con la diferencia de que en este caso la monocapa se mantiene en todo el proceso de compresión en el estado de LE, aumentando también la elasticidad y cohesividad de la monocapa con el colesterol.

En el caso de los iones divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} , se observan diferencias importantes en el efecto de condensación del colesterol debido a efectos específicos de estos iones con los lípidos. La elasticidad de la monocapa muestra un comportamiento complejo dependiendo del ion divalente y de la cantidad de colesterol. La presencia del ion Mg^{2+} , reduce drásticamente la elasticidad de la monocapa para concentraciones altas de colesterol en la monocapa. Mientras que en presencia de ion Ca^{2+} el efecto de condensación del colesterol y la compresión lateral de la monocapa ocurre principalmente en el estado LC. Estos resultados muestran que la condensación de las monocapas lipídicas por el colesterol depende de forma simultánea de los iones específicos y de la concentración del colesterol.

Los estudios realizados con polidocanol y HA han permitido conocer cómo afecta la presencia del HA en el medio a las propiedades superficiales del polidocanol. Debido a que el HA no presenta actividad superficial, este permanece en la subfase por lo que no compite con el polidocanol para situarse en la superficie. Además, la presencia de HA en la subfase disminuye la solubilidad del polidocanol, mejorando la elasticidad y la estabilidad de la monocapa de polidocanol.

Para la aplicación del polidocanol en la escleroterapia con espuma se ha visto que al añadir HA se duplica la vida media de la espuma. Aparte, la presencia de HA reduce el tamaño medio de las burbujas de la espuma, creando mayor cantidad de superficie lo mejora la acción esclerosante del polidocanol.

Para las proteínas de BSA y HSA, la presencia de HA en la subfase provoca efectos muy distintos en la monocapa en función de la proteína. En el caso del BSA, la presencia de

HA desplaza la isoterma de compresión hacia MMA menores, reduciendo la actividad superficial. Mientras que para la HSA la presencia de HA desplaza la isoterma de compresión hacia MMA mayores. Comparando estos dos efectos se observa que el desplazamiento de las isotermas en valor absoluto provocado por el HA es mayor para la proteína BSA.

Esta diferencia surge debido a que la BSA en la interfaz de aire-agua pierde su estructura terciaria permitiendo mayores puntos de unión con el HA, favoreciendo la formación de bucles y colas en la subfase, reduciendo su actividad superficial. Mientras que la HSA mantiene su estructura terciaria y secundaria impidiendo la interacción con el HA.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, mediante la caracterización de las propiedades superficiales de varios sistemas con distinta actividad superficial, han permitido profundizar en el comportamiento de estos sistemas en distintas condiciones experimentales. Con estos resultados, se pone de manifiesto la enorme importancia de las propiedades superficiales en la creación y desarrollo de aplicaciones biotecnológicas de sistemas coloidales en el futuro.

Lista de Publicaciones

- [1] Yang Y, Maldonado-Valderrama J, Martín-Molina A. Temperature and electrostatics effects on charged poly(N-isopropylacrylamide) microgels at the interface. *J Mol Liq* 2021;303:112678. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.112678>. (IF 5.065, Q1)
- [2] Martín-Molina A, Castillo-Santaella T, Yang Y, Maldonado-Valderrama J. Condensation of model lipid films by cholesterol: Specific ion effects. *Coatings* 2019;9:474. <https://doi.org/10.3390/coatings9080474>. (IF 2.436, Q2)
- [3] Castillo-Santaella T, Yang Y, Martínez-González I, Miguel Á, Holgado-Terriza JA, Maldonado-Valderrama J, et al. Effect of Hyaluronic Acid and Pluronic-F68 on the Surface Properties of Foam as a Delivery System for Polidocanol in Sclerotherapy. *Pharm Artic* 2020;12:1039. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111039>. (IF 4.421, Q1)
- [4] Aguilera-Garrido A, Del Castillo-Santaella T, Yang Y, Galisteo-González F, Gálvez-Ruiz MJ, Maldonado-Valderrama J, et al. Applications of Serum Albumins in delivery systems : differences in interfacial behaviour and interacting abilities with polysaccharides. *Adv Colloid Interface Sci* 2021:102365. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102365>. (IF 9.922, Q1)

Bibliografía

- [1] Bonacucina G, Cespi M, Misici-Falzi M, Palmieri GF. Colloidal Soft Matter as Drug Delivery System. *J Pharm Sci* 2009;98:1–42. <https://doi.org/10.1002/jps>.
- [2] Lee E. Electrophoresis of a Single Rigid Particle. *Interface Sci. Technol. Elsevier*, vol. 26, 2019, p. 3–45. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100865-2.00001-1>.
- [3] Kontogeorgis GM, Kiil S. Introduction to applied colloid and surface chemistry. New York: John Wiley & Sons. 2016. <https://doi.org/10.1002/9781118881194>.
- [4] Myers D. Surfaces, interfaces, and colloids. New York: Wiley (Vol. 415). 1999. <https://doi.org/10.1002/0471234990>.
- [5] Binks BP. Colloidal Particles at a Range of Fluid – Fluid Interfaces. *Langmuir* 2017;33:6947–63. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b00860>.
- [6] Lee E. Electrophoretic Motion of a Rigid Spherical Particle Normal to an Air-Water Interface. *Interface Sci Technol Elsevier* 2019;26:87–106. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100865-2.00004-7>.
- [7] Ter Minassian-Saraga L. Thin films including layers: terminology in relation to their preparation and characterization (IUPAC Recommendations 1994). *Pure Appl Chem*

- 1994;66:1667–738. [https://doi.org/10.1016/0040-6090\(95\)08148-8](https://doi.org/10.1016/0040-6090(95)08148-8).
- [8] Tanford C. *Ben Franklin stilled the waves: an informal history of pouring oil on water with reflections on the ups and downs of scientific life in general*. OUP Oxford. 2004. <https://doi.org/10.1038/342491a0>.
- [9] Pockels A, Rayleigh. Surface Tension. *Nature* 1891;43:437–9. <https://doi.org/10.1038/043437c0>.
- [10] Langmuir I. The mechanism of the surface phenomena of flotation. *Trans Faraday Soc* 1920;15:62–74. <https://doi.org/10.1039/TF9201500062>.
- [11] Barentin C, Ybert C, Di Meglio JM, Joanny JF. Surface shear viscosity of Gibbs and Langmuir monolayers. *J Fluid Mech* 1999;397:331–49. <https://doi.org/10.1017/S0022112099006321>.
- [12] Schwartz DK. Shear-induced molecular precession in a hexatic Langmuir monolayer. *Nature* 2001;410:348–51. <https://doi.org/10.1038/35066539>.
- [13] Ista LK, López GP. Lower critical solubility temperature materials as biofouling release agents. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1998;20:121–5. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900490>.
- [14] Callewaert M, Rouxhet PG, Boulangé-Petermann L. Modifying stainless steel surfaces with responsive polymers: Effect of PS-PAA and PNIPAAm on cell adhesion and oil removal. *J Adhes Sci Technol* 2005;19:765–81. <https://doi.org/10.1163/1568561054867837>.
- [15] Seyler AKL, Schaibley JR, Gong P, Rivera P, Jones AM. Electrical Control of Second-Harmonic Generation in a WSe₂ Monolayer Transistor. *Nat Nanotechnol* 2015;10:407–11. <https://doi.org/10.1038/nnano.2015.73>.
- [16] Backes C, Szyd BM, Harvey A, Yuan S, Vega-Mayoral V, Davies BR, et al. Production of highly monolayer enriched dispersions of liquid-exfoliated nanosheets by liquid cascade centrifugation. *ACS Nano* 2016;10:1589–601. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b07228>.
- [17] Schmidt S, Liu T, Rütten S, Phan KH, Möller M, Richtering W. Influence of microgel architecture and oil polarity on stabilization of emulsions by stimuli-sensitive core-shell poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) microgels: Mickering versus pickering behavior? *Langmuir* 2011;27:9801–6. <https://doi.org/10.1021/la201823b>.
- [18] Gong Y, Wang M, He J. The behavior of hydrophobic-core/hydrophilic-shell structured microgels at an interface: From Mickering emulsion to colloidosomes with dual-level controlled permeability. *RSC Adv* 2016;6:95067–72. <https://doi.org/10.1039/c6ra18215a>.
- [19] Kaur H, Yadav S, Srivastava AK, Singh N, Schneider JJ. Large Area Fabrication of Semiconducting Phosphorene by Langmuir-Blodgett Assembly. *Nat Publ Gr* 2016;1–8. <https://doi.org/10.1038/srep34095>.
- [20] Cabrerizo-Vílchez MA, Wege HA, Holgado-Terriza JA, Neumann AW. Axisymmetric drop shape analysis as penetration Langmuir balance. *Rev Sci Instrum* 1999;70:2438–44. <https://doi.org/10.1063/1.1149773>.

- [21] Rauh A, Rey M, Barbera L, Zanini M, Karg M, Isa L. Compression of hard core-soft shell nanoparticles at liquid-liquid interfaces: influence of the shell thickness. *Soft Matter* 2017;13:158–69. <https://doi.org/10.1039/C6SM01020B>.
- [22] Li Z, Richtering W, Ngai T. Poly(N-isopropylacrylamide) microgels at the oil-water interface: Temperature effect. *Soft Matter* 2014;10:6182–91. <https://doi.org/10.1039/c4sm00888j>.
- [23] Maldonado-Valderrama J, Del Castillo-Santaella T, Adroher-Benítez I, Moncho-Jordá A, Martín-Molina A. Thermoresponsive microgels at the air-water interface: the impact of the swelling state on interfacial conformation. *Soft Matter* 2017;13:230–8. <https://doi.org/10.1039/C6SM01375A>.
- [24] Deshmukh OS, Maestro A, Duits MHG, Van Den Ende D, Stuart MC, Mugele F. Equation of state and adsorption dynamics of soft microgel particles at an air-water interface. *Soft Matter* 2014;10:7045–50. <https://doi.org/10.1039/c4sm00566j>.
- [25] De Gennes PG. Reviews of modern physics. *Soft Matter* 1992;64:645. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.64.645>.
- [26] Doi M. *Soft matter physics*. Oxford University Press. 2013. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199652952.001.0001>.
- [27] Pelton R. Temperature-sensitive aqueous microgels. *Adv Colloid Interface Sci* 2000;85:1–33. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(99\)00023-8](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(99)00023-8).
- [28] Haq MA, Su Y, Wang D. Mechanical properties of PNIPAM based hydrogels: A review. *Mater Sci Eng C* 2017;70:842–55. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.081>.
- [29] Wiemer K, Dörmbach K, Slabu I, Agrawal G, Schrader F, Caumanns T, et al. Hydrophobic superparamagnetic FePt nanoparticles in hydrophilic poly(N-vinylcaprolactam) microgels: a new multifunctional hybrid system. *J Mater Chem B* 2017;5:1284–92. <https://doi.org/10.1039/c6tb02342h>.
- [30] Ramos J, Imaz A, Callejas-Fernández J, Barbosa-Barros L, Estelrich J, Quesada-Pérez M, et al. Soft nanoparticles (thermo-responsive nanogels and bicelles) with biotechnological applications: From synthesis to simulation through colloidal characterization. *Soft Matter* 2011;7:5067–82. <https://doi.org/10.1039/c0sm01409e>.
- [31] Chin WC, Orellana M V., Verdugo P. Spontaneous assembly of marine dissolved organic matter into polymer gels. *Nature* 1998;391:568–72. <https://doi.org/10.1038/35345>.
- [32] R. Pelton and T. Hoare. *Microgel Suspensions: Fundamentals and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2011. <https://doi.org/10.1002/9783527632992>.
- [33] Alexander A, Ajazuddin, Khan J, Saraf S, Saraf S. Polyethylene glycol (PEG)-Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) based thermosensitive injectable hydrogels for biomedical applications. *Eur J Pharm Biopharm* 2014;88:575–85. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.07.005>.
- [34] Koetting MC, Peters JT, Steichen SD, Peppas NA. Stimulus-responsive hydrogels: Theory, modern advances, and applications. *Mater Sci Eng R Reports* 2015;93:1–49. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2015.04.001>.

- [35] Yoon C, Xiao R, Park J, Cha J, Nguyen TD, Gracias DH. Functional stimuli responsive hydrogel devices by self-folding. *Smart Mater Struct* 2014;23:094008. <https://doi.org/10.1088/0964-1726/23/9/094008>.
- [36] Ali W, Gebert B, Altinpinar S, Mayer-Gall T, Ulbricht M, Gutmann JS, et al. On the potential of using dual-function hydrogels for brackish water desalination. *Polymers (Basel)* 2018;10:1–21. <https://doi.org/10.3390/polym10060567>.
- [37] Cai Y, Shen W, Loo SL, Krantz WB, Wang R, Fane AG, et al. Towards temperature driven forward osmosis desalination using Semi-IPN hydrogels as reversible draw agents. *Water Res* 2013;47:3773–81. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.04.034>.
- [38] Naseem K, Farooqi ZH, Begum R, Zia M, Rehman U, Najeeb J, et al. Poly(N-isopropylmethacrylamide-acrylic acid) microgels as adsorbent for removal of toxic dyes from aqueous medium. *J Mol Liq* 2018;268:229–38. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.07.039>.
- [39] Naseem K, Begum R, Wu W, Usman M, Irfan A. Adsorptive removal of heavy metal ions using polystyrene-poly (N- isopropylmethacrylamide-acrylic acid) core / shell gel particles : Adsorption isotherms and kinetic study. *J Mol Liq* 2019;277:522–31. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.12.054>.
- [40] Shah RK, Kim JW, Agresti JJ, Weitz DA, Chu LY. Fabrication of monodisperse thermosensitive microgels and gel capsules in microfluidic devices. *Soft Matter* 2008;4:2303–9. <https://doi.org/10.1039/b808653m>.
- [41] Lee LT, Jean B, Menelle A. Effect of temperature on the adsorption of poly(N-isopropylacrylamide) at the air-solution interface. *Langmuir* 1999;15:3267–72. <https://doi.org/10.1021/la981531s>.
- [42] Zhang J, Pelton R. Poly(N-isopropylacrylamide) microgels at the air-water interface. *Langmuir* 1999;15:8032–6. <https://doi.org/10.1021/la990316o>.
- [43] Matsuoka H, Uda K. Nanostructure of Poly(N-isopropylacrylamide) Brush at the Air/Water Interface and Its Responsivity to Temperature and Salt. *Langmuir* 2016;32:8383–91. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b01752>.
- [44] Picard C, Garrigue P, Tetry MC, Lapeyre V, Ravaine S, Schmitt V, et al. Organization of Microgels at the Air-Water Interface under Compression: Role of Electrostatics and Cross-Linking Density. *Langmuir* 2017;33:7968–81. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b01538>.
- [45] Scheidegger L, Fernández-Rodríguez MÁ, Geisel K, Zanini M, Elnathan R, Richtering W, et al. Compression and deposition of microgel monolayers from fluid interfaces: Particle size effects on interface microstructure and nanolithography. *Phys Chem Chem Phys* 2017;19:8671–80. <https://doi.org/10.1039/c6cp07896f>.
- [46] Maestro A, Jones D, Sánchez De Rojas Candela C, Guzman E, Duits MHG, Cicuta P. Tuning Interfacial Properties and Processes by Controlling the Rheology and Structure of Poly(N-isopropylacrylamide) Particles at Air/Water Interfaces. *Langmuir* 2018;34:7067–76. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b03879>.
- [47] Rey M, Hou X, Tang JSJ, Vogel N. Interfacial arrangement and phase transitions of

- PNiPAm microgels with different crosslinking densities. *Soft Matter* 2017;13:8717–27. <https://doi.org/10.1039/c7sm01558e>.
- [48] Gong Y, Wang M, He J. shell structured microgels at an interface : from Mickering emulsion to colloidosomes with. *RSC Adv* 2016;6:95067–72. <https://doi.org/10.1039/C6RA18215A>.
- [49] Van Thienen TG, Demeester J, De Smedt SC. Screening poly(ethyleneglycol) micro- and nanogels for drug delivery purposes. *Int J Pharm* 2008;351:174–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.09.043>.
- [50] Joncheray TJ, Denoncourt KM, Mathieu C, Meieir MAR, Schubert US, Duran RS. Langmuir and langmuir-blodgett films of polye(thylene oxide)-b-Poly(ϵ - caprolactone) star-shaped block copolymers. *Langmuir* 2006;22:9264–71. <https://doi.org/10.1021/la061290l>.
- [51] Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A. D., Lewis, J., Raff, M., ... & Walter P. *Essential cell biology*. Garland Science. 2015. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg023>.
- [52] Levitan, I.; Barrantes FJ. *Cholesterol Regulation of Ion Channels and Receptors*; JohnWiley & Sons: Hoboken, NJ, USA. 2012. <https://doi.org/10.1002/9781118342312>.
- [53] Ikonen E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:125–38. <https://doi.org/10.1038/nrm2336>.
- [54] Zhang J, Xue R, Ong W, Chen P. Roles of Cholesterol in Vesicle Fusion and Motion. *Biophysj* 2009;97:1371–80. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.06.025>.
- [55] Coderch L, Fonollosa J, Pera M De, Estelrich J, Maza AD La. Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR Relationship with percutaneous absorption. *J Control Release* 2000;68:85–95. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00240-6](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00240-6).
- [56] Cabrera I, Abasolo I, Corchero JL, Elizondo E, Rivera P. α -Galactosidase A Loaded Nanoliposomes with Enhanced Enzymatic Activity and Intracellular Penetration. *Adv Healthc Mater* 2016;5:829–40. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500746>.
- [57] Rodri A, Nogales A, Aicart E, Junquera E. Effect of Lipid Composition on the Structure and Theoretical Phase Diagrams of DC-Chol / DOPE-DNA Lipoplexes. *Biomacromolecules* 2010;11:3332–40. <https://doi.org/10.1021/bm1008124>.
- [58] Paiva, D.; Martín-Molina, A.; Cardoso, I.; Quesada-Pérez, M.; do Carmo Pereira, M.; Rocha S. The effect of a fluorinated cholesterol derivative on the stability and physical properties of cationic DNA vectors. *Soft Matter* 2013;9:401–409. <https://doi.org/10.1039/C2SM27236A>.
- [59] Finegold L. *Cholesterol in Membrane Models*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA. 1993. <https://doi.org/10.1002/food.19930370629>.
- [60] de Meyer, F.; Smit B. Effect of cholesterol on the structure of a phospholipid bilayer. *Proc Natl Acad Sci* 2009;106:3654–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809959106>.
- [61] Leathes JB. Croonian lectures on the rôle of fats in vital phenomena. *Lancet* 1925;205:853–6. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)22310-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)22310-1).
- [62] Korchowiec B, Paluch M, Corvis Y, Rogalska E. A Langmuir film approach to elucidating

- interactions in lipid membranes: 1, 2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine/cholesterol/metal cation systems. *Chem Phys Lipids* 2006;144:127–136. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2006.08.005>.
- [63] Jurak M. Thermodynamic aspects of cholesterol effect on properties of phospholipid monolayers: Langmuir and Langmuir–blodgett monolayer study. *J Phys Chem B* 2013;117:3496–3502. <https://doi.org/10.1021/jp401182c>.
- [64] Dynarowicz-Łątka, P.; Hać-Wydro K. Interactions between phosphatidylcholines and cholesterol in monolayers at the air/water interface. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2004;37:21–25. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.06.007>.
- [65] Muhammad W, Khan S, Sohail M. Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects Syed. *Int J Biol Macromol* 2018;120:1682–95. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.188>.
- [66] Seelig J. Adsorption of Ca²⁺ and La³⁺ to bilayer membranes : measurement of the adsorption enthalpy and binding constant with titration calorimetry. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembranes* 1994;1189:89–95. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(94\)90284-4](https://doi.org/10.1016/0005-2736(94)90284-4).
- [67] Hernández-Camarero P, Jiménez G, López-Ruiz E, Barungia A, Marchal JA, Perán M. Revisiting the dynamic cancer stem cell model: Importance of tumour edges. *Crit Rev Oncol Hematol* 2018;131:35–45. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.08.004>.
- [68] Kouvidi K, Berdiaki A, Nikitovic D, Katonis P, Afratis N, Hascall VC, et al. Role of Receptor for Hyaluronic Acid-mediated Motility (RHAMM) in Low Molecular Weight Hyaluronan (LMWHA) - mediated Fibrosarcoma Cell Adhesion. *J Biol Chem* 2011;286:38509–20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.275875>.
- [69] Fallacara A, Baldini E, Manfredini S, Vertuani S. Hyaluronic acid in the third millennium. *Polymers (Basel)* 2018;10:701. <https://doi.org/10.3390/polym10070701>.
- [70] Parsi K. Interaction of detergent sclerosants with cell membranes. *Phlebology* 2015;30:306–15. <https://doi.org/10.1177/0268355514534648>.
- [71] Star, P., Connor, D.E., Parsi, K. 2017. Novel developments in foam sclerotherapy: Focus on Varithena® (polidocanol endovenous microfoam) in the management of varicose veins. *Phlebology* 2017;33:150–162. <https://doi.org/10.1177/0268355516687864>.
- [72] Nastasa V, Samaras K, Ampatzidis C, Karapantsios TD, Trelles MA, Moreno-moraga J, et al. Properties of polidocanol foam in view of its use in sclerotherapy. *Int J Pharm* 2015;478:588–96. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.11.056>.
- [73] Eckmann DM. Polidocanol for endovenous microfoam sclerosant therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;18:1919–27. <https://doi.org/10.1517/13543780903376163>.
- [74] Dodero AA, Williams R, Gagliardi S, Vicini S, Alloisio M, Castellano M. A micro-rheological and rheological study of biopolymers solutions: Hyaluronic acid. *Carbohydr Polym* 2018;203:349–55. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.09.072>.
- [75] Aguilera-Garrido A, Del Castillo-Santaella T, Yang Y, Galisteo-González F, Gálvez-Ruiz MJ, Maldonado-Valderrama J, et al. Applications of Serum Albumins in delivery systems :

- differences in interfacial behaviour and interacting abilities with polysaccharides. *Adv Colloid Interface Sci* 2021;102365. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102365>.
- [76] Lee P, Wu X. Review : Modifications of Human Serum Albumin and their Binding Effect. *Curr Pharm Des* 2015;21:1862–5. <https://doi.org/10.2174/1381612821666150302115025>.
- [77] Karimi M, Bahrami S, Ravari SB, Sahandi P, Mirshekari H, Bozorgomid M, et al. Albumin nanostructures as advanced drug delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv* 2017;176:139–48. <https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1193149>.
- [78] Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm* 2010;385:113–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.10.018>.
- [79] Lakshmanan M, Parthasarathi R, Dhathathreyan A. Do properties of bovine serum albumin at fluid/electrolyte interface follow the Hofmeister series?-An analysis using Langmuir and Langmuir-Blodgett films. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* 2006;1764:1767–74. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2006.09.010>.
- [80] Pérez-Fuentes L, Drummond C, Faraudo J, Bastos-González D. Anions make the difference: Insights from the interaction of big cations and anions with poly(N-isopropylacrylamide) chains and microgels. *Soft Matter* 2015;11:5077–86. <https://doi.org/10.1039/c5sm00750j>.
- [81] Pelton RH, Chibante P. Preparation of Aqueous Latices with N- Isopropylacrylamide. *Colloids and Surfaces* 1986;20:247–56. [https://doi.org/10.1016/0166-6622\(86\)80274-8](https://doi.org/10.1016/0166-6622(86)80274-8).
- [82] Szcze ECA, Hołysz L. Changes of zeta potential and particles size of silica caused by DPPC adsorption and enzyme phospholipase A2 presence. *Adsorption* 16AD:305–12. <https://doi.org/10.1007/s10450-010-9242-1>.
- [83] Ma GJ, Ferhan AR, Sut TN, Jackman JA, Cho N. Understanding How Natural Sequence Variation in Serum Albumin Proteins Affects Conformational Stability and Protein Adsorption. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2020;194:111194. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111194>.
- [84] Stetefeld J, Mckenna SA, Patel TR. Dynamic light scattering : a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev* 2016:409–27. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>.
- [85] Martín-Molina A. Propiedades electrocinéticas de sistemas coloidales modelo: efecto del tamaño iónico. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 2003.
- [86] Malvern-Instrument. Zetasizer Malvern nano series. User Manual. 2013.
- [87] Koppel DE. Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy : The Method of Cumulants Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy : The Method of Cumulants. *J Chem Phys* 1972;57:4814–20. <https://doi.org/10.1063/1.1678153>.
- [88] Finsy R. Particle sizing by quasi-elastic light scattering. *Adv Colloid Interface Sci* 1994;52:79–143. [https://doi.org/doi/10.1016/0001-8686\(94\)80041-3](https://doi.org/doi/10.1016/0001-8686(94)80041-3).
- [89] Vincent B. The Determination of Very Small Electrophoretic MobUities in Polar and

- Nonpolar Colloidal Dispersions Using Phase Analysis Light Scattering. *J Colloid Interface Sci* 1991;143:532–54. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(91\)90286-H](https://doi.org/10.1016/0021-9797(91)90286-H).
- [90] Dakić B, Lipp YO, Ma X, Ringbauer M, Kropatschek S, Barz S, et al. Quantum discord as resource for remote state preparation. *Nat Phys* 2012;8:666–70. <https://doi.org/10.1038/nphys2377>.
- [91] Kralchevsky PA, Danov KD, Denkov ND. *Chemical Physics of Colloid Systems and Interfaces*. *Handb Surf Colloid Chem* 1997;2. <https://doi.org/10.1201/9781420007206.ch7>.
- [92] Gimsa J, Eppmann P, Prujger B. *Introducing Phase Analysis Light Scattering for Dielectric Characterization : Measurement of Traveling-Wave Pumping*. *Biophys J* 1997;73:3309–16. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78355-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78355-3).
- [93] Butt H, Graf K, Kappl M. *Physics and Chemistry of Interfaces*. John Wiley & Sons. 2013. <https://doi.org/10.1002/ange.200385136>.
- [94] Ma G, Allen HC. DPPC Langmuir monolayer at the air-water interface: Probing the tail and head groups by vibrational sum frequency generation spectroscopy. *Langmuir* 2006;22:5341–9. <https://doi.org/10.1021/la0535227>.
- [95] Maldonado-Valderrama J, Castillo-Santaella T, Gálvez-Ruiz MJ, Holgado-Terriza JA, Cabrerizo-Vílchez M. *Structure and functionality of interfacial layers in Food Structure and Functionality*. Ed. Elsevier, 2021. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2019-0-03526-1>.
- [96] Pinaud F, Geisel K, Massé P, Catargi B, Isa L, Richtering W, et al. Adsorption of microgels at an oil-water interface: Correlation between packing and 2D elasticity. *Soft Matter* 2014;10:6963–74. <https://doi.org/10.1039/c4sm00562g>.
- [97] Hoenig D, Moebius D. Direct visualization of monolayers at the air-water interface by Brewster angle microscopy. *J Phys Chem* 1991;95:4590–2. <https://doi.org/10.1021/j100165a003>.
- [98] Silva-Molina RA. *Nanoestructuras de Nitruro de Boro y Carbono: Síntesis, Funcionalización y Cálculos Ab Initio*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. 2016.
- [99] Honig, D., Overbeck, G. A., & Mobius D. Morphology of pentadecanoic acid monolayers at the air/water interface studied by BAM. *Adv Mater* 1992;4:419–24. <https://doi.org/10.1002/ADMA.19920040610>.
- [100] Moore BG, Knobler CM, Akamatsu S, Rondelez F. Diagram of Langmuir Monolayers of Pentadecanoic Acid: Quantitative Comparison of Surface Pressure and Fluorescence Microscopy Results. *J Phys Chem* 1990;94:4588–95. <https://doi.org/10.1021/j100374a042>.
- [101] Hoorfar M, Neumann AW. Recent progress in Axisymmetric Drop Shape Analysis (ADSA). *Adv Colloid Interface Sci* 2006;121:25–49. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2006.06.001>.
- [102] Río Ol del, Neumann AW. *Axisymmetric Drop Shape Analysis : Computational Methods for the Measurement of Interfacial Properties from the Shape and Dimensions of*

- Pendant and Sessile Drops. *J Colloid Interface Sci* 1997;196:136–47.
<https://doi.org/10.1006/jcis.1997.5214>.
- [103] Morita AT, Carastan D, Demarquette N. Influence of drop volume on surface tension evaluated using the pendant drop method. *Colloid Polym Sci* 2002;280:857–64.
<https://doi.org/10.1007/s00396-002-0694-z>.
- [104] Torcello-Gómez A, Jódar-Reyes AB, Maldonado-Valderrama J, Martín-Rodríguez A. Effect of emulsifier type against the action of bile salts at oil–water interfaces. *Food Res Int* 2012;48:140–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.03.007>.
- [105] Maldonado-valderrama J, Martín-Molina A, Martín-Rodríguez A, Cabrerizo-vílchez MA, Gálvez-Ruiz MJ, Langevin D. Surface Properties and Foam Stability of Protein/Surfactant Mixtures: Theory and Experiment 2007:2715–23. <https://doi.org/10.1021/jp067001j>.
- [106] Maldonado-Valderrama J, Wege HA, Rodríguez-Valverde MA, Gálvez-Ruiz MJ, Cabrerizo-Vílchez MA. Comparative Study of Adsorbed and Spread Beta-Casein Monolayers at the Water - Air Interface with the Pendant Drop Technique. *Langmuir* 2003;8436–42. <https://doi.org/10.1021/la034242z>.
- [107] Maldonado-Valderrama J, Muros-Cobos JL, Holgado-Terriza JA. Bile salts at the air–water interface: Adsorption and desorption. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2014;120:176–83. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.05.014>.
- [108] Torcello Gómez A. Application of interfacial properties of polymeric surfactants in physiological processes for biomedical and nutraceutic purposes. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 2012.
- [109] Geisel K, Isa L, Richtering W. The compressibility of ph-sensitive microgels at the oil-water interface: Higher charge leads to less repulsion. *Angew Chemie - Int Ed* 2014;53:4905–9. <https://doi.org/10.1002/anie.201402254>.
- [110] Charlotte M, Laurichesse E, Perro A, Ravaine V, Schmitt V. Journal of Colloid and Interface Science Kinetics of spontaneous microgels adsorption and stabilization of emulsions produced using microfluidics. *J Colloid Interface Sci* 2019;548:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.04.020>.
- [111] Brugger B, Rosen BA, Richtering W. Microgels as stimuli-responsive stabilizers for emulsions. *Langmuir* 2008;24:12202–8. <https://doi.org/10.1021/la8015854>.
- [112] Destribats M, Lapeyre V, Wolfs M, Sellier E, Leal-Calderon F, Ravaine V, et al. Soft microgels as Pickering emulsion stabilisers: Role of particle deformability. *Soft Matter* 2011;7:7689–98. <https://doi.org/10.1039/c1sm05240c>.
- [113] Monteux C, Marlière C, Paris P, Pantoustier N, Sanson N, Perrin P. Poly(N-isopropylacrylamide) microgels at the oil-water interface: Interfacial properties as a function of temperature. *Langmuir* 2010;26:13839–46. <https://doi.org/10.1021/la1019982>.
- [114] Li Z, Geisel K, Richtering W, Ngai T. Poly(N-isopropylacrylamide) microgels at the oil-water interface: Adsorption kinetics. *Soft Matter* 2013;9:9939–46. <https://doi.org/10.1039/c3sm52168k>.
- [115] Lietor-Santos JJ, Sierra-Martin B, Vavrin R, Hu Z, U. G, Fernandez-Nieves A. Deswelling

- microgel particles using hydrostatic pressure. *Macromolecules* 2009;42:6225–30. <https://doi.org/doi.org/10.1002/9783527632992.ch4>.
- [116] Adroher-Benítez I, Ahualli S, Bastos-González D, Ramos J, Forcada J, Moncho-Jordá A. The effect of electrosteric interactions on the effective charge of thermoresponsive ionic microgels: Theory and experiments. *J Polym Sci Part B Polym Phys* 2016;54:2038–49. <https://doi.org/10.1002/polb.24109>.
- [117] López-León T, Ortega-Vinuesa JL, Bastos-González D, Elaissari A. Cationic and Anionic Poly(N-isopropylacrylamide) Based Submicron Gel Particles: Electrokinetic Properties and Colloidal Stability. *J Phys Chem B* 2006;110:4629–36. <https://doi.org/10.1021/jp0540508>.
- [118] Quesada-Pérez M, Martín-Molina A. Monte Carlo simulation of thermo-responsive charged nanogels in salt-free solutions. *Soft Matter* 2013;9:7086–94. <https://doi.org/10.1039/c3sm00093a>.
- [119] Geisel K, Richtering W, Isa L. Highly ordered 2D microgel arrays: Compression versus self-assembly. *Soft Matter* 2014;10:7968–76. <https://doi.org/10.1039/c4sm01166j>.
- [120] Martín-Molina A, Castillo-Santaella T, Yang Y, Maldonado-Valderrama J. Condensation of model lipid films by cholesterol: Specific ion effects. *Coatings* 2019;9:474. <https://doi.org/10.3390/coatings9080474>.
- [121] Pinaud F, Geisel K, Massé P, Catargi B, Isa L, Richtering W, et al. Adsorption of microgels at an oil–water interface: correlation between packing and 2D elasticity. *Soft Matter* 2014;10:6963–74. <https://doi.org/10.1039/C4SM00562G>.
- [122] Yang Y, Maldonado-Valderrama J, Martín-Molina A. Temperature and electrostatics effects on charged poly(N-isopropylacrylamide) microgels at the interface. *J Mol Liq* 2021;303:112678. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.112678>.
- [123] Geisel K, Isa L, Richtering W. Unraveling the 3D localization and deformation of responsive microgels at oil/water interfaces: a step forward in understanding soft emulsion stabilizers. *Langmuir* 2012;28:15770–6. <https://doi.org/10.1021/la302974j>.
- [124] Massé P, Sellier E, Schmitt V, Ravaine V. Impact of electrostatics on the adsorption of microgels at the interface of pickering emulsions. *Langmuir* 2014;30:14745–56. <https://doi.org/10.1021/la503040f>.
- [125] López-León T, Elaïssari A, Ortega-Vinuesa JL. Hofmeister Effects on Poly (NIPAM) Microgel Particles: Macroscopic Evidence of Ion Adsorption and Changes in Water Structure. *ChemPhysChem* 2007;8:148–56. <https://doi.org/10.1002/cphc.200600521>.
- [126] Yoshizawa Y, Kono Y, Ogawara K, Kimura T, Higaki K. Pharmaceutical Nanotechnology PEG liposomalization of paclitaxel improved its in vivo disposition and anti-tumor efficacy. *Int J Pharm* 2011;412:132–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.04.008>.
- [127] Candy D, Belsey J. Macrogol (polyethylene glycol) laxatives in children with functional constipation and faecal impaction: a systematic review. *Arch Dis Child* 2009;94:156–60. <https://doi.org/10.1136/adc.2007.128769>.
- [128] Borgens RB, Shi R. Immediate recovery from spinal cord injury through molecular repair of nerve membranes with polyethylene glycol. *FASEB J* 2000;14:27–35.

<https://doi.org/10.1096/fasebj.14.1.27>.

- [129] Comolli N, Neuhuber B, Fischer I, Lowman A. In vitro analysis of PNIPAAm – PEG , a novel , injectable scaffold for spinal cord repair. *Acta Biomater* 2009;5:1046–55. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.10.008>.
- [130] Jiménez Guerra M. Caracterización de microgeles termosensibles biocompatibles. TFM. Universidad de Granada. 2020.
- [131] Ferreira LA, Teixeira A. Salt Effect on the Aqueous Two-Phase System PEG 8000 - Sodium Sulfate. *J Chem Eng Data* 2011;56:133–7. <https://doi.org/10.1021/je1010467>.
- [132] Ho-Gutierrez I V, Cheluget EL, Vera JH, Weber ME. Liquid-Liquid Equilibrium of Aqueous Mixtures of Poly (ethylene glycol) with Na₂SO₄ or NaCl. *J Chem Eng Data* 1994;39:245–8. <https://doi.org/0021-9568/94/1739>.
- [133] Taboada ME, Galleguillos R, Graber A. Compositions , Densities , Conductivities , and Refractive Indices of Potassium Chloride or / and Sodium Chloride + PEG 4000 + Water at 298 . 15 and Liquid - Liquid Equilibrium of Potassium Chloride or Sodium Chloride + PEG 4000 + Water at 333 . 15 K. *J Chem Eng Data* 2005;50:264–9. <https://doi.org/10.1021/je049682m>.
- [134] Cabezas H. Theory of phase formation in aqueous two-phase systems. *J Chromatogr B* 1996;680:3–30. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(96\)00042-4](https://doi.org/10.1016/0378-4347(96)00042-4).
- [135] Rogers RD, Bond AH, Bauer CB, Zhang J, Griffin ST. Metal ion separations in polyethylene glycol-based aqueous biphasic systems : correlation of partitioning behavior with available thermodynamic hydration data. *J Chromatogr B* 1996;680:221–9. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(95\)00447-5](https://doi.org/10.1016/0378-4347(95)00447-5).
- [136] Zijlema TG, Oosterhof H, Witkamp GJ, Rosmalen GM Van. Crystallization of Sodium Chloride with Amines as Antisolvents, 1997, p. 230–41. <https://doi.org/10.1021/bk-1997-0667.ch019>.
- [137] Graber TA, Taboada ME, Asenjo JA, Andrews BA. Influence of Molecular Weight of the Polymer on the Liquid-Liquid Equilibrium of the Poly(ethylene glycol) + NaNO₃ + H₂O System at 298.15 K. *J Chem Eng Data* 2001;46:765–8. <https://doi.org/10.1021/je000372n>.
- [138] Graber A, Taboada E. Liquid - Liquid Equilibrium of the Poly (ethylene glycol) + Sodium Nitrate + Water System at 298 . 15 K. *J Chem Eng Data* 2000;45:182–4. <https://doi.org/10.1021/je990225t>.
- [139] Kim K, Kim C, Byun Y. Preparation of a dipalmitoylphosphatidylcholine/cholesterol Langmuir-Blodgett monolayer that suppresses protein adsorption. *Langmuir* 2001;17:5066–70. <https://doi.org/10.1021/la0102096>.
- [140] Oldfield E, Chapman D. Effects of cholesterol and cholesterol derivatives on hydrocarbon chain mobility in lipids. *Biochem Biophys Res Commun* 1971;43:610–6. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(71\)90658-9](https://doi.org/10.1016/0006-291X(71)90658-9).
- [141] Cheng K, Ropers M, Lopez C. The miscibility of milk sphingomyelin and cholesterol is affected by temperature and surface pressure in mixed Langmuir monolayers. *Food*

- Chem 2017;224:114–23. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.035>.
- [142] Lopez C, Cheng K, Perez J. Thermotropic phase behavior of milk sphingomyelin and role of cholesterol in the formation of the liquid ordered phase examined using SR-XRD and DSC. *Chem Phys Lipids* 2018;215:46–55. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2018.07.008>.
- [143] Venkata A, Murthy R, Guyomarc F, Paboeuf G, Vié V, Lopez C. Biochimica et Biophysica Acta Cholesterol strongly affects the organization of lipid monolayers studied as models of the milk fat globule membrane : Condensing effect and change in the lipid domain morphology. *BBA - Biomembr* 2015;1848:2308–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.06.014>.
- [144] Venkata A, Murthy R, Guyomarc F, Lopez C. Cholesterol decreases the size and the mechanical resistance to rupture of sphingomyelin rich domains, in lipid bilayers studied as model of the milk fat globule membrane. *Langmuir* 2016;32:6757–65. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b01040>.
- [145] Broniatowski M, Wydro P, Flasin M. Does cholesterol preferentially pack in lipid domains with saturated sphingomyelin over phosphatidylcholine? A comprehensive monolayer study combined with grazing incidence X-ray diffraction and Brewster angle microscopy experiments. *J Colloid Interface Sci* 2013;397:122–30. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.01.060>.
- [146] Daear W, Mahadeo M, Prenner EJ. Biochimica et Biophysica Acta Applications of Brewster angle microscopy from biological materials to biological systems. *BBA - Biomembr* 2017;1859:1749–66. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.06.016>.
- [147] Cadena-Navaa RD, Martin-Mironesa JM, Vázquez-Martínez EA, Rocab JA, Ruiz-García J. Direct observations of phase changes in Langmuir films of Cholesterol. *Rev Mex FÍSICA* 2006;52:32–40.
- [148] Gupta RK, Suresh KA. AFM studies on Langmuir-Blodgett films of cholesterol. *Eur Phys J E* 2004;42:35–42. <https://doi.org/10.1140/epje/i2003-10088-4>.
- [149] Adhyapak PR, Panchal S V, Venkata A, Murthy R. BBA - Biomembranes Cholesterol induced asymmetry in DOPC bilayers probed by AFM force spectroscopy. *BBA - Biomembr* 2018;1860:953–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.01.021>.
- [150] Mills TT, Huang J, Feigenson GW, Nagle JF. Effects of cholesterol and unsaturated DOPC lipid on chain packing of saturated gel-phase DPPC bilayers. *Gen Physiol Biophys* 2009;28:126–39. <https://doi.org/10.4149/gpb>.
- [151] Ikonen E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:125–138. <https://doi.org/10.1038/nrm2336>.
- [152] Korchowiec B, Paluch M, Corvis Y, Rogalska E. A Langmuir film approach to elucidating interactions in lipid membranes : 1 , 2-dipalmitoyl- sn -glycero-3- phosphoethanolamine / cholesterol / metal cation systems 2006;144:127–36. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2006.08.005>.
- [153] Wydro P. The interactions between cholesterol and phospholipids located in the inner leaflet of humane erythrocytes membrane (DPPE and DPPS) in binary and ternary films-

- The effect of sodium and calcium ions. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2011;82:209–16. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.08.041>.
- [154] Martín-Molina A, Rodríguez-Beas C, Faraudo J. Effect of calcium and magnesium on phosphatidylserine membranes: Experiments and all-atomic simulations. *Biophys J* 2012;102:2095–103. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.03.009>.
- [155] Wilke N, Maggio B. Electrostatic field effects on membrane domain segregation and on lateral diffusion. *Biophys Rev* 2011;3:185–92. <https://doi.org/10.1007/s12551-011-0057-4>.
- [156] Faraudo J, Martí A. Charge Reversal in Anionic Liposomes : Experimental Demonstration and Molecular Origin. *Phys Rev Lett* 2010;168103:3–6. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.104.168103>.
- [157] Roldán-Vargas S, Barnadas-Rodríguez R, Martín-Molina A, Quesada-Pérez M, Estelrich J, Callejas-Fernández J. Growth of lipid vesicle structures : From surface fractals to mass fractals. *Phys Rev E* 2008;78:1–4. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.78.010902>.
- [158] Roldán-Vargas S, Martín-Molina A, Quesada-Pérez M, Barnadas-Rodríguez R, Estelrich J, Callejas-Fernández J. Aggregation of liposomes induced by calcium : A structural and kinetic study. *Phys Rev E* 2007;75:021912. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.75.021912>.
- [159] Vashchenko O V, Kasian NA, Budianska L V, Brodskii RY, Beshpalova II, Lisetski LN. Adsorption of ions on model phospholipid membranes. *J Mol Liq* 2018;275:173–7. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.11.053>.
- [160] Martín-Molina A, Lue L, Quesada-Pérez M, Bohinc K. Biointerfaces Interaction between charged lipid vesicles and point- or rod-like trivalent ions. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2019;178:525–9. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.02.010>.
- [161] Stolarczyk U, Sidoryk K, Cybulski M, Kubiszewski M. Design of Therapeutic Self-Assembled Monolayers of Thiolated Abiraterone. *Nanomaterials* 2018;8:1018. <https://doi.org/10.3390/nano8121018>.
- [162] Castillo-Santaella T Del, Maldonado-Valderrama J, Faraudo J, Martín-Molina A. Specific Ion Effects in Cholesterol Monolayers. *Materials (Basel)* 2016;9:340. <https://doi.org/10.3390/ma9050340>.
- [163] Ross M, Steinem C, Galla HJ, Janshoff A. Visualization of chemical and physical properties of calcium-induced domains in DPPC/DPPS Langmuir-Blodgett layers. *Langmuir* 2001;17:2437–45. <https://doi.org/10.1021/la001617x>.
- [164] Pan J, Tristram-Nagle S, Nagle JF. Effect of cholesterol on structural and mechanical properties of membranes depends on lipid chain saturation. *Phys Rev E* 2009;80:021931. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.80.021931>.
- [165] Jurak M. Thermodynamic Aspects of Cholesterol Effect on Properties of Phospholipid Monolayers : Langmuir and Langmuir – Blodgett Monolayer Study. *J Phys Chem B* 2013;117:3496–502. <https://doi.org/10.1021/jp401182c>.
- [166] Himeno H, Shimokawa N, Komura S, Andelman D, Hamada T, Takagi M. Charge-induced phase separation in lipid membranes. *Soft Matter* 2014;10:7959–67.

<https://doi.org/10.1039/C4SM01089B>.

- [167] Castillo-Santaella T, Yang Y, Martínez-González I, Miguel Á, Holgado-Terriza JA, Maldonado-Valderrama J, et al. Effect of Hyaluronic Acid and Pluronic-F68 on the Surface Properties of Foam as a Delivery System for Polidocanol in Sclerotherapy. *Pharm Artic* 2020;12:1039. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111039>.
- [168] Koga M, Kasayama S. Clinical impact of glycated albumin as another glycemic control marker. *Endocr J* 2010;1008090468-1008090468. <https://doi.org/10.1507/endocrj>.
- [169] Sbarouni E, Georgiadou P, Voudris V. Ischemia modified albumin changes – review and clinical implications. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:177–84. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2011.037>.
- [170] Gupta D, Lis CG. Pretreatment serum albumin as a predictor of cancer survival : A systematic review of the epidemiological literature. *Nutr J* 2010;9:1–16. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-9-69>.
- [171] Moschetti I. Human albumin solution for resuscitation and volume expansion the methodologist’s point of view. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;10:243–5. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001208.pub2.Background>.
- [172] Erstad BL, Gales BJ, D. W. The Use of Albumin in Clinical Practice. *Arch Intern Med* 1991;151:901–11. <https://doi.org/10.1001/archinte.1991.00400050051011>.
- [173] Crawford NF, Leblanc RM. Serum albumin in 2D: A Langmuir monolayer approach. *Adv Colloid Interface Sci* 2014;207:131–8. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.10.021>.
- [174] Miñones-Trillo J, Iribarnegaray-Jado E, García-Fernandez S, Sanz-Pedrero S. Monolayers of Human Serum Albumin. *Kolloid-Z u Z Polym* 1972;324:318–24. <https://doi.org/10.1007/BF01513334>.
- [175] Sánchez-González J, Ruiz-García J, Gálvez-Ruiz MJ. Langmuir-Blodgett films of biopolymers: A method to obtain protein multilayers. *J Colloid Interface Sci* 2003;267:286–93. [https://doi.org/10.1016/S0021-9797\(03\)00754-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9797(03)00754-9).
- [176] Toimil P, Prieto G, Mi J, Trillo JM, Sarmiento F. Monolayer and Brewster angle microscopy study of human serum albumin — Dipalmitoyl phosphatidyl choline mixtures at the air – water interface. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2012;92:64–73. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.11.022>.
- [177] Boury F, Panaiotov I, Proust JE. Dilatational Properties of POLY(D,L-laCtiC acid) and Bovine Serum Albumin Monolayers Formed from Spreading an Oil-in-Water Emulsion at the AirMTater Interface. *Langmuir* 1996;11:2131–6. <https://doi.org/10.1021/la00002a040>.
- [178] Campbell RA, Ang JC, Sebastiani F, Tummino A, White JW. Spread Films of Human Serum Albumin at the Air-Water Interface: Optimization, Morphology, and Durability. *Langmuir* 2015;31:13535–42. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b03349>.
- [179] Guastalla, J. C. R. Acad. Sci., Paris, 208, 1078. 1939.
- [180] Toimil P, Prieto G, Jr. JM, Trillo JM, Sarmiento F. Interaction of human serum albumin with monofluorinated phospholipid monolayers. *J Colloid Interface Sci* 2012;388:162–9.

<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.08.035>.

- [181] Furuno T. Atomic force microscopy study on the unfolding of globular proteins in the Langmuir films. *Thin Solid Films* 2014;552:170–9. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2013.12.052>.
- [182] Lu JR, Su TJ, Penfold J. Adsorption of Serum Albumins at the Air/Water Interface. *Langmuir* 1999;15:6975–83. <https://doi.org/10.1021/la990131h>.
- [183] Balashev K, Callisen TH, Svendsen A, Bjørnholm T. Savinase action on bovine serum albumin (BSA) monolayers demonstrated with measurements at the air – water interface and liquid Atomic Force Microscopy (AFM) imaging. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2011;88:582–6. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.07.043>.
- [184] Ortega-Vinuesa JL, Tengvall P, Lundstrom I. Molecular packing of HSA , IgG , and fibrinogen adsorbed on silicon by AFM imaging. *Thin Solid Films* 1998;324:257–73. [https://doi.org/10.1016/S0040-6090\(98\)00363-0](https://doi.org/10.1016/S0040-6090(98)00363-0).