



**FCQ**  
Facultad de  
Ciencias Químicas

**INTERACCIÓN DE NANOPARTÍCULAS CON SISTEMAS  
ORGANIZADOS QUE REVISTEN INTERÉS EN LAS  
NANOBIOCIENCIAS**

**TESIS DOCTORAL**

**Lic. Martín E. Villanueva**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Departamento de Química Orgánica**

**Instituto de Investigaciones en Físicoquímica de Córdoba (INFIQC)**

**Córdoba, Argentina**

**-2020-**

**CONICET**





El presente trabajo de tesis doctoral fue realizado en el Instituto de Investigaciones en Fisicoquímica de Córdoba, en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, bajo la dirección de la Dra. Raquel V. Vico y se presenta en consideración de dicha facultad para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas.

**Directora**

Dra. Raquel V. Vico

**Comisión Evaluadora**

Dra. María L. Fanani

Dr. Eduardo A. Coronado

Dra. María A. Perillo

**Evaluador externo**

Dr. Fernando Moyano



*A mi familia*

*A Flor*

*A Lorenzo*



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, agradecer a la Universidad Nacional de Córdoba y a la Facultad de Ciencias Químicas por la gran oportunidad que se me ha dado de poder llevar a cabo una formación de calidad y excelencia en la química y, particularmente, en la investigación científica que es para mí, una verdadera vocación.

Agradecer fundamentalmente a la Dra. Rita Hoyos de Rossi y todo el grupo del Laboratorio de Química Supramolecular y Materiales Nanoestructurados (SuNaLab) del Departamento de Química Orgánica de esta facultad por brindarme un lugar de trabajo y crecimiento académico fructífero. Al Dr. Eduardo A. Coronado, y las Dras. María L. Fanani y María A. Perillo, por el acompañamiento a lo largo de estos años. Al Dr. Fernando Moyano por su buena predisposición.

También agradecer al Dr. Tito Scaiano y la Dra. Anabel Lanterna por darme la oportunidad de realizar una enriquecedora estancia de investigación en la Universidad de Ottawa, Canadá.

A continuación, quisiera hacer presente mi gratitud para con todas las personas que de una u otra forma me brindaron su apoyo incondicional y su firme acompañamiento a lo largo de toda mi carrera, tanto de manera profesional como personal.

A Florencia, mi compañera y quien siempre me ha dado todo su cariño y sus fuerzas para superar cada obstáculo de la vida.

A mis padres, Nancy y Leonardo que me dieron todo su aliento en este camino y se reinventaron a cada segundo para darnos a mis hermanos y a mí, todo lo mejor de sus seres.

A mis hermanos Andrea y Federico, con quienes sea por donde sea que la vida nos haga naufragar en caminos diferentes, sabemos que tenemos un refugio eterno, estemos donde estemos.

A Martha, Dante, Rebecca y Ariadna, que son mi hogar y a quienes estaré eternamente agradecido por darme un lugar en sus vidas y por cada momento compartido.

A mis tíos Alejandra y Ricardo por escucharme siempre y transmitirme sus consejos cada vez que los necesité. A mi abuela Rosa, a quien siempre voy a llevar en mi corazón.

El amor por una profesión no sólo se adquiere por vocación o por todo lo que uno pueda llegar a ejercerla, sino por quienes son nuestros maestros y nos guían siempre a la par con comprensión y entusiasmo. Es por eso que quiero agradecer profundamente a mi directora de tesis, Raquel Vico por todos estos años de trabajo, por la confianza, los consejos de aliento y la paciencia en cada etapa de arduo aprendizaje.

Cuando uno trabaja en un ambiente de entendimiento, respeto y buen compañerismo, también se forma en algo mucho más importante que una carrera académica, se forma como buena persona. Agradezco a mis amigos del laboratorio por todos esos buenos momentos que sin duda alguna hicieron y seguirán haciendo de mi día a día, uno mejor que el otro. A John (Jairo), un amigo y hermano de la vida. A Noe y Vir, por todas las charlas, risas y peleas (muchas de las cuales tengo el agrado de haber ganado). Al dúo dinámico Fer y Ale. A mis amigos y amigas, Hugo, Johnny, Rodri, Andre, Jhoan, Eli y Sol.



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN</b>	I
<b>Lista de abreviaturas, símbolos y acrónimos</b>	V
<b>CAPÍTULO I. Introducción general</b>	1
<b>I.1- Paradigmas y fronteras de la nanotecnología. Hacia la investigación y el desarrollo en tecnologías de interés biomédico</b>	2
<b>I.2- Desafíos en el diseño de nanopartículas (NPs) para terapias biomédicas</b>	6
<b>I.2.1- Características fisicoquímicas de las nanopartículas</b>	6
<b>I.2.2- Fuerzas coloidales intrínsecas</b>	8
<b>I.2.3- Fuerzas en la nanobiointerfase</b>	11
<b>I.2.4- Endocitosis celular</b>	14
<b>I.3- Modelos de biomembranas para el estudio de la interacción con nanopartículas</b>	16
<b>I.3.1- Liposomas</b>	18
<b>I.3.2- Bicapas lipídicas soportadas (SLB)</b>	20
<b>I.3.3- Monocapas de Langmuir</b>	22
<b>I.4- CONCLUSIÓN</b>	24
<b>I.5- OBJETIVOS GENERALES</b>	25
<b>I.6- OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	25
<b>I.6- REFERENCIAS</b>	26
<b>CAPÍTULO II. Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata y nanopartículas magnéticas funcionalizadas con ácido oleico</b>	33
<b>II.1- INTRODUCCIÓN</b>	34
<b>II.1.1- Aspectos sintéticos de las nanopartículas de plata (AgNPs) y nanopartículas magnéticas (MNPs) para su empleo en el campo de las biociencias</b>	34
<b>II.1.2- Ligandos biocompatibles para la funcionalización de nanopartículas de interés biomédico</b>	43
<b>II.1.3- Caracterización de nanopartículas</b>	47
<b>II.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	63
<b>II.3- MATERIALES Y MÉTODOS</b>	63
<b>II.3.1- Síntesis y purificación de nanopartículas hidrofóbicas</b>	63

<b>III.3.2- Caracterización</b>	66
<b>II.4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	68
<b>II.4.1- Obtención de nanopartículas hidrofóbicas y estudio de sus propiedades fisicoquímicas</b>	68
<b>II.4.2- Caracterización estructural de las nanopartículas hidrofóbicas</b>	71
<b>II.5- CONCLUSIÓN</b>	81
<b>II.6- REFERENCIAS</b>	83
<b>CAPÍTULO III. Interacción de nanopartículas de plata funcionalizadas con ácido oleico (AgNP-OA) con modelos de biomembranas</b>	91
<b>III.1- INTRODUCCIÓN</b>	92
<b>III.1.1- Principales mecanismos de acción antimicrobiana de las nanopartículas de plata (AgNPs)</b>	92
<b>III.1.2- Nanopartículas de plata en aplicaciones biomédicas y estudios emergentes en relación a su interacción con biomembranas</b>	95
<b>III.1.3- Monocapas de Langmuir como sistema modelo de biomembranas para el estudio de interacciones entre nanopartículas y modelos de membranas celulares</b>	98
<b>III.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	108
<b>III.3- MATERIALES Y MÉTODOS</b>	109
<b>III.3.1- Monocapas de Langmuir</b>	109
<b>III.3.2- Caracterización topográfica y morfológica</b>	111
<b>III.3.3- Análisis de adsorción de fosfolípidos sobre las AgNP-OA por medio de XPS</b>	113
<b>III.3.4- Cuantificación de iones plata (Ag<sup>+</sup>)</b>	116
<b>III.4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	118
<b>III.4.1- Estabilidad, organización y propiedades mecánicas de las AgNP-OA en la interfase aire-agua</b>	118
<b>III.4.2- Interacción de las AgNP-OA con modelos de biomembranas</b>	121
<b>III.4.3- Rol de la composición estructural del núcleo en la interacción entre nanopartículas hidrofóbicas y biomembranas modelo</b>	131
<b>III.4.4- Films LB de AgNP-OA en interacción con las membranas modelo de estrato córneo</b>	137
<b>III.4.5- Adsorción de fosfolípidos en la superficie de las AgNP-OA</b>	140
<b>III.4.6- Liberación de iones Ag<sup>+</sup> desde AgNP-OA hidrofóbicas</b>	143
<b>III.5- CONCLUSIÓN</b>	146

<b>III.6- REFERENCIAS</b>	148
<b>CAPÍTULO IV. Actividad fusogénica de nanopartículas magnéticas hidrofóbicas en liposomas. Efectos en el proceso de fusión por aplicación de campos magnéticos.</b>	155
<b>IV.1- INTRODUCCIÓN</b>	156
<b>IV.1.1- Mecanismo y regulación biológica de la fusión de membranas lipídicas</b>	156
<b>IV.1.2- Liposomas como base de modelos de fusión</b>	159
<b>IV.1.3- Técnicas para el estudio de fusión en membranas</b>	163
<b>IV.1.4- Fusión inducida por diferentes agentes fusogénicos</b>	167
<b>IV.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	171
<b>IV.3- MATERIALES Y MÉTODOS</b>	173
<b>IV.3.1- Cuantificación de iones Fe<sup>3+</sup></b>	173
<b>IV.3.2- Preparación de LUVs (<i>Large Unilamellar Vesicles</i>)</b>	174
<b>IV.3.3- Cuantificación de fosfato</b>	175
<b>IV.3.4- Detección de fusión en LUVs inducida por MNP-OA</b>	176
<b>IV.3.4.1- Condiciones experimentales generales</b>	176
<b>IV.3.4.2- Dispersión dinámica de luz (DLS)</b>	177
<b>IV.3.4.3- Ensayos cinéticos de turbidimetría</b>	178
<b>IV.3.4.4 Parámetros empleados en las mediciones de fluorescencia (FL)</b>	178
<b>IV.3.4.5- Ensayos de mezclado de contenidos</b>	179
<b>IV.3.4.6- Ensayo de modulación de la fusión por campos magnéticos de potencial variable</b>	183
<b>IV.3.4.7- Ensayos de <i>leakage</i> o liberación de contenido interno</b>	184
<b>IV.3.4.8- Microscopía de transmisión electrónica (TEM) de LUVs/MNP-OA</b>	186
<b>IV.3.4.9- Marcado de las MNP-OA con la sonda fluorescente 16:0 NBD-PE</b>	187
<b>IV.3.4.10- Microscopía confocal</b>	189
<b>IV.4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	192
<b>IV.4.1- Cinética de crecimiento de las vesículas inducido por la adición de MNP-OA</b>	192
<b>IV.4.2- Mezclado de contenidos internos de LUVs inducido por las MNP-OA</b>	201
<b>IV.4.3- Regulación del proceso de fusión por medio de campos magnéticos de potencial variable</b>	207
<b>IV.4.4- Medición de la permeabilidad de membranas.</b>	212
<b>IV.4.5- Localización de las MNP-OA en bicapas lipídicas</b>	214

<b>IV.5- CONCLUSIÓN</b>	221
<b>IV.6- REFERENCIAS</b>	225
<b>CAPÍTULO V. Conclusión general y perspectivas futuras</b>	233
<b>V.1- CONCLUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	234
<b>APÉNDICE</b>	241
<b>IA- Cálculo del número de LUVs y MNP-OA empleadas en los ensayos de fusión y su relación en áreas</b>	242
<b>IIA- Cálculo del volumen interno disponible y dilución de sonda Tb/DPA en el buffer externo</b>	245
<b>IIIA- Dependencia de la determinación de parámetros cinéticos con los métodos físicos de medición</b>	247

## RESUMEN

En esta tesis se realizó un estudio acerca de la interacción entre nanopartículas (NPs) hidrofóbicas y diferentes modelos de biomembranas, a los fines de aportar conocimientos que permitan el futuro diseño racional de estos nanomateriales (NMs) para su uso en diversas aplicaciones en el campo de las biociencias.

Con este objetivo y como primera etapa del trabajo, se sintetizaron y purificaron nanopartículas de plata y nanopartículas magnéticas, ambas funcionalizadas con una monocapa de ácido oleico, denominadas AgNP-OA y MNP-OA, respectivamente. Las nanopartículas se caracterizaron exhaustivamente a través de diversas técnicas para determinar su estructura y propiedades. UV-Visible permitió corroborar las propiedades ópticas de las AgNP-OA y ensayos de magnetometría (VSM), determinar las propiedades magnéticas de las MNP-OA. Adicionalmente, se emplearon técnicas de espectroscopía infrarroja (FT-IR), análisis termogravimétrico (TGA), microscopía de transmisión electrónica (TEM), espectroscopía de fotoelectrones de rayos-X (XPS) y difracción de rayos-X de polvo (p-XRD) con las cuales fue posible acceder a información detallada sobre la morfología y las características estructurales de las nanopartículas que fueron luego, utilizadas en los ensayos frente a modelos de biomembranas. Estos resultados se presentan en el **capítulo II**.

En el **capítulo III**, se evaluó la capacidad de las AgNP-OA para incorporarse en biomembranas modelos y desempeñarse como potenciales agentes antimicrobianos en entornos lipofílicos. Para ello, se estudió la interacción de las AgNP-OA con fosfolípidos y mezclas de fosfolípidos empleando monocapas de Langmuir como sistema modelo de membranas. A estos ensayos, se adicionó el estudio la interacción de las AgNP-OA con un modelo de biomembrana que simula la composición del estrato córneo de la piel (SCM). La interacción AgNP-OA/SCM se evaluó en monocapas autoensambladas en la interfase aire/agua y en monocapas soportadas que fueron obtenidas mediante la técnica de Langmuir-Blodgett. Estos estudios, permitieron confirmar que las AgNP-OA inducen procesos de reestructuración en la organización molecular de los films lipídicos con un incremento en la elasticidad en el plano (fluidez) de los mismos. En conjunto con estudios realizados previamente en el laboratorio en monocapas mixtas de MNP-OA y los mismos fosfolípidos (y mezclas de ellos), fue posible determinar que existe una estrecha relación entre el

tipo de interacción que se establece entre las nanopartículas y las biomembranas, y la naturaleza del núcleo o *core* que conforma las NPs.

Conociendo que la identidad química de los nanomateriales puede modificarse ante su interacción con biomoléculas, hecho muy conocido para proteínas pero no informado en la literatura para lípidos de membrana, se evaluó la composición de las AgNP-OA luego de su interacción con fosfolípidos, las moléculas más abundantes en el entorno que ofrecen las membranas celulares. Luego de la interacción AgNP-OA/fosfolípidos presentes en vesículas multilamelares, se realizaron ensayos para evaluar la adsorción de fosfolípidos sobre la superficie de las NPs mediante XPS. Estos estudios mostraron que fosfocolinas son capaces de adsorberse en ciertas proporciones sobre el núcleo metálico, sin desplazar de manera significativa al ácido graso que estabiliza las NPs. Teniendo en cuenta que uno de los mecanismos por los cuales las AgNPs son capaces de ejercer actividad biocida es a través de la liberación de iones  $\text{Ag}^+$  desde el núcleo metálico, se cuantificó la liberación de estos iones desde las AgNP-OA por medio de una técnica colorimétrica empleando espectrofotometría UV-Visible. Los resultados encontrados indicaron que las AgNP-OA son capaces de ejercer una liberación prolongada de iones  $\text{Ag}^+$  en el tiempo, en concentraciones reportadas como antimicrobianas.

En el **capítulo IV** se evaluó la capacidad de las MNP-OA para promover procesos de fusión de bicapas lipídicas empleando liposomas como modelo de biomembranas. Para ello se realizaron diversos estudios, que permitieron confirmar que las MNP-OA son capaces de promover el proceso de fusión de vesículas. Se adquirió, además, información importante acerca de las proporciones, cinética y morfología de la reestructuración molecular que experimentan las bicapas lipídicas en presencia de diferentes concentraciones de nanopartícula.

Estudios realizados por DLS y potencial Z demostraron que existe un notorio proceso de reestructuración de las bicapas de los liposomas luego de incorporar las MNP-OA. Esta reestructuración conllevó en primera instancia, a la obtención de vesículas de tamaños más grandes, y pequeñas modificaciones de los potenciales de doble capa en las vesículas. Por medio del ensayo estándar de mezclado de contenidos internos, visualizado por la formación del complejo fluorescente  $\text{Tb}^{3+}/\text{DPA}$ , se demostró que las MNP-OA inducen fusión y el mezclado de los contenidos internos de las vesículas. Tanto en este caso como en mediciones realizadas por turbidimetría (espectrofotometría de absorción), fue posible determinar que la cinética y las proporciones en las que se llevan a cabo los procesos de agregación y fusión de las vesículas, son

dependientes de la concentración de MNP-OA incorporada a las estructuras lipídicas. Ensayos para la medición del grado de cambio en la permeabilidad de las vesículas hicieron posible corroborar que las NPs inducen un proceso de fusión de bicapas lipídicas que transcurre sin pérdidas aparentes de contenido interno.

Aprovechando las características superparamagnéticas de las MNP-OA, se evaluó la fusión de vesículas lipídicas en presencia de campos magnéticos de intensidades variables. Como resultado de estos estudios se encontró que las MNP-OA, son capaces de modificar de manera dinámica, las proporciones en las que se produce el mezclado de contenidos internos ante la aplicación de campos magnéticos de intensidad baja. De esta manera fue posible obtener un incremento aproximado del 20 % en el rendimiento del proceso de fusión.

Por último, se realizaron diversos estudios a través de técnicas de microscopía, destinadas a determinar la localización de las MNP-OA en los liposomas en el proceso de fusión. Utilizando TEM, se confirmó que las MNP-OA se ubican preferentemente sobre las bicapas lipídicas, a lo largo de toda la estructura de los liposomas. Seguidamente, un mayor detalle se obtuvo de mediciones de microscopía confocal de fluorescencia, donde a través del empleo de fluoróforos de marcación fue posible realizar experimentos de co-localización de sondas fluorescentes para determinar la localización precisa de las MNP-OA en el medio vesicular. Como resultado de estos estudios, se confirmó que las MNP-OA interactúan efectivamente con la bicapa de las vesículas lipídicas por medio de lo que podrían suponerse, interacciones hidrofóbicas sin producir cambios morfológicos detectables.

En el **capítulo V**, se exponen las conclusiones generales acerca del trabajo realizado en esta tesis doctoral. Los hallazgos aquí logrados, nos permitieron obtener el conocimiento suficiente acerca de las interacciones entre nanopartículas hidrofóbicas y sistemas de biomembranas modelo, como para proponer diferentes mecanismos de acción e interacción entre ambas estructuras, que permitan contribuir y guiar el desarrollo de sistemas de nanopartículas con aplicaciones en el campo de la biomedicina y la nanobiotecnología.



## Lista de abreviaturas, símbolos y acrónimos

16:0 NBD PE	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina- <i>N</i> -(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)
<sup>31</sup> P NMR	Resonancia magnética nuclear de fósforo
A	Área
AcH	Ácido acético
AFM	Microscopía de Fuerza Atómica
AgNP-OA	Nanopartículas de plata funcionalizadas con ácido oleico
AgNPs	Nanopartículas de plata
A <sub>ideal</sub>	Área ideal
AlK <sub>α</sub>	Ánodo de aluminio de radiación K <sub>α</sub>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATR	Reflectancia total atenuada
BAM	Microscopía de Ángulo de Brewster
BE	Energía de enlace
CB	Banda de conducción
Cer24	Ceramida C24
CF	Carboxifluoresceina
Cho	Colesterol
ChoS	Colesterol sulfato
Cit	Citrato
C <sub>s</sub>	Compresibilidad
C <sub>s</sub> <sup>-1</sup>	Módulo de compresibilidad
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
D <sub>avg</sub>	Diámetro promedio
D <sub>c</sub>	Diámetro crítico
DCL	Doble capa eléctrica
E <sub>MS</sub>	Energía magnetostática
DLS	Dispersión dinámica de luz
DMPC	1,2-dimiristoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
DMSO	Dimetilsulfóxido
ΔOD	Cambio de densidad óptica
DOPE	1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina
DPA	Ácido dipicolínico
DPPC	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
DSPC	1,2-distearoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
DTG	Derivada primera de un termograma
E <sub>(θ)</sub>	Energía de anisotropía magnética
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
E <sub>dw</sub>	Energía pared-dominio
EM	campo electromagnético

Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Magnetita
FEM	Fuerza electromotriz
FL	Fluorescencia
FMHW	Ancho de banda a media altura
FRAP	Recuperación de la fluorescencia luego del fotoblanqueo
FRET	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
FT-IR	Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier
$\gamma$	Tensión superficial
$\gamma_0$	Tensión superficial del agua
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Maghemita
GIXD	Difracción de rayos X de ángulo rasante
GTP <sub>asa</sub>	Guanosina trifosfatasa
GUVs	Vesículas unilamelares gigantes
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-il]etanosulfónico
H <sub>II</sub>	Fase hexagonal invertida
HIV	Virus de inmunodeficiencia humana
HOPG	Grafito pirolítico altamente orientado
HR XPS	Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X de alta resolución
IR	Infrarrojo
IRRAS	Espectroscopía infrarroja de reflexión-absorción
$\varphi_s$	Función trabajo del espectrómetro de XPS
$k$	Constante de velocidad
$k_B$	Constante de Boltzmann
$K_{eff}$	Constante de anisotropía
L	Lamelar
LA	Ácido lignocérico
LB	Langmuir-Blodgett
LC	Fase líquido condensada
LE	Fase líquido expandida
LFS	Spray de flama líquida
LS	Langmuir-Schaefer
LSPR	Resonancia de plasmón superficial localizada
LUVs	Vesículas unilamelares grandes
$\mu_0$	Permeabilidad en el vacío
MBA	Ácido 3-mercaptobenzoico
MgK $\alpha$	Ánodo de magnesio de radiación K $\alpha$
ML	Monocapa de Langmuir
MNP-OA	Nanopartículas magnéticas funcionalizadas con ácido oleico
MNPs	Nanopartículas magnéticas
MRI	Resonancia Magnética de Imágenes
$n$	Índice de refracción
NaAc	Acetato de sodio
NCs	Nanocubos
NHI	<i>National Health Institute</i>

NMs	Nanomateriales
NPs	Nanopartículas
NSs	Nanoesferas
OA	Ácido oleico
OD	Densidad óptica
$\pi$	Presión de superficie
$\pi_c$	Presión de colapso
PDI	Índice de polidispersidad
PEG	Polietilenglicol
POPC	1-palmitoil-2-oleoyl- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
PS	Fosfatidilserina
p-XRD	Difracción de rayos X de polvo
$R_h$	Radio hidrodinámico
ROS	Especies reactivas del oxígeno
S/V	Relación superficie sobre volumen
SCM	Mezcla similar estrato córneo
SEM	Microscopía de barrido electrónico
SFG	Espectroscopía vibracional de generación de frecuencias aditivas
siARN	Small interfering ARN
SLB	Bicapas lipídicas soportadas
SPIONs	Nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas
SPR	Resonancia del Plasmón Superficial
SUVs	Vesículas unilamelares pequeñas
T	Temperatura
TEM	Microscopía de transmisión electrónica
TES	Ácido 2-[[1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il]amino]etanosulfónico
TGA	Análisis termogravimétrico
THF	Tetrahidrofurano
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
Tr	Relación de transferencia
UHV	ultra alto vacío
UV	Ultravioleta
$v_0$	Velocidad inicial
VSM	Magnetómetro de muestra vibrante
$X^{\text{AgNP-OA}}$	Fracción molar de nanopartículas de plata
$X^{\text{L}}$	Fracción molar de lípido
$X^{\text{MNP-OA}}$	Fracción molar de nanopartículas magnéticas
XPS	Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X
XRD	Difracción de rayos X



*Vivir en el mundo sin percatarse del significado del mismo  
es como deambular por una gran biblioteca sin tocar sus libros.*

**Las enseñanzas secretas de todos los tiempos**



# CAPÍTULO I

## Introducción general

### **RESUMEN**

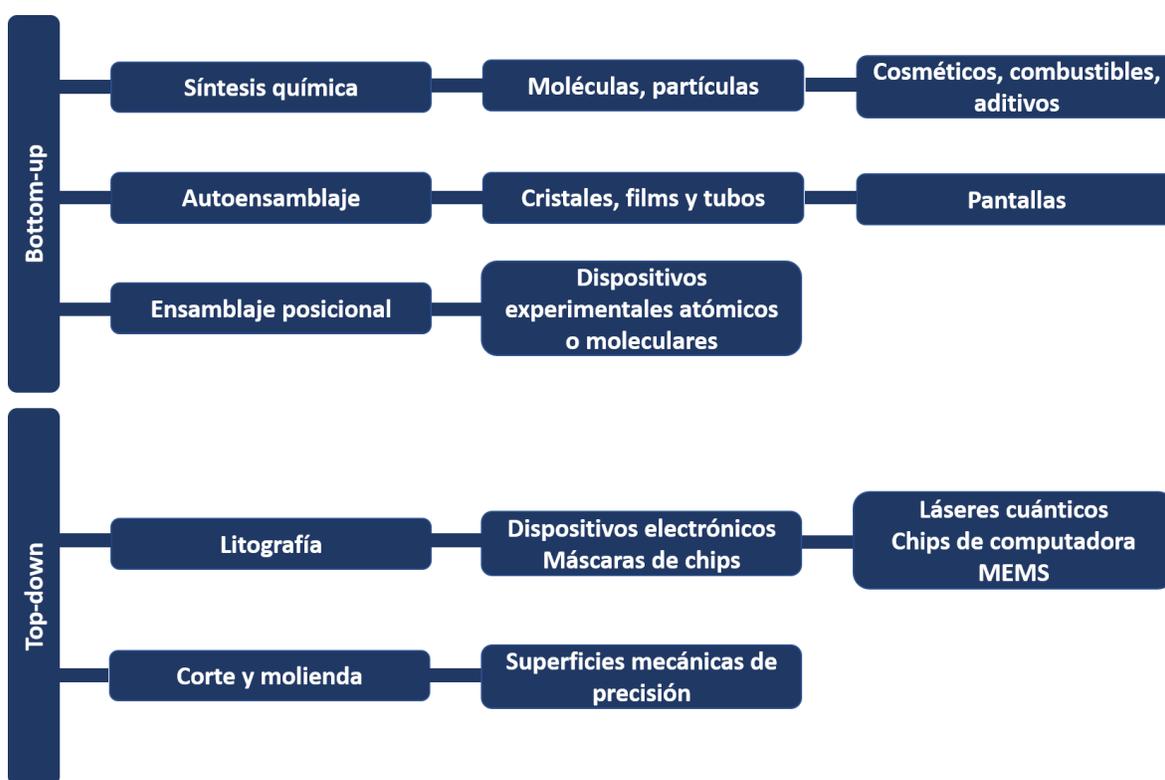
En este capítulo introductorio se abarcarán aspectos teóricos fundamentales para el marco contextual en el que se sitúa el presente trabajo de tesis. Dichos aspectos tienen en cuenta los avances en el diseño de plataformas nanobiotecnológicas para su implementación en las ciencias biomédicas y áreas afines. Se expondrán además los diferentes desafíos que plantea el desarrollo de nanopartículas (material bajo estudio) para aplicaciones de esta naturaleza y las principales metodologías que son empleadas para el estudio, entendimiento y caracterización de las interacciones entre nanopartículas y membranas lipídicas. Por último, se detallarán los objetivos generales que serán desarrollados a lo largo de esta tesis doctoral.

## **I.1- Paradigmas y fronteras de la nanotecnología. Hacia la investigación y el desarrollo en tecnologías de interés biomédico**

La nanotecnología representa uno de los campos de mayor desarrollo científico y tecnológico en la actualidad. Si bien se tienen registros de su estudio, que datan incluso de épocas anteriores al primer reporte publicado en nanociencia por Michael Faraday en el año 1857 (soluciones coloidales de oro), el origen de la nanotecnología se asocia usualmente a las ideas expuestas por Richard Feynmann en el año 1959. En su conferencia “*There’s plenty of room at the bottom*”, el físico norteamericano visionó por primera vez, la idea de manipular partículas o materiales a escala molecular y atómica. Sin embargo, el término “nanotecnología” fue acuñado en 1974 por el científico de la Universidad de Tokio, Norio Taniguchi, en su trabajo titulado “*On the Basic Concept of Nanotechnology*”. El catedrático describió estructuras con dimensiones ultrapequeñas de alta precisión, y pronosticó su aplicación a futuro en circuitos integrados y dispositivos de memoria computacional. Más adelante la nanotecnología fue definida por el *National Health Institute* (NHI, 2000) como la ciencia encargada de la investigación y el desarrollo tecnológico a niveles atómicos, moleculares o macromoleculares en un rango de tamaños de 1 a 100 nm con el fin de proveer el entendimiento de los fenómenos fundamentales y los materiales en la nanoescala, para crear estructuras con propiedades diferentes a las de los materiales masivos. En ese momento y a estas escalas, las estructuras de las cuales se disponía de mayor información y conocimiento sobre su desempeño inteligente, capaces de mediar respuestas selectivas y organizadas, eran nada más ni nada menos que las biomoléculas. Consecuentemente, algunos de los más grandes progresos que realizó el área en cuestión, no devinieron de otra fuente sino de la imitación del comportamiento y propiedades de estructuras biológicas. Virus, péptidos, ADN, y células como los eritrocitos, entre otros, han constituido algunos de los primeros bloques de construcción en el desarrollo de plataformas a escala nanométrica o nanomateriales (NMs). Así, con el transcurso de los años la nanotecnología no sólo se ha convertido en uno de los campos líder en investigación y producción científica, sino que también ha permitido el desarrollo de nuevas metodologías para la fabricación y caracterización de plataformas con aplicaciones biotecnológicas, dando lugar a lo que se conoce hoy en día como *nanobiotecnología*.<sup>1,2</sup>

La fabricación de los NMs, puede ser concebida por los métodos “*bottom up*” y “*top down*”, los cuales constituyen los paradigmas centrales de la nanociencia y la nanotecnología. En métodos

de *bottom up*, los nanomateriales se desarrollan por medio de la construcción a partir de átomos o moléculas de forma controlada y por medio de la regulación de las propiedades termodinámicas y cinéticas como autoensamblaje, precipitación y cristalización. Por otra parte, los métodos de *top down* involucran el desarrollo de las estructuras nanométricas a través de metodologías de reducción del tamaño, tales como fotolitografía, nanomoldeado, litografía y nanofluídica.<sup>3</sup> Los diferentes métodos diseñados para la fabricación de los NMs, tienen su base en estos dos paradigmas emergentes y dependen además de la estructura y las propiedades fisicoquímicas del material bajo desarrollo (**Figura I.1.1**).



**Figura I.1.1.** Técnicas principales de manufactura de los nanomateriales y algunas de sus aplicaciones derivadas. Adaptado de Sutariya, V. B.; Pathak, Y. *Biointeractions of Nanomaterials*; CRC Press, 2014.

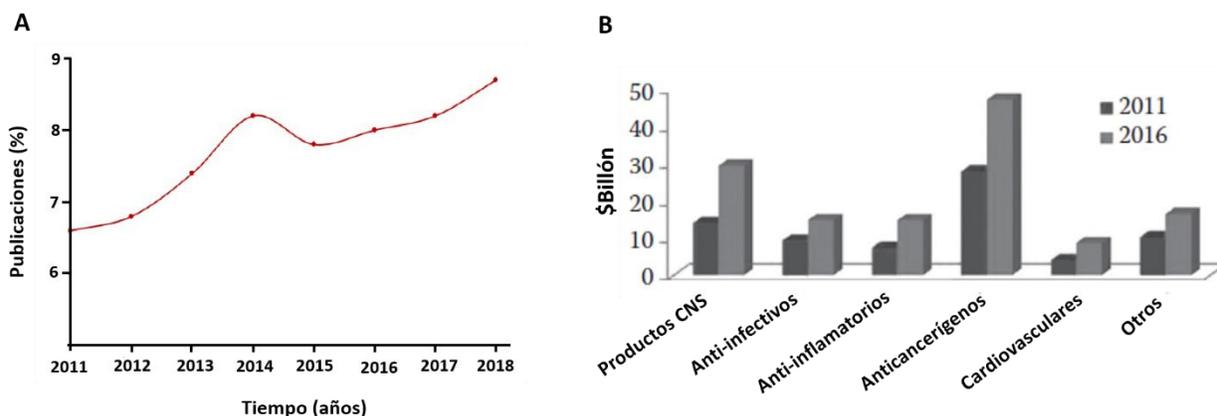
De manera general, la reducción del tamaño tiene un rol crucial en lo que respecta a aplicaciones biotecnológicas y farmacéuticas. Por ejemplo, partículas de un tamaño aproximado de 12 nm de diámetro, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, y nanomateriales con tamaños del

orden de los micrómetros, pueden ser fagocitados por las células con una gran eficiencia.<sup>4</sup> Así, las diferentes vías endocíticas por las que los NMs sean capaces de ingresar a las células dependerá de las características estructurales como tamaño y forma, pero también de las propiedades fisicoquímicas intrínsecas y la química de superficie de los nanomateriales diseñados.<sup>5</sup> Las técnicas de síntesis actuales, han permitido una mejor manipulación de las propiedades ópticas, magnéticas y fisicoquímicas en general de los NMs, dando lugar a la obtención de sistemas multicomponente con capacidad de acción efectiva en aplicaciones terapéuticas.<sup>6</sup>

Dependiendo del método de preparación, es posible obtener diferentes NMs tales como nanopartículas (NPs), nanoesferas (NSs), o nanocápsulas (NCs). Las nanocápsulas constituyen sistemas donde diferentes drogas pueden ser confinadas en el interior de una cavidad rodeada por una membrana polimérica, mientras que las nanoesferas son sistemas tipo matriz, donde la droga se encuentra física y uniformemente dispersa.<sup>3,7</sup> En los últimos años se han empleado nanopartículas poliméricas recubiertas con ligandos biocompatibles y biodegradables (Ej.: PEG) como potenciales sistemas de transporte de fármacos dada su habilidad para circular por el torrente sanguíneo durante tiempos prolongados, su capacidad para poder ser direccionadas a un órgano específico, como transportadoras de ADN en terapia génica e incluso como transportadoras de proteínas.<sup>8</sup> Gracias a su tamaño pequeño, las nanopartículas son capaces de atravesar la barrera endotelial de sitios inflamados, el epitelio, tumores, etc.<sup>9</sup> La posibilidad de alternar entre diversos tamaños y formas a escala nanométrica, les permite además una captación eficiente por parte de diversos tipos celulares y, por ende, su acumulación selectiva en sitios específicos.<sup>10</sup> Entre otras de las grandes ventajas, las NPs son capaces de proteger agentes terapéuticos contra factores de degradación, incrementando la solubilidad y la biodisponibilidad de las drogas, disminuyendo efectos tóxicos y efectuando una liberación continua y controlada de estos fármacos en diferentes terapias biomédicas.<sup>8</sup>

Con todo, la era actual ha sido testigo de un avance sin precedentes del crecimiento en la investigación y aplicaciones de la nanotecnología. Según la base de datos estadística StatNano<sup>11</sup>, sólo en 2018 se han publicado más de 166.000 artículos científicos relacionados con nanotecnología. En ese año, la cantidad de artículos científicos y revisiones relacionadas al área fue equivalente al 9% de las publicaciones científicas totales, alcanzando el valor más alto desde el 2014 (**Figura I.1.2A**). Asimismo, la nanotecnología ha alcanzado un gran desarrollo en aplicaciones medicinales, diagnóstico *in vitro* e *in vivo*, transporte y liberación de fármacos, etc.

Acorde a estadísticas emitidas por la agencia *BCC Research*,<sup>12</sup> las ventas globales de dispositivos actualmente comercializados en nanomedicina incrementaron en casi 60 billones de dólares entre los años 2011 y 2016. Entre los sistemas de mercado en circulación, se encuentran nanopartículas poliméricas, liposomas, nanopartículas sólido-lípido, sistemas micelares, virosomas, etc., todos ellos para usos en terapias como anticancerígenos, antimicrobianos y cardiovasculares, por mencionar algunos ejemplos (**Figura I.1.2B**).



**Figura I.1.2.** Estadísticas informadas por diferentes portales de bases de datos. **A.** Porcentaje de publicaciones en nanotecnología en relación a las publicaciones científicas totales a lo largo del tiempo. Extraído de StatNano. *Statistics in nano-based science, technology, and industry* <https://statnano.com/>. **B.** Crecimiento lustral del mercado en plataformas nanobioteconológicas por área terapéutica. Extraído de BBC. *Market Research Reports*. <https://www.bccresearch.com/market-research/nanotechnology>.

Paradójicamente y pese al sinnúmero de avances que se han realizado entorno a la nanobioteconología durante el siglo 21, esta continúa siendo un campo en estado incipiente. Precisamente, los tiempos necesarios para que se desarrolle esta área dependen críticamente del entendimiento de las propiedades físicas y químicas de los NMs diseñados. Este conocimiento es fundamental para amalgamar los NMs a los procesos biológicos que intervienen en la naturaleza.

## I.2- Desafíos en el diseño de nanopartículas (NPs) para terapias biomédicas

### I.2.1- Características fisicoquímicas de las nanopartículas

Una vasta cantidad de investigaciones en relación al desempeño biotecnológico de las NPs, han permitido demostrar que las características fisicoquímicas de estos sistemas, tales como: el tamaño, la forma, el área superficial y la composición química, juegan un rol significativo en la determinación de las respuestas biológicas obtenidas. Aunque resulta atractivo considerar las NPs como entidades simples, las mismas son de hecho, muy complejas. Por ello, la obtención del conocimiento apropiado acerca de todas las variables que intervienen en el sistema bajo desarrollo es de fundamental importancia sobre todo en lo que concierne a aplicaciones biomédicas.<sup>13</sup>

Cualquier nanopartícula tendrá una relación superficie a volumen (S/V) excepcionalmente alta; principal razón de sus propiedades únicas. En otros términos, la gran área superficial de las NPs en relación a su volumen total trae como consecuencia, incluso en casos de NPs simples, que la química de su superficie sea totalmente distinta a la del material que compone la parte interna de la nanopartícula. Así por ejemplo, NPs de SiO<sub>2</sub> expondrán en su superficie grupos OH fuertemente adsorbidos, mientras que su interior carecerá de dichos grupos.<sup>14</sup> Si se compara la relación S/V de las nanopartículas con la de sistemas macroscópicos o moléculas, se encuentra que la relación de S/V de las NPs, tiene valores intermedios respecto a la baja relación S/V que poseen los materiales macroscópicos (sistemas de sólidos extendidos) y la relación extremadamente alta que presentan las moléculas. Esta propiedad es de vital importancia en la optimización de sistemas para el transporte de fármacos y efectos terapéuticos de diversa naturaleza. Como se verá en el **capítulo III**, las áreas superficiales grandes en nanopartículas metálicas dan lugar a sistemas eficientes en tratamientos antimicrobianos, donde se logra un excelente compromiso entre captación del nanomaterial por parte de las células y cantidad de especies reactivas del oxígeno (ROS) producidas, para efectuar la degradación del ADN microbiano y otras estructuras celulares.<sup>15</sup>

Otra de las ventajas estratégicas de las nanopartículas para el diseño de materiales biomédicos radica en la posibilidad de otorgarles modificaciones versátiles. Esto les permite actuar como plataformas para el ensamblaje de estructuras multifuncionales bien definidas. Diferentes tipos de ligandos o funcionalidades, pueden a la vez conferirles propiedades para el monitoreo, el mapeo y

la direccionalidad en sistemas biológicos. Diversas investigaciones han puntualizado este fenómeno con el ensamblaje exitoso de sistemas de NPs de relevancia biomédica.<sup>16,17</sup> En materia de composición química, aspectos adicionales relacionados a la síntesis y funcionalización de nanopartículas para aplicaciones biomédicas serán abordados en el **capítulo II**.

Como se mencionó previamente, la forma de los NMs, juega también un papel importante en su función frente a sistemas biológicos. Se han utilizado moldes o *templates* para la síntesis controlada de nanoestructuras.<sup>18</sup> Mediante diferentes métodos de manufactura, las nanopartículas pueden adquirir una multiplicidad de formas de manera homogénea o heterogénea según la aplicación para la cual estén destinadas.

La forma de los nanomateriales tiene un efecto directo en el funcionamiento *in vivo* de las NPs. Muchos grupos de investigación han explorado cómo la forma de los NMs afecta a la captación celular, especialmente por medio de la variación de la relación de aspecto (ej.; nanotubo, nanopartícula, nanocubos, etc.). Los hallazgos deducidos de estas investigaciones han demostrado que el control sobre la relación de aspecto es un factor determinante para la captación celular. De igual manera, la presencia de esquinas, bordes o defectos, guarda una estrecha correlación con la toxicidad, debido a que el incremento en el área disponible que estas configuraciones traen aparejadas, ayuda a la adsorción y unión de compuestos, además de aumentar la producción de sitios para la generación de ROS.<sup>19,20</sup>

Como se explicará en secciones posteriores, la identidad química de las nanopartículas también se verá afectada como resultado de la interacción con las moléculas presentes en medios biológicos (proteínas, carbohidratos, lípidos, etc.). Sin embargo, es válido aclarar en este punto, que a fin de efectuar la elección adecuada del tipo de nanomaterial necesario para ejercer una determinada actividad biomédica (biocida, terapéutica, etc.), la forma con la que los NMs deben ser diseñados también debe tener en cuenta factores como la estabilidad de estas estructuras ante la exposición prolongada en medios biológicos, las características fisiológicas a las cuales se enfrentarán y el sitio específico hacia donde serán direccionados.<sup>15,19</sup> Si, por ejemplo, se requiriese su ingreso al interior de las células, la *nanoforma* más ventajosa será aquella que le permita al nanomaterial interactuar con las moléculas y los receptores de las membranas de la manera más efectiva y pasiva posible para llevar a cabo la endocitosis celular.<sup>5,21</sup>

Además, es sabido que los procesos evolutivos propios de bacterias y virus, les permiten una continua adaptabilidad a agentes biocidas que pueden ser reconocidos por estos

microorganismos.<sup>15</sup> Los microorganismos, en consecuencia, modifican su estructura celular por medio de diversas mutaciones para evadir la captación en este caso, de nanomateriales con una morfología determinada. Es por ello, que una gran variedad de las investigaciones actuales se encuentran avocadas al desarrollo de sistemas de nanomateriales con superficies similares a las que se encuentran en muchos insectos, y que poseen actividad bactericida por mecanismos de muerte por contacto o *efecto aguja*.<sup>22</sup> Así, este tipo de NMs, puede anclarse a la pared celular de las células bacterianas produciendo su ruptura y eliminando al microorganismo en cuestión.

Sucesivamente, muchas propiedades intrínsecas de las nanopartículas que dependen del material del cual se componen contribuyen a la respuesta final frente a sistemas biológicos y son ampliamente explotadas a los fines de las aplicaciones para los que se destinan estos NMs. Las propiedades ópticas han sido relevantes en el desarrollo de tecnologías como agentes para la obtención de imágenes y sensores. En ellas el fenómeno de oscilación colectiva de los electrones de la banda de conducción de NPs metálicas (resonancia de plasmón superficial, SPR), ha sido estudiado de tal manera que las correspondientes bandas de absorción pueden ser modificadas para alcanzar efectos particulares.<sup>23,24</sup> La aplicación de estímulos externos tales como el calentamiento magnético o la irradiación con luz UV, visible o IR, les confiere a las nanopartículas magnéticas la capacidad de alcanzar respuestas con alta sensibilidad y eficiencia en terapias de hipertermia, resonancia magnética de imagen (MRI) y transporte direccionado de fármacos.<sup>25,26</sup>

### **I.2.2- Fuerzas coloidales intrínsecas**

Por definición, las nanopartículas constituyen una sub-fracción de lo que se define como “coloides” por la IUPAC.<sup>27</sup> Un sistema coloidal es en general, un sistema de al menos dos fases constituido por un medio dispersante y un medio disperso, los cuales pueden encontrarse en fase gas, líquido o sólido. Dichos sistemas son ampliamente conocidos como dispersiones (sólido en líquido), emulsiones (líquido en líquido) y aerosoles (sólido en gas).<sup>14</sup> Como partículas coloidales en la escala nanométrica o *nanocoloides*, las NPs exhiben un comportamiento colectivo en el fluido en el cual se encuentran dispersas, de tal manera que las propiedades de todo el producto dependen tanto de las partículas como del fluido. Además, en muchos casos es necesario considerar la capa interfacial que cubre las partículas, no sólo como componentes esenciales para proveer estabilidad

sino también por el efecto en las propiedades de los nanocoloides. Esta capa interfacial puede estar compuesta por iones adsorbidos, ligandos de superficie que cumplen la función de estabilizantes o agentes pasivantes.<sup>3,14</sup>

Las NPs inmersas en un determinado solvente, se comportan como sistemas dinámicos en continuo movimiento Browniano. Esto es, se mueven espontáneamente y al azar en el medio dispersante. Este movimiento está definido por la ley de difusión de Einstein según la **ecuación I.1.1.**

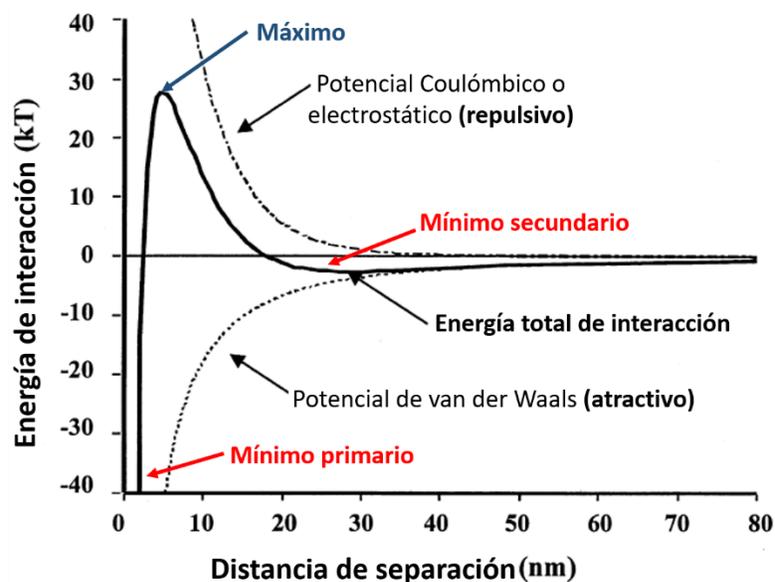
$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (\text{I.1.1})$$

Donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann;  $T$ , la temperatura;  $\eta$ , el índice de viscosidad del medio, y  $R_h$ , el radio hidrodinámico de la partícula.

Si bien existen coloides termodinámicamente estables en equilibrio (2D o bidimensionales), la mayoría de los coloides se encuentran en estados metaestables (todo coloide tridimensional o 3D), cinéticamente controlados. Cualquier evento de colisión entre dos partículas, resultará en la agregación y precipitación de las nanopartículas. De esta manera, surge la necesidad de estabilizar la dispersión de NPs por medio de barreras de potencial que eviten la aproximación de las partículas. Las barreras de potencial típicas corresponden a interacciones electrostáticas y estabilización estérica.<sup>28</sup> El primer caso está asociado a la disposición de cargas superficiales de las partículas en dispersión; las mismas, poseen fuerzas iónicas altas que les confieren cargas capaces de producir fuerzas repulsivas de largo alcance. Estas fuerzas repulsivas son las responsables de prevenir la agregación. La carga de la superficie en un determinado líquido puede lograrse de diversas maneras tales como: ionización de grupos ácidos carboxílicos o aminas, adsorción o unión de iones desde la solución en la superficie, y presencia de defectos de red en fases dispersas. De acuerdo al modelo de Gouy-Stern-Chapman, la doble capa eléctrica (DCL) formada en la superficie de las nanopartículas en solución como consecuencia de estos factores, es la responsable de dictar el comportamiento electrostático de los nanocoloides en un determinado medio.<sup>28</sup> En la estabilización estérica, moléculas poliméricas relativamente largas se unen a la superficie de las NPs. Bajo ciertas condiciones de solvatación, las cadenas se extienden en solución, de manera tal que la barrera para la agregación (ejercida por las fuerzas atractivas de van der Waals), se relaciona con las interacciones relativas entre cadenas poliméricas y entre estas

últimas y el solvente. De esta manera, para que las partículas puedan agregarse, el solvente debe ser eliminado de las regiones interpartícula y alrededor de las cadenas. Dado que este proceso es energéticamente desfavorable, la agregación es subsecuentemente prevenida. En la **Figura I.1.3** se esquematizan las curvas de energía potencial en función de la distancia según la teoría DLVO. Este modelo estima las fluctuaciones de energías potenciales que atraviesa un sistema de dos partículas en aproximación continua, y cuya interacción responde fundamentalmente a fuerzas electrostáticas repulsivas y fuerzas de van der Waals atractivas.<sup>29</sup> Dependiendo de la distancia entre ambas partículas, las mismas se encontrarán en un estado de dispersión estable (máximo de energía potencial), en estado de agregación irreversible (mínimo primario) o en un estado de reversibilidad metaestable (mínimo secundario). Adicionalmente, propiedades como la hidrofiliidad, hidrofobicidad, repulsión osmótica y depleción de iones, intervienen activamente en las fuerzas que operan en la interfase partícula-medio y deben ser igualmente consideradas en las estrategias para la estabilización de estos sistemas.<sup>30</sup>

Como se ha visto, muchas de las fuerzas promovidas por las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas inmersas en un determinado solvente, permiten entender gran parte del comportamiento de este tipo de sistemas coloidales. Sin embargo, los desafíos que plantea la interacción de las nanopartículas frente a sistemas biológicos en lo que se ha llegado a definir como *nanobiointerfases*, hacen que sea necesario abordar el estudio de una importante cantidad de variables adicionales, bajo las cuales tanto la química como la física de las NPs, están supeditadas a cambios dinámicos de diversa magnitud.



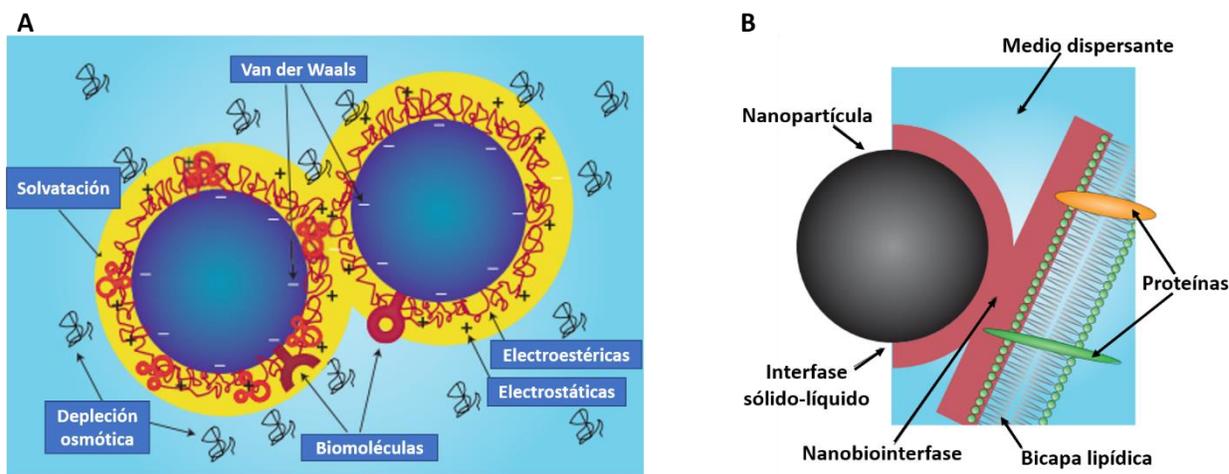
**Figura I.1.3-** Representación esquemática del perfil de energía de interacción en función de la distancia de separación entre dos partículas, obtenido del modelo DLVO. Adaptado de Adaira, J. H., Suvacib, E., Sindela, J. *Encyclopedia of Materials: Science and Technology. Surface and Colloid Chemistry*; Elsevier Ltd., **2001**; pp 1–10.

### I.2.3- Fuerzas en la nanobiointerfase

La nanobiointerfase comprende las interacciones fisicoquímicas dinámicas, la cinética, y los intercambios termodinámicos entre la superficie de los nanomateriales y las superficies de los componentes biológicos (por ejemplo: proteínas, membranas, fosfolípidos, vesículas endocíticas, organelas, ADN y fluidos biológicos).<sup>31,32</sup> Bajo la existencia de todos los factores y fuerzas involucradas en la interacción entre las NPs y el medio en el cual se dispersan, el sistema ya en un estado metaestable, está sujeto además al ambiente inhomogéneo y dinámico que aportan las nanobiointerfases. Esta inhomogeneidad interfacial resulta de la distribución y las distintas localizaciones espaciales de las proteínas, lípidos y estructuras glicosiladas en la superficie de las membranas o bien de las biomoléculas presentes en los diferentes fluidos.

Como puede intuirse entonces, la nanobiointerfase no se encuentra en un estado estacionario, sino que atraviesa cambios continuos como resultado de las transformaciones celulares y las influencias del ambiente. Por ejemplo, los productos secretados por las células pueden cambiar determinadas propiedades del medio de suspensión (fuerza iónica, pH, osmolaridad, etc.), y las

NPs pueden unirse a estas biomoléculas en suspensión o a la membrana celular.<sup>31</sup> De manera recíproca, los componentes biológicos interactuantes pueden verse influenciados por la naturaleza de las partículas, por ejemplo, a través de la unión con ligandos de superficie, contacto con regiones hidrofóbicas o cargadas, cambios en la energía libre de superficie que induce cambios conformacionales, o daños oxidativos causados por ROS. En la **Figura I.1.4** se resumen algunas de las características mencionadas para estos sistemas y su relevancia en los procesos de interacción en la nanobiointerfase. En consecuencia, algunos de los principales procesos que tienen lugar entre las nanopartículas y los componentes biológicos tales como la formación de coronas proteicas (“*protein corona*”), o la captación celular por endocitosis, translocación o incorporación en la superficie de las membranas, han sido explorados no sólo con fines tecnológicos sino también con el objetivo de establecer principios y procedimientos para la manufactura segura de nanobiomateriales con salida al mercado.<sup>33</sup>



**Figura I.1.4.** A. Fuerzas de interacción entre NPs (electrostáticas, van der Waals, covalentes, etc.), y otras interacciones importantes (adsorción de biomoléculas, depleción, etc.) en el medio en el cual se dispersan. B. Representación de la interfase nanopartícula-bicapa lipídica. En la imagen se señalan algunos de los principales componentes intervinientes en el comportamiento de la interacción entre los nanocoloides y las membranas celulares. Esquemas adaptados de Nel, A. E.; Mädler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M. V; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M. Understanding Biophysicochemical Interactions at the Nano-Bio Interface. *Nat. Mater.* **2009**, 8 (7), 543–557.

El concepto de nanopartícula-corona proteica, es importante en la determinación de las propiedades finales de superficie, carga, resistencia a la agregación y tamaño hidrodinámico de las partículas. Las partículas unidas a proteínas en fluidos biológicos constituyen la nanobiointerfase inicial que experimenta cambios dinámicos durante la movilización de las partículas en los diferentes compartimentos fisiológicos o dentro de las células. Dado que la formación de la corona es también un proceso competitivo donde diferentes proteínas compiten por la adsorción en las NPs; la cinética de asociación/disociación entre nanopartículas y proteínas, y su concurrente intercambio con proteínas libres en el medio, tiene también un rol fundamental en la elucidación de las interacciones predominantes con superficies biológicas y receptores. En suma, la composición y el comportamiento del complejo NP-corona proteica depende de una gran diversidad de factores relacionados a la composición, estructura y propiedades fisicoquímicas de nanopartículas y proteínas como componentes puros, a las características de ambas entidades en asociación, y la naturaleza del ambiente fisiológico en el que se encuentran (sangre, fluido intersticial, citoplasma, etc.).<sup>34</sup>

La internalización en las células introduce a las NPs hacia nuevas interfases, y tanto la adhesión como la envoltura de los coloides durante estos procesos, se encuentran reguladas por fuerzas y fenómenos interfaciales diferentes. Para que las nanopartículas en cuestión sean capaces de atravesar las barreras que impiden la captación celular, numerosas interacciones específicas y no específicas deben llevarse a cabo dentro de los intervalos de tiempo en los que transcurre la aproximación y anclaje a de las NPs a la bicapa. Algunas de las interacciones específicas son aquellas que se encuentran mediadas por ligandos de superficie que le permiten al material, su unión con moléculas complementarias o receptores en la membrana celular. Para suplir este propósito, los receptores de membrana deben difundir hacia los sitios de adhesión y asistir la formación de un número crítico de interacciones.<sup>35</sup> Una vez que la unión, ligando-receptor ha sido efectivamente alcanzada, la interacción cooperativa debe generar la energía suficiente como para sobrepasar el retroceso elástico que sufre la membrana (fuerza resistiva).<sup>36</sup>

Por otro lado, fuerzas atractivas no específicas que promueven el contacto celular resultan de las características intrínsecas del material como las mencionadas en **I.2.2**, tales como carga superficial, hidrofobicidad y rugosidad.<sup>30</sup> La carga superficial cumple un rol importante en las interacciones entre partículas y fosfolípidos con grupos polares cargados o dominios proteicos en superficies celulares. Considerar el rol de la hidrofobicidad en la captación celular es más

complicado dada la posible hidratación de las superficies de nanopartículas y membranas celulares. Esto da lugar a una serie de interacciones dinámicas cuyo resultado final está determinado por la fuerza de las interacciones entre las moléculas de agua y la superficie de los materiales, en relación a los enlaces formados entre moléculas de agua. Simulaciones computacionales realizadas con partículas de grafeno y membranas modelo han demostrado que la internalización de NPs hidrofóbicas se encuentra ampliamente favorecida debido a la hidrofobicidad del espacio interno de la membrana.<sup>37</sup> Los efectos de superficie son también alterados por la rugosidad de las superficies en la nanoescala, de tal manera que asperezas, defectos o protrusiones en las membranas, dictan en igual medida el comportamiento de la interacción NP-célula.

#### **I.2.4- Endocitosis celular**

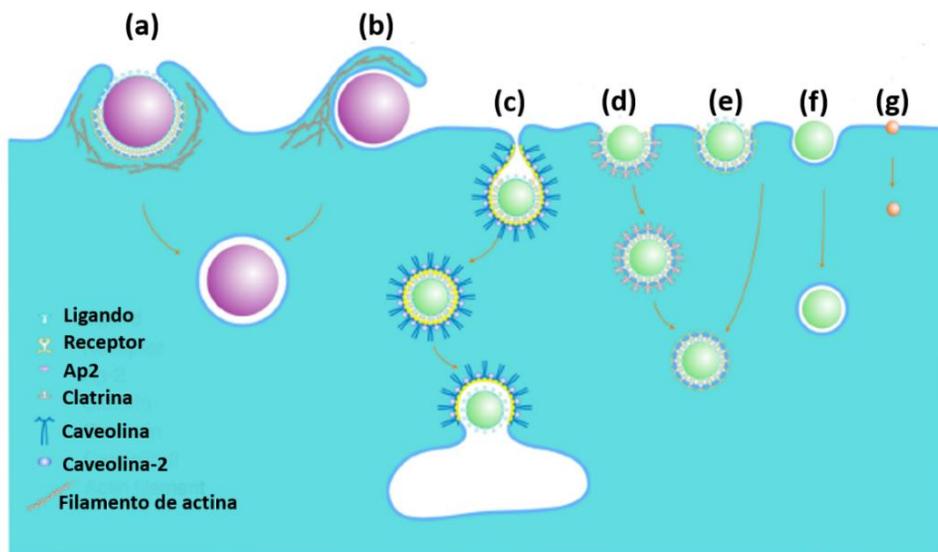
El entendimiento de los factores que intervienen en los procesos de envoltura e internalización de NMs en las células mediados por diferentes receptores y biomoléculas, son importantes no solo desde el punto de vista sintético y tecnológico sino también desde el punto de vista toxicológico. Conocer los procesos que condicionan el destino de las nanopartículas una vez internalizadas, permite crear perfiles toxicológicos y elucidar los efectos en la actividad biológica de los nanocoloides transportados dentro de las células.<sup>5</sup>

Las NPs envían diferentes respuestas celulares dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas, concentraciones intracelulares, duración del contacto, distribuciones subcelulares e interacciones con moléculas biológicas.<sup>4</sup> Las vías endocíticas comunes por las cuales las partículas pueden ingresar a las células, se resumen en la **Figura I.1.5**. Si bien las partículas de tamaños micrométricos entran a la célula por fagocitosis o macropinocitosis, estas operan también en casos donde los NMs se agregan o coalescen y adquieren tamaños mayores. La fagocitosis dirige la formación de protrusiones de membrana en forma de copa que gradualmente rodean y encierran a las partículas (**I.1.5a**). Mientras que el tamaño y la forma de los fagosomas, son dictados por las partículas tomadas; en los procesos de macropinocitosis regulados por actina, la formación de los macropinosomas transcurre por medio de la envoltura de grandes cantidades de fluido extracelular y partículas en la membrana plasmática, dando lugar a estructuras con tamaños diferentes (**I.1.5b**). Los materiales de tamaños nanométricos son endocitados por mecanismos de endocitosis mediada por receptores como clatrina y caveolina.

En la endocitosis mediada por clatrina (**I.1.5d**), la unión entre el agente externo (en este caso, los NMs) y los receptores de membrana gatillan la señal de reclutamiento mediada por *adaptinas*, y la posterior formación de hoyos recubiertos de clatrina en el lado citosólico de la membrana plasmática. Estos hoyos se autoensamblan en estructuras poligonales cerradas que, mediante la acción cooperativa de otras proteínas (ej.: *dinamina*) forman las vesículas que serán endocitadas. Por otra parte, la endocitosis dependiente de caveolina (**I.1.5c**) involucra el ensamblaje en coberturas de caveolina en forma de horquilla en el lado citosólico de la membrana plasmática. En este caso, el mecanismo está mediado por proteínas *GTPasas* (ej.: *ARF*), que se encargan del reclutamiento de subunidades coatómeros, permitiendo la formación estable de la vesícula transportadora.

Tanto los procesos de endocitosis mediados por clatrina como por caveolina involucran, cascadas de señalización bioquímica complejas. Sin embargo, pueden existir procesos que no requieran estas fuerzas conductoras; tales son los casos de procesos mediados por uniones del tipo ligando-receptor (**I.1.5e**), interacciones no específicas en NPs sin ligandos conjugados (**I.1.5f**), y difusión simple a través de la bicapa lipídica en el caso de nanopartículas y moléculas con diámetros muy pequeños y del orden de ~1-5 nm (**I.1.5g**).<sup>21</sup>

El rápido avance de la nanobiotecnología ha permitido el desarrollo de nuevos métodos de síntesis de nanopartículas con diferentes materiales y funcionalizaciones, impartiendo un alto control en la uniformidad de tamaños y formas. Muchas de estas NPs han manifestado un gran potencial para gran cantidad de aplicaciones biomédicas incluyendo diagnóstico *in vitro/in vivo*,<sup>38</sup> seguimiento celular (“*cell tracking*”),<sup>39</sup> imagen molecular,<sup>40</sup> y transporte y liberación de fármacos y genes.<sup>41</sup>

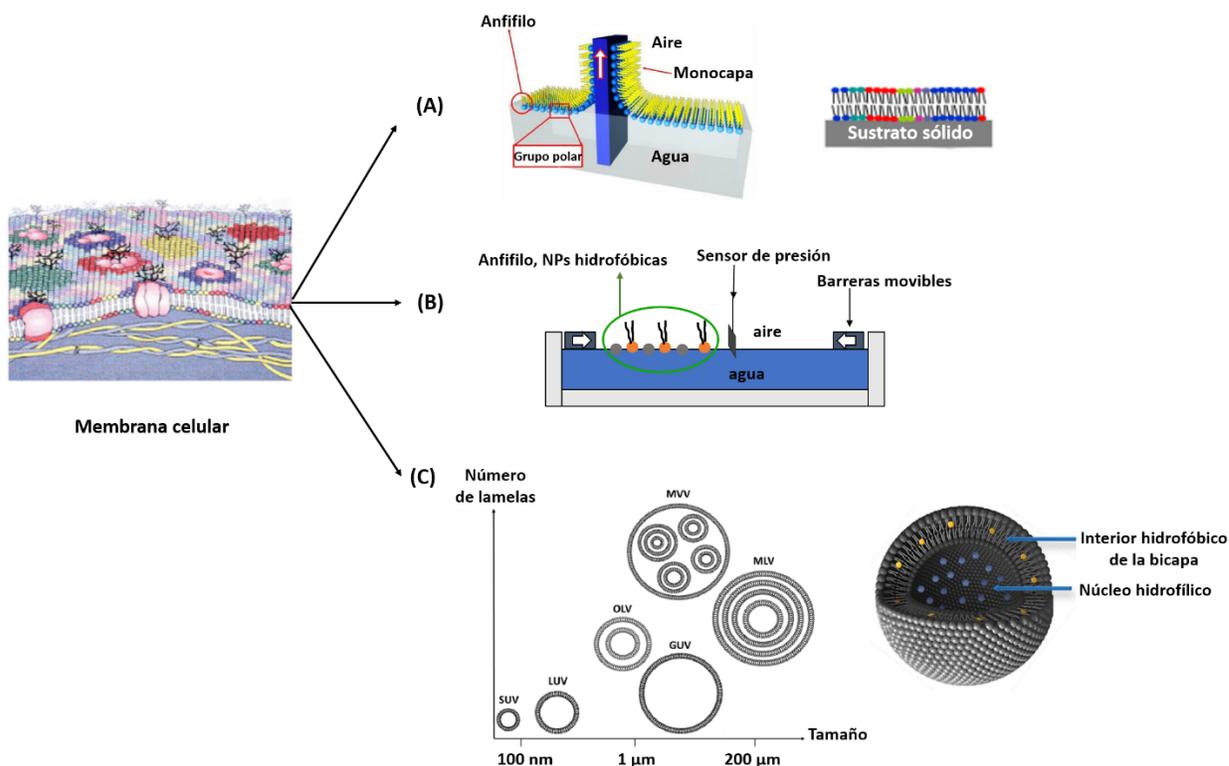


**Figura I.1.5.** Rutas posibles para la internalización de las nanopartículas en membranas celulares. El destino más probable estará determinado por multiplicidad de factores, incluyendo las características fisicoquímicas del nanomaterial, las propiedades del medio de suspensión y las interacciones en la nanobiointerfase, entre otras. Esquema adaptado de Zhang, S.; Gao, H.; Bao, G. Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis. *ACS Nano* **2015**, 9 (9), 8655–8671.

### I.3- Modelos de biomembranas para el estudio de la interacción con nanopartículas

La intrincada estructura dinámica de las membranas celulares, junto con la gran variedad de interacciones y fuerzas intervinientes entre ellas y las nanopartículas, genera la necesidad inmediata de contar con sistemas artificiales que permitan realizar un estudio eficiente de los procesos biofísicos (termodinámicos y morfológicos) que transcurren durante dicha interacción. Para ello, los modelos de biomembranas constituyen sistemas simplificados que imitan las membranas lipídicas en los cuales, dependiendo del modelo, muchos de los parámetros físicos y químicos pueden ser controlados.<sup>42</sup> Los diferentes modelos de membrana existentes resultan útiles en proveer información complementaria a ensayos *in vitro* e *in vivo*, permitiendo una caracterización sistemática de las transformaciones de la membrana como resultado de la incorporación de las NPs y la visualización de la interacción entre ambas entidades. Tanto la composición como las condiciones fisiológicas y ambientales de estos modelos experimentales,

pueden alterarse en las proporciones deseadas, a los fines de simular las condiciones biológicas que pueden encontrarse en determinados compartimentos.<sup>43</sup> A continuación, se describen brevemente algunos de los modelos de membranas usadas para el estudio de la interacción NP-bicapa lipídica (**Figura I.1.6**), algunos de los cuales han sido empleados a lo largo del desarrollo de esta tesis y cuyas particularidades en el sistema bajo estudio, han sido descriptas para cada caso correspondiente.



**Figura I.1.6.** Ilustración esquemática de la membrana celular y los diferentes sistemas modelos de biomembrana. La descripción de la membrana celular muestra la asimetría de la membrana lipídica, los microdominios enriquecidos en lípidos particulares y aquellos inducidos por proteínas de membrana. Los diferentes modelos de membrana imitan los arreglos lipídicos de las membranas celulares. **A-** Monocapas y bicapas soportadas sobre soportes sólidos (metodología de Langmuir-Blodgett). **B-** Monocapas lipídicas autoensambladas con una balanza de Langmuir. **C-** Vesículas lipídicas o liposomas de diferentes tamaños y número de lamelas. Adaptado de Peetla, C., Stine, A. Labhasetwar, V. Biophysical Interactions with Model Lipid Membranes: Applications in Drug Discovery and Drug Delivery. *Mol. Pharm.* **2009**, 6 (5), 1264–1276.

### I.3.1- Liposomas

Los liposomas son vesículas lipídicas delimitadas por una bicapa de lípidos cerrada, que se arregla de manera concéntrica y encierra un interior acuoso (**I.1.6C**). Esta organización estructural particular que ofrece ambientes hidrofílicos (interior acuoso) e hidrofóbicos (espacio interior de la bicapa), así como su naturaleza biocompatible, biodegradable y no-inmunogénica, hace de los liposomas una de las piedras angulares de la nanobiotecnología.<sup>44</sup> Dentro de las configuraciones generales, las vesículas pueden estar constituidas por una (vesícula unilamelar) o múltiples bicapas (vesícula multilamelar). Asimismo, las vesículas unilamelares pueden contar con diferentes tamaños, esta clasificación las subdivide en pequeñas (20-50 nm), grandes (50-100 nm), o gigantes (10-100  $\mu\text{m}$ ), denominadas SUVs, LUVs, y GUVs, respectivamente. Típicamente, SUVs y LUVs son preparadas por disolución de sus lípidos o mezclas de lípidos constituyentes en un solvente orgánico, que es luego evaporado bajo vacío, formando un film lipídico en las paredes del tubo o vial que se emplee para tal fin. Este film es rehidratado en el buffer deseado dando lugar a vesículas multilamelares (MLV). Posteriormente la mezcla es sometida a ciclos de frío/calor o ultrasonificación, y un método de extrusión subsecuente por filtros de tamaño de poro definido, da lugar a las vesículas unilamelares correspondientes. Por otro lado, las GUVs son obtenidas por el método de electroformación, mediante la acción de un campo eléctrico oscilante. Usualmente un generador de ondas estándar aplica una frecuencia de 1 V a 10 Hz entre electrodos sobre los cuales un film lipídico delgado ha sido secado en presencia de agua o buffer para la formación de las GUVs.<sup>45</sup>

Los liposomas son estructural y funcionalmente, los ensamblajes supramoleculares más versátiles que se conocen, y poseen propiedades ventajosas que los han posicionado como estructuras bien establecidas en un sinnúmero de aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética, alimenticia, en ciencias analíticas como amplificadores de señales, etc.<sup>46</sup> En resumen, la versatilidad que poseen estas estructuras les ha conferido sin duda alguna, un lugar de privilegio en el desarrollo del campo de la nanobiotecnología.<sup>47</sup> A modo de contenedores lipídicos, estas vesículas se desempeñan eficientemente como transportadores de drogas o diferentes biomoléculas (ADN, péptidos) en terapias biomédicas que requieren medios biocompatibles, estables y con una alta capacidad de captación celular.<sup>48</sup> Además, las diferentes modificaciones o funcionalidades que pueden ser impartidas a estas estructuras a través de la incorporación de distintos nanomateriales

en su diseño (Ej. Magnetoliposomas) les confieren a las vesículas lipídicas, una alta capacidad en el direccionamiento o *targeting* de estos principios activos hacia el sitio de acción.<sup>49</sup> En combinación con la micro-fluídica y ciencia de los surfactantes, vesículas unilamelares de diferentes tamaños son generadas en los diferentes canales y pueden ser utilizadas para el transporte de materiales bioactivos a diferentes ambientes.<sup>50</sup> La necesidad de contar con métodos de síntesis más simples y menos nocivos para el medioambiente, ha dado lugar también, a la incursión de los sistemas vesiculares como nano-reactores para la fabricación de NPs con tamaño y forma controlada.<sup>51</sup>

Una de las cuestiones más interesantes de este modelo de membranas es su capacidad para desempeñar un rol dual tanto como sistema transportador en aplicaciones tecnológicas, como para el estudio de sus propiedades biofísicas a nivel termodinámico y morfológico. En este último aspecto, las nano-vesículas se han utilizado como vehículos para transferir materiales hacia otro compartimento vesicular cerrado, por medio del proceso de fusión de membranas. Como se verá en el **capítulo IV** del presente trabajo de tesis, este proceso en particular, está condicionado y dirigido por multiplicidad de factores a lo largo de todo su mecanismo, tales como la temperatura y pH del medio, defectos, curvatura, composición y permeabilidad de las membranas, entre otros. Bajo el diseño experimental que presenta el modelo de vesículas lipídicas, no solo es posible ejercer un control total sobre la composición y las características del medio, sino que también las técnicas disponibles para el estudio y visualización de los cambios en las propiedades de membrana permiten adquirir información completa sobre los cambios morfológicos y fisicoquímicos que suceden. Numerosas técnicas de microscopía como la microscopía de transmisión electrónica (TEM) y microscopía de escaneo electrónico (SEM), técnicas de fluorescencia (FRAP, de sus siglas recuperación de la fluorescencia luego del fotoblanqueo) y adquisición de tamaños (dispersión dinámica de luz, DLS), permiten acceder a esta información. Gradientes de difusión y cambios en la permeabilidad de las membranas pueden ser igualmente determinadas por ensayos de liberación de contenido interno y potencial Z. Si bien se han implementado técnicas para la determinación de cambios en la estructura de fases y propiedades reológicas de las membranas en vesículas lipídicas (Ej.: resonancia magnética nuclear de fósforo, <sup>31</sup>P-NMR), información de esta naturaleza es adquirida con mayor precisión por medio de diseños experimentales en monocapas de Langmuir o bicapas soportadas.<sup>42,43</sup>

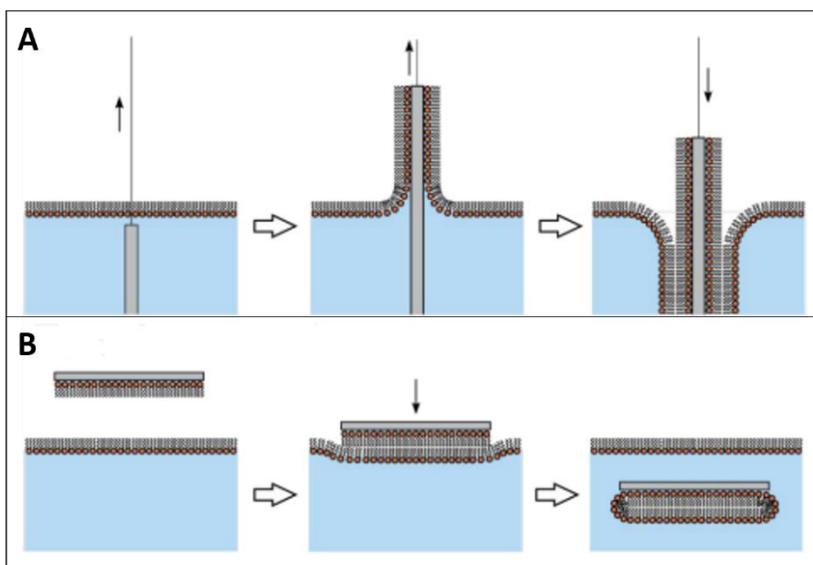
### I.3.2- Bicapas lipídicas soportadas (SLB)

Probablemente este sistema sea más adecuado definirlo como *estructuras lipídicas soportadas*; dado que esta técnica hace alusión a los sistemas planares (monocapa o multicapa) formados sobre una superficie sólida, los cuales generalmente comprenden bicapas lipídicas sobre un sustrato sólido de naturaleza variada. La naturaleza de los soportes sólidos depende fundamentalmente de los métodos analíticos que se deseen usar: SPR (resonancia del plasmón superficial) requiere una capa delgada de un metal noble (oro, plata), técnicas ópticas requieren de superficies transparentes (sílica, cuarzo, vidrio) y AFM (microscopía de fuerza atómica) necesita de superficies “atómicamente planas” (mica, silicio, oro plano). El modelo de membranas de SLBs es usualmente implementado para estudiar la unión NP-membrana dado que algunos métodos sensibles a las superficies como los mencionados, pueden aportar información asociada a esta interacción. Cambios en la estructura, morfología y química de superficie de las SBLs luego de la interacción con drogas, sistemas transportadores, NPs, etc., pueden ser investigadas por difracción de rayos X (XRD), SEM, AFM, TEM, espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS), entre otras.<sup>42,52,53</sup>

Las SLBs pueden formarse por diferentes metodologías, como lo son Langmuir-Blodgett (LB) o Langmuir-Schaefer (LS), o incluso también por fusión (*spreading*) de vesículas lipídicas.<sup>42</sup> LB y LS son particularmente interesantes por la formación asimétrica de las SLBs a la que dan lugar.<sup>54</sup> La fusión de vesículas en un soporte sólido es un procedimiento más simple para preparar este tipo de modelos de membrana.<sup>55</sup>

De manera general, en la técnica de LB, el sustrato es sumergido en la subfase previo a la formación de una monocapa de Langmuir en la interfase agua-aire de una balanza de Langmuir (dependiendo el tipo de deposición requerida, este proceso puede invertirse); la monocapa de Langmuir es luego transferida al sustrato sólido por medio de la elevación vertical del sustrato a través de la monocapa, a una presión lateral definida. En la técnica de LS, un sustrato hidrofóbico es posicionado de manera horizontal a la subfase; la monocapa es luego transferida sobre el sustrato hidrofóbico por medio del contacto directo del sustrato con la monocapa de Langmuir durante un período de tiempo determinado (30-60 s). La cantidad de capas que se depositen sobre el sustrato dependerán del número de ciclos de deposición que sean efectuados en cada una de estas técnicas. A modo de ejemplo, en la técnica de transferencia de LB dará lugar a la deposición de una monocapa molecular, luego de efectuar una única elevación del sustrato a través del film

de Langmuir. Por el contrario, un ciclo de elevación-descenso del sustrato a través de la monocapa en la interfase, permitirá la deposición de una bicapa lipídica sobre dicho sustrato. En metodologías de transferencia combinadas, la primera capa es transferida por la metodología de LB, y la segunda por LS.<sup>43</sup> En la **Figura I.1.7** se describen algunos de los procedimientos experimentales empleados para la obtención de bicapas soportadas por medio las técnicas de LB y LS.<sup>54</sup>



**Figura I.1.7-** **A-** Deposición esquemática de una bicapa sólida soportada por el método de Langmuir-Blodgett (LB). (Izquierda) Luego de la inmersión del sustrato, el lípido es depositado sobre la interfase aire-agua y comprimido hacia la presión superficial deseada. (Centro) El sustrato es luego elevado verticalmente hacia la interfase aire-agua para la deposición de la capa interna. (Derecha) Para la deposición de una segunda capa (externa), el sustrato es sumergido nuevamente a través de la interfase. **B-** Método de Langmuir-Schaefer (LS) para la deposición horizontal de la capa externa, sobre una monocapa interna previamente soportada sobre el sustrato sólido. Adaptado de Kurniawan, J.; Ventrici De Souza, J. F.; Dang, A. T.; Liu, G. Y.; Kuhl, T. L. Preparation and Characterization of Solid-Supported Lipid Bilayers Formed by Langmuir-Blodgett Deposition: A Tutorial. *Langmuir* **2018**, *34* (51), 15622–15639.

Numerosos modelos de membranas biomiméticas han sido desarrollados usando soportes sólidos con el fin de imitar la estructura de la membrana celular. Varios films poliméricos han sido empleados como “colchones” (*cushions*) para SLBs, como por ejemplo polietilenglicol (PEG),

celulosa y dextrano. Estos polímeros actúan como espaciadores y lubricantes entre la bicapa lipídica y el sustrato, asistiendo la auto-recuperación de defectos de membrana locales.<sup>56</sup> También se incluyen dentro de los modelos biomiméticos, membranas lipídicas de bicapas híbridas y membranas lipídicas de bicapas unidas covalentemente o "*tethered bilayers*".<sup>57</sup>

### I.3.3- Monocapas de Langmuir

Los films monomoleculares o monocapas de Langmuir, constituyen una de las plataformas más poderosas empleadas en el estudio de interfases fluidas dada la vasta información detallada a la que es posible acceder respecto de la biofísica de biomembranas y las interacciones intermoleculares en la interfase. Las características únicas de esta técnica se basan en tres aspectos principales: a) control preciso del área disponible por molécula en la interfase líquido/aire, b) una gran variedad de técnicas disponibles para la caracterización de los arreglos moleculares en la interfase, y c) simplicidad del modelo físico.<sup>58,59</sup>

Básicamente, este sistema está compuesto por una monocapa de una dada molécula o mezclas de moléculas con actividad de superficie en la interfase líquido/aire. El procedimiento experimental usual para la formación de monocapas de Langmuir, es muy simple. Empleando una balanza de Langmuir, moléculas anfifílicas son depositadas sobre una superficie líquida mediante el cuidadoso sembrado (dispersión) de una cantidad definida de una solución de las moléculas tensoactivas, disueltas en un solvente orgánico. Luego de la evaporación del solvente orgánico (en escalas de tiempo del orden de minutos), las cabezas polares de las moléculas de surfactante permanecen en contacto con la subfase líquida, mientras que las cadenas hidrocarbonadas se orientan hacia el aire. Las monocapas de Langmuir son luego comprimidas por medio de barreras móviles. Los cambios en la tensión superficial que se producen en la interfase líquido/aire, son monitoreados por una microbalanza que posee una placa de Wilhelmy. Debido a que se conoce el número de moléculas depositadas en la interfase y se cuenta con un registro preciso del área y la presión correspondiente, es posible obtener una *isoterma de Langmuir*. En la isoterma de Langmuir se correlaciona la presión superficial (mN/m) en función del área molecular promedio

(Å<sup>2</sup>/partícula). Este estudio permite deducir información relevante sobre el comportamiento termodinámico y reológico de los films en la interfase.<sup>60</sup>

Alternativamente, también es posible realizar experimentos para el estudio de la penetración de determinados anfifilos en la membrana lipídica. En ellos, la monocapa lipídica es normalmente comprimida hasta una presión superficial de 30 mN/m. A esta presión se postula que la densidad de empaquetamiento lipídico es similar a la que se encuentra presente en las membranas celulares.<sup>61</sup> Sucesivamente, manteniendo constante el área del film lipídico, es posible registrar cambios en la presión superficial luego de la incorporación de moléculas bajo estudio (drogas, NPs, etc.) en el interior de la subfase.<sup>43,61</sup>

También, empleando Microscopía de Ángulo de Brewster (BAM), es posible conocer y estudiar la topografía de los anfifilos en la interfase. Este método permite el estudio *in situ* de monocapas de Langmuir en la interfase fluida. La técnica en cuestión no requiere de sondas o la introducción de cualquier modificación a la muestra, por lo que uno puede asegurarse que la monocapa bajo investigación, se encuentra en su estado original.<sup>62</sup>

Sistemáticamente, la balanza de Langmuir puede acoplarse a otros métodos complementarios como espectroscopía vibracional de generación de frecuencias aditivas (SFG), espectroscopía infrarroja de reflexión- absorción (IRRAS), difracción de rayos X de ángulo rasante (GIXD), y fluorescencia de rayos X de reflexión total, entre otras. La combinación de estos diferentes métodos permite realizar un extenso estudio mecanístico sobre las interacciones entre NPs y lípidos de membrana.<sup>42,63</sup>

## I.4- PERSPECTIVAS

El constante avance de la nanotecnología aplicada a la investigación, el diseño y la fabricación de nuevos dispositivos biomédicos, ha permitido el desarrollo conjunto de una pléthora de metodologías para la síntesis de los nanomateriales y el estudio de las interacciones entre ellos, y los diferentes sistemas biológicos a los cuales son o serán expuestos. Conocer e interpretar racionalmente las distintas fuerzas que intervienen en la regulación del comportamiento de los sistemas biológicos frente a las nanopartículas, contribuirá de manera sistemática al diseño de nuevas estrategias para la fabricación de estas plataformas (NPs) tanto en términos de sus propias características fisicoquímicas, como en relación a su desempeño en la nanobiointerfase. Resulta importante señalar también, que el diseño controlado de las nanopartículas, no debe ser solo enfocado desde un punto de vista tecnológico, es decir, en pro de su aplicación biomédica final; sino también teniendo en cuenta los aspectos toxicológicos y ambientales en igual medida.

Los estudios de interacción biofísica por medio de diferentes modelos de biomembranas, proveen una metodología de investigación simple y efectiva para el entendimiento del comportamiento de los lípidos de bicapa (principales constituyentes y mediadores de los procesos de membrana) y las nanopartículas (entre muchos sistemas de interés), en la nanobiointerfase y frente a barreras biológicas de naturaleza diversa. La versatilidad con la que cuentan los sistemas modelos de biomembranas permiten principalmente, variar la composición de la cual se constituyen los lípidos de membrana y las condiciones fisiológicas y ambientales a las cuales se llevará a cabo la medición de la interacción en presencia de los nanomateriales diseñados. Complementariamente, la gran cantidad de técnicas analíticas y de microscopía que es posible acoplar a cada uno de los modelos experimentales de biomembrana, permiten realizar una caracterización cuali- y cuantitativa completa y precisa, acerca de los procesos termodinámicos y morfológicos que tienen lugar durante la interacción NP-membrana.

## I.5- OBJETIVOS GENERALES

La presente tesis doctoral se centra en conocer las bases biofísicoquímicas de la interacción entre nanopartículas y biointerfases, con el fin de optimizar las propiedades y aplicaciones de las NPs para el desarrollo de sistemas con potencial aplicación en las ciencias biomédicas y la nanobiotecnología.

Para ello, se combinan aportes interdisciplinarios de metodologías de síntesis orgánica, química supramolecular, biofísicoquímica, fisicoquímica y nanociencias. Por medio del empleo de diferentes modelos de membrana, se estudia la interacción nanopartículas/biointerfases frente a diferentes estímulos externos y se llevará a cabo una caracterización completa de esta interacción con metodologías específicas para cada sistema de nanopartícula diseñado.

## I.6- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

El desarrollo de esta tesis abarca tres objetivos específicos cuyo contenido se aborda en los siguientes capítulos. Estos objetivos han sido establecidos de la siguiente manera:

- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de plata y nanopartículas magnéticas funcionalizadas con ácido oleico.
- Estudiar la interacción de nanopartículas de plata funcionalizadas con ácido oleico (AgNP-OA) con films de Langmuir como modelos de biomembranas y evaluar el desempeño de estas nanopartículas como plataforma de acción biocida.
- Evaluar la actividad fusogénica de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con ácido oleico (MNP-OA) en dispersiones coloidales de liposomas y la regulación del proceso de fusión mediante campos magnéticos de intensidad variable.

## I.6- REFERENCIAS

- (1) Hornyak, G. L., Moore, J. J., Tibbals, H. F., Dutta, J. *Fundamentals of Nanotechnology*; CRC Press: Washington, USA, **2009**.
- (2) Muhammad, Q. Recent Revolutions in Nanoscience and Nanotechnology with Its Applications. *Adv Nanosci Nanotec* **2019**, 3 (3), 1–6.
- (3) Sutariya, V. B.; Pathak, Y. *Biointeractions of Nanomaterials*; CRC Press, **2014**.
- (4) Zhao, J.; Stenzel, M. H. Entry of Nanoparticles into Cells: The Importance of Nanoparticle Properties. *Polym. Chem.* **2018**, 9 (3), 259–272.
- (5) Canton, I., Battaglia, G. Endocytosis at the Nanoscale. **2011**, 41, 2718–2739.
- (6) Singh, P.; Pandit, S.; Mokkalapati, V. R. S. S.; Garg, A.; Ravikumar, V.; Mijakovic, I. Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, 19 (7), 1–16.
- (7) Prasad, M.; Lambe, U. P.; Brar, B.; Shah, I.; Manimegalai, J.; Ranjan, K.; Rao, R.; Kumar, S.; Mahant, S.; Kumar, S.; et al. Nanotherapeutics : An Insight into Healthcare and Multi-Dimensional Applications in Medical Sector of the Modern World. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, 97, 1521–1537.
- (8) Jeevanandam, J.; Barhoum, A.; Chan, Y. S.; Dufresne, A.; Danquah, M. K. Review on Nanoparticles and Nanostructured Materials: History, Sources, Toxicity and Regulations. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2018**, 9 (1), 1050–1074.
- (9) Amreddy, N.; Babu, A.; Muralidharan, R.; Srivastava, A.; Ahmed, R.; Mehta, M.; Ramesh, R. Recent Advances in Nanoparticle-Based Cancer Drug and Gene Delivery. *Adv Cancer Res.* **2018**, 137, 115–170.
- (10) Fukumori, Y.; Takeuchi, H.; Ando, Y. Structural Control of Nanoparticles. In *Nanoparticle Technology Handbook*; Hosokawa, M., Naito, M., Nogi, K. Yokoyama, T., Ed.; Elsevier: Osaka, Japan, **2018**; pp 49–107.
- (11) StatNano. Statistics in nano-based science, technology, and industry <https://statnano.com/>.

- (12) BBC. Market Research Reports. <https://www.bccresearch.com/market-research/nanotechnology>.
- (13) Caruso, F.; Hyeon, T.; Rotello, V. The Unique Role of Nanoparticles in Nanomedicine: Imaging, Drug Delivery and Therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2885–2911.
- (14) Christian, P.; Von Der Kammer, F.; Baalousha, M.; Hofmann, T. Nanoparticles: Structure, Properties, Preparation and Behaviour in Environmental Media. *Ecotoxicology* **2008**, *17* (5), 326–343.
- (15) Baptista, P. V.; McCusker, M. P.; Carvalho, A.; Ferreira, D. A.; Mohan, N. M.; Martins, M.; Fernandes, A. R. Nano-Strategies to Fight Multidrug Resistant Bacteria-"A Battle of the Titans". *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–26.
- (16) Mout, R.; Moyano, D. F.; Rana, S.; Rotello, V. M. Surface Functionalization of Nanoparticles for Nanomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2539–2544.
- (17) Boal, A. K.; Rotello, V. M. Fabrication and Self-Optimization of Multivalent Receptors on Nanoparticle Scaffolds. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (4), 734–735.
- (18) Jones, M. R.; Osberg, K. D.; MacFarlane, R. J.; Langille, M. R.; Mirkin, C. A. Templated Techniques for the Synthesis and Assembly of Plasmonic Nanostructures. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (6), 3736–3827.
- (19) Slavin, Y. N.; Asnis, J.; Häfeli, U. O.; Bach, H. Metal Nanoparticles: Understanding the Mechanisms behind Antibacterial Activity. *J. Nanobiotechnology* **2017**, *15* (1), 1–20.
- (20) Cheon, J. Y.; Kim, S. J.; Rhee, Y. H.; Kwon, O. H.; Park, W. H. Shape-Dependent Antimicrobial Activities of Silver Nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **2019**, *14*, 2773–2780.
- (21) Zhang, S.; Gao, H.; Bao, G. Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis. *ACS Nano* **2015**, *9* (9), 8655–8671.
- (22) Tripathy, A.; Sen, P.; Su, B.; Briscoe, W. H. Natural and Bioinspired Nanostructured Bactericidal Surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2017**, *248*, 85–104.
- (23) Burduşel, A.; Gherasim, O.; Grumezescu, A. M.; Mogoantă, L.; Ficai, A.; Andronescu, E.

- Biomedical Applications of Silver Nanoparticles: An Up-to-Date Overview. *Nanomaterials* **2018**, 8 (681), 1–26.
- (24) Fasciani, C.; Silvero, M. J.; Anghel, M. A.; Argüello, G. A.; Becerra, M. C.; Scaiano, J. C. Aspartame-Stabilized Gold-Silver Bimetallic Biocompatible Nanostructures with Plasmonic Photothermal Properties, Antibacterial Activity, and Long-Term Stability. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136 (50), 17394–17397.
- (25) Lee, N.; Yoo, D.; Ling, D.; Cho, M. H.; Hyeon, T.; Cheon, J. Iron Oxide Based Nanoparticles for Multimodal Imaging and Magnetoresponse Therapy. *Chem. Rev.* **2015**, 115 (19), 10637–10689.
- (26) Arami, H.; Khandhar, A.; Liggitt, D.; Krishnan, K. M. In Vivo Delivery, Pharmacokinetics, Biodistribution and Toxicity of Iron Oxide Nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 8576–8607.
- (27) IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed.; McNaught, A.D., Wilkinson, A., Ed.; Blackwell Scientific Publications: Oxford, **2014**.
- (28) Rodríguez-Abreu, C. Nanocolloids: Some Basic Concepts and Principles of Their Stabilization. *Nanocolloids: A Meeting Point for Scientists and Technologists*; Elsevier Inc. Braga, Portugal, **2016**; pp 1–36.
- (29) Adaira, J. H., Suvacib, E., Sindela, J. Encyclopedia of Materials: Science and Technology. *Surface and Colloid Chemistry*; Elsevier Ltd., **2001**; pp 1–10.
- (30) Min, Y.; Akbulut, M.; Kristiansen, K.; Golan, Y.; Israelachvili, J. The Role of Interparticle and External Forces in Nanoparticle Assembly. *Nanosci. Technol. A Collect. Rev. from Nat. Journals* **2009**, 38–49.
- (31) Nel, A. E.; Mädler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M. V; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M. Understanding Biophysicochemical Interactions at the Nano-Bio Interface. *Nat. Mater.* **2009**, 8 (7), 543–557.
- (32) Kirkpatrick, C. J.; Bonfield, W. NanoBioInterface: A Multidisciplinary Challenge. *J. R. Soc. Interface* **2010**, 7, S1–S4.

- (33) Nel, Andre; Tian, Xia; Lutz, Madler; Ning, L. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science*. **2006**, *311* (5761), 622–627.
- (34) Kharazian, B.; Hadipour, N. L.; Ejtehadi, M. R. Understanding the Nanoparticle-Protein Corona Complexes Using Computational and Experimental Methods. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2016**, *75*, 162–174.
- (35) Decuzzi, P.; Ferrari, M. The Role of Specific and Non-Specific Interactions in Receptor-Mediated Endocytosis of Nanoparticles. *Biomaterials* **2007**, *28* (18), 2915–2922.
- (36) Gao, H.; Shi, W.; Freund, L. B. Mechanics of Receptor-Mediated Endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (27), 9469–9474.
- (37) Santiago, R.; Reigada, R. Interaction Modes between Nanosized Graphene Flakes and Liposomes: Adsorption, Insertion and Membrane Fusion. *BBA- Gen. Subj.* **2019**, *1863* (4), 723–731.
- (38) Josephson, L.; Manuel Perez, J.; Weissleder, R. Magnetic Nanosensors for the Detection of Oligonucleotide Sequences. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2001**, *40* (17), 3204–3206.
- (39) Lewin, M.; Carlesso, N.; Tung, C. H.; Tang, X. W.; Cory, D.; Scadden, D. T.; Weissleder, R. Tat Peptide-Derivatized Magnetic Nanoparticles Allow in Vivo Tracking and Recovery of Progenitor Cells. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18* (4), 410–414.
- (40) Schellenberger, E. Bioresponsive Nanosensors in Medical Imaging. *J. R. Soc. Interface* **2010**, *7*, 83–91.
- (41) Alexiou, C.; Arnold, W.; Klein, R. J.; Parak, F. G.; Hulin, P.; Bergemann, C.; Erhardt, W.; Wagenpfeil, S.; Lubbe, A. S. Locoregional Cancer Treatment with Magnetic Drug Targeting. *Cancer Res.* **2000**, *60* (23), 6641–6648.
- (42) Rascol, E., Devoisselle, J-M., Chopineau, J. The Relevance of Membrane Models to Understand Nanoparticles-cell Membrane Interactions. *Nanoscale* **2016**, *8* (23), 4780–4798.
- (43) Peetla, C., Stine, A. Labhasetwar, V. Biophysical Interactions with Model Lipid Membranes: Applications in Drug Discovery and Drug Delivery. *Mol. Pharm.* **2009**, *6* (5),

1264–1276.

- (44) Pabst, G.; Kučerka, N.; Nieh, M.-P.; Katsaras, J. *Liposomes, Lipid Bilayers and Model Membranes: From Basic Research to Application*, 1st ed.; Pabst, G., Kučerka, N., Nieh, M., Katsaras, J., Ed.; CRC Press, **2016**.
- (45) Laouini, A.; Jaafar-Maalej, C.; Limayem-Blouza, I.; Sfar, S.; Charcosset, C.; Fessi, H. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *J. Colloid Sci. Biotechnol.* **2012**, *1* (2), 147–168.
- (46) Lasic, D. D. Novel Applications of Liposomes. *Trends Biotechnol.* **1998**, *16* (7), 307–321.
- (47) Mashaghi, S.; Jadidi, T.; Koenderink, G.; Mashaghi, A. Lipid Nanotechnology. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14* (2), 4242–4282.
- (48) Tabatt, K.; Kneuer, C.; Sameti, M.; Olbrich, C.; Müller, R. H.; Lehr, C. M.; Bakowsky, U. Transfection with Different Colloidal Systems: Comparison of Solid Lipid Nanoparticles and Liposomes. *J. Control. Release* **2004**, *97* (2), 321–332.
- (49) Monnier, C. A.; Burnand, D.; Rothen-Rutishauser, B.; Lattuada, M.; Petri-Fink, A. Magnetoliposomes: Opportunities and Challenges. *Eur. J. Nanomedicine* **2014**, *6* (4), 201–215.
- (50) Persson, F.; Fritzsche, J.; Mir, K. U.; Modesti, M.; Westerlund, F.; Tegenfeldt, J. O. Lipid-Based Passivation in Nanofluidics. *Nano Lett.* **2012**, *12* (5), 2260–2265.
- (51) Genç, R.; Clergeaud, G.; Ortiz, M.; O'sullivan, C. K. Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using Glycerol-Incorporated Nanosized Liposomes. *Langmuir* **2011**, *27* (17), 10894–10900.
- (52) Sackmann, E. Supported Membranes: Scientific and Practical Applications. *Science*. **1996**, *271*, 43–48.
- (53) El Kirat, K.; Morandat, S.; Dufrière, Y. F. Nanoscale Analysis of Supported Lipid Bilayers Using Atomic Force Microscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1798* (4), 750–765.
- (54) Kurniawan, J.; Ventrici De Souza, J. F.; Dang, A. T.; Liu, G. Y.; Kuhl, T. L. Preparation and Characterization of Solid-Supported Lipid Bilayers Formed by Langmuir-Blodgett

- Deposition: A Tutorial. *Langmuir* **2018**, *34* (51), 15622–15639.
- (55) Kim, H. K.; Kim, K.; Byun, Y. Preparation of a Chemically Anchored Phospholipid Monolayer on an Acrylated Polymer Substrate. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3435–3444.
- (56) Tanaka, M.; Sackmann, E. Polymer-Supported Membranes as Models of the Cell Surface. *Nature* **2005**, *437* (7059), 656–663.
- (57) Rebaud, S.; Maniti, O.; Girard-Egrot, A. P. Tethered Bilayer Lipid Membranes (TBLMs): Interest and Applications for Biological Membrane Investigations. *Biochimie* **2014**, *107* (Part A), 135–142.
- (58) Brown, R. E. & Brockman, H. L. Using Monomolecular Films to Characterize Lipid Lateral Interactions. *Methods Mol. Biol.* **2007**, *398*, 41–58.
- (59) Giner-Casares, J. J.; Brezesinski, G.; Möhwald, H. Langmuir Monolayers as Unique Physical Models. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2014**, *19* (3), 176–182.
- (60) Caseli, L.; Nobre, T. M.; Ramos, A. P.; Monteiro, D. S.; Zaniquelli, M. E. D. The Role of Langmuir Monolayers to Understand Biological Events. *ACS Symp. Ser.* **2015**, *1215*, 65–88.
- (61) Marsh, D. Lateral Pressure in Membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **1996**, *1286* (3), 183–223.
- (62) Vollhardt, D. Brewster Angle Microscopy: A Preferential Method for Mesoscopic Characterization of Monolayers at the Air/Water Interface. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2014**, *19* (3), 183–197.
- (63) Brezesinski, G.; Möhwald, H. Langmuir Monolayers to Study Interactions at Model Membrane Surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2003**, *100–102*, 563–584.



## **CAPÍTULO II**

### **Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata y nanopartículas magnéticas funcionalizadas con ácido oleico**

#### **RESUMEN**

El presente capítulo abarca un breve marco teórico sobre las técnicas de síntesis y de caracterización empleadas en el diseño de nanopartículas con aplicaciones en las nanobiociencias. Posteriormente, se describen las metodologías sintéticas empleadas en la tesis para la obtención de las nanopartículas de plata y magnéticas funcionalizadas con ácido oleico, AgNP-OA y MNP-OA respectivamente, estudiadas como potenciales plataformas para biomedicina. Adicionalmente, las diversas técnicas empleadas en la caracterización de las nanopartículas sintetizadas, resultaron esenciales a la hora de determinar la naturaleza de los nanomateriales obtenidos, lo cual dictamina sus interacciones con los diferentes modelos de membranas o sistemas transportadores a los cuales fueron enfrentados

## II.1- INTRODUCCIÓN

### II.1.1- Aspectos sintéticos de las nanopartículas de plata (AgNPs) y nanopartículas magnéticas (MNPs) para su empleo en el campo de las biociencias

En la actualidad, los nanomateriales (NMs) se han convertido en un área de investigación activa y un sector tecno-económico en continua expansión en diversos campos de aplicación. Como fue descrito en el capítulo anterior, debido a la versatilidad con la que las propiedades físico-químicas de los NMs (ej. humectabilidad, punto de fusión de la red cristalina, conductividad térmica, actividad catalítica, propiedades ópticas, entre otros) pueden ser modificadas para ejercer una amplia variedad de propósitos, nuevas estrategias para el diseño controlado de estos materiales en torno a rutas sintéticas y métodos para el control del tamaño, forma y estructura, son continuamente investigadas. Dentro de los NMs más explorados y que probablemente puedan ser descritos como pioneros en el campo de la nanotecnología, se encuentran las nanopartículas (NPs). Las NPs con núcleo o “*core*” de diferente composición son y continúan siendo la plataforma más empleada debido a sus propiedades únicas, fácil funcionalización y capacidad de inducir respuestas biológicas eficaces, en comparación con sus análogos de escalas mayores. Esta versatilidad que presentan las NPs sumada a la biocompatibilidad que puede lograrse y que se puede estudiar a través de ensayos *in vitro* e *in vivo*, han permitido su creciente implementación en el campo de las ciencias biomédicas donde las numerosas regulaciones existentes para la síntesis y posterior comercialización de productos con llegada factible a la sociedad, plantean severas barreras que pocos *materiales* de origen no-biológico han sido capaces de superar.<sup>1,2</sup>

A lo largo de estas últimas décadas, un gran interés y substanciales esfuerzos en investigación se han dirigido a la evaluación biomédica y revalorización de nanopartículas metálicas derivadas de metales nobles tales como plata y oro, tal como se mencionó anteriormente, debido a sus propiedades químicas, físicas y biológicas específicas.

En particular, un gran foco de atención se ha situado en la evaluación biomédica de las nanopartículas de plata (AgNPs), las cuales atrajeron la atención mundial en primera instancia, como agentes antimicrobianos no convencionales. Pese a que actualmente aún hay controversia en torno a la toxicidad y el comportamiento biológico *in vivo*, las AgNPs han sido empleadas por

largo tiempo como agentes antimicrobianos en la industria de la salud, cosmética, para el almacenamiento de alimentos, recubrimientos textiles y dentro de algunas aplicaciones ambientales.<sup>3-5</sup> Como se profundizará en el **capítulo III**, estas nanopartículas son capaces de ejercer sus efectos antimicrobianos a través de diversos mecanismos. Las AgNPs pueden inducir muerte celular mediante disrupción directa de la pared celular, inactivación de enzimas de la cadena respiratoria y producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), entre algunas de las vías más informadas. Además, existe gran cantidad de evidencia de que estas nanopartículas son capaces de liberar iones  $\text{Ag}^+$  conocidos por exhibir actividad antimicrobiana al interactuar con proteínas que contienen grupos tiol, debilitando las funciones de biomoléculas esenciales para el metabolismo vital de las bacterias.<sup>6,7</sup>

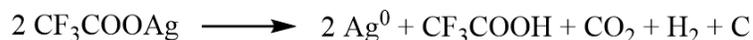
En cuanto a los métodos reportados de obtención de las AgNPs, se han empleado de manera satisfactoria diversas metodologías gracias a la versatilidad intrínseca de los compuestos a base de plata y la plata metálica (**Figura II.1.1**). Métodos físicos de obtención, comprenden el empleo de energías externas (eléctrica y/o térmica, por ejemplo) para la producción de nanopartículas. Dentro de las técnicas físicas más empleada, se ha utilizado la deposición directa de nanopartículas de plata sobre sustratos sólidos, mediante métodos de *spray* de flama líquida (LFS) aplicados directamente sobre los precursores de síntesis inmovilizados en estos soportes.<sup>8</sup> Otros autores han explorado rutas sonoquímicas que involucran el uso de ondas de ultrasonido para promover la formación de nanopartículas de tamaño controlado.<sup>9</sup> Métodos de esta índole han sido extensamente evaluados ya que permiten una alternativa de síntesis de AgNPs mucho más ecológica que los métodos químicos convencionales, los cuales emplean usualmente reactivos y solventes orgánicos para reducir precursores de plata y formar las NPs.

Las metodologías de obtención química, tienen su base en el método desarrollado por Turkevich et. al.<sup>10</sup>, en la cual la síntesis de las nanopartículas se realiza mediante la reducción de una sal de plata en solución acuosa, en presencia de citrato trisódico y borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) como agente reductor. Esta vía representa un método sencillo para lograr la obtención de NPs empleando únicamente agitación en tiempos cortos y utilizando citrato como agente estabilizante.

A pesar de la gran versatilidad que posee la síntesis de nanopartículas llevada a cabo mediante el método de Turkevich (fácil estabilización con surfactantes, biomoléculas de diversa naturaleza, etc.), esta ruta posee una importante desventaja que reside en el hecho de que no es posible obtener nanopartículas con tamaños monodispersos. La heterogeneidad de tamaños usualmente obtenidos

por medio de esta metodología hace necesaria la posterior utilización de diversos procedimientos extensos de purificación y selección de tamaños, con el objetivo de obtener nanopartículas de tamaños uniformes.<sup>11</sup>

A los fines de sortear esta dificultad, diversos autores han planteado la obtención química de las AgNPs a través de rutas de descomposición térmica que permiten obtener estructuras de tamaños monodispersos, evitando el empleo de tiempos de reacción prolongados y, el uso de solventes orgánicos tóxicos y/o condiciones de reacción con altos costos energéticos.<sup>12,13</sup> En esta estrategia sintética, en vez de utilizar la ruta tradicional que involucra el precursor de las sales de plata y el agente reductor en un solvente, se emplea una única fuente precursora en un solvente orgánico de alto punto de ebullición. Para estos fines, el trifluoroacetato de plata (CF<sub>3</sub>COOAg) representa una excelente elección, dado que puede ser fácilmente reducido térmicamente a plata metálica, a diferentes temperaturas (**Esquema II.1.1**).<sup>14</sup>

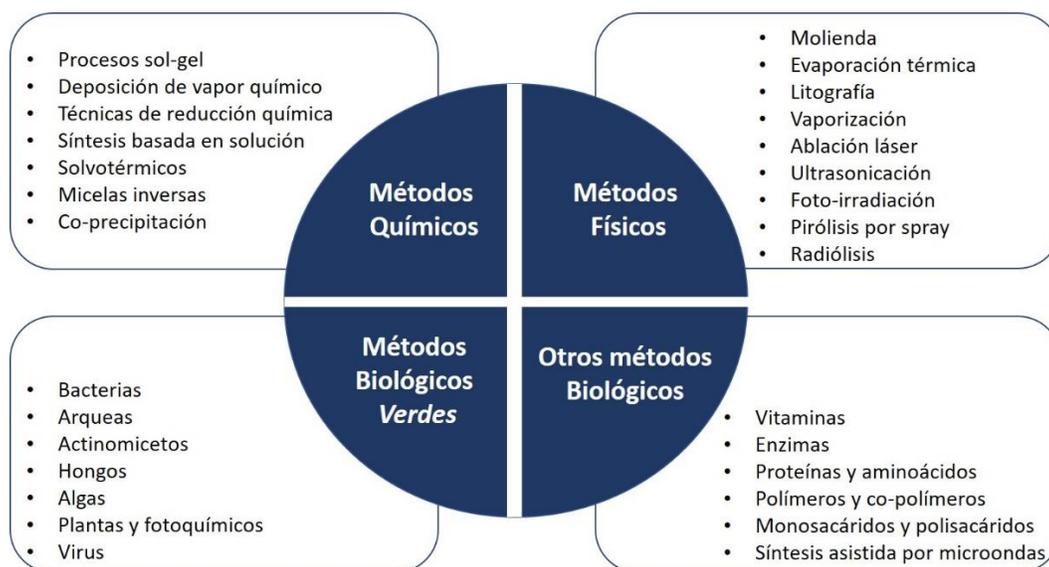


**Esquema II.1.1.** Reacción de descomposición térmica del trifluoroacetato de plata (CF<sub>3</sub>COOAg).

Lin et. al.<sup>15</sup> informaron la síntesis de nanopartículas de plata monodispersas preparadas por reducción térmica de CF<sub>3</sub>COOH en presencia de ácido oleico como agente estabilizante y empleando éter isoamílico (solvente de alto punto de ebullición) como solvente de reacción. Este procedimiento llevado a cabo en atmósfera inerte (Ar) y a temperaturas moderadas (~160 °C), permite efectuar un control fácil y preciso del tamaño de las NPs, variando parámetros como los tiempos de reacción de la mezcla (30-180 minutos) y la relación molar surfactante/precursor. La versatilidad sintética que presenta este método de descomposición térmica, hace posible la eliminación de los procesos de selección de tamaños, lo cual podría ser importante no sólo para el estudio de los autoensamblados y las propiedades de las AgNPs, sino también para la producción a gran escala de estas nanopartículas.<sup>15</sup>

Si bien los métodos químicos siguen siendo explotados por la versatilidad sintética que presentan, en la actualidad son diariamente exploradas nuevas estrategias para la obtención de NPs por medio de vías más verdes y funcionalidades más estables. En este aspecto, estrategias sintéticas que incorporan el uso de surfactantes bioactivos para la funcionalización de las nanopartículas presentan ventajas notables en comparación con los estabilizantes de uso común. El bromuro de

hexadeciltrimetilamonio (CTAB), es un surfactante catiónico que puede ser empleado como agente estabilizante en nanopartículas metálicas y cuya actividad biocida puede incrementarse de manera sinérgica, al coordinar este ligando con antibióticos bactericidas comerciales como *estreptomicina*.<sup>16</sup> Metodologías de esta naturaleza no solo permiten obtener respuestas de actividad antibacteriana eficaces, sino que también el desarrollo experimental empleando agua como solvente de reacción a temperatura ambiente, reduce el empleo de reactivos o cosolventes nocivos para la salud y el medioambiente.<sup>16</sup>



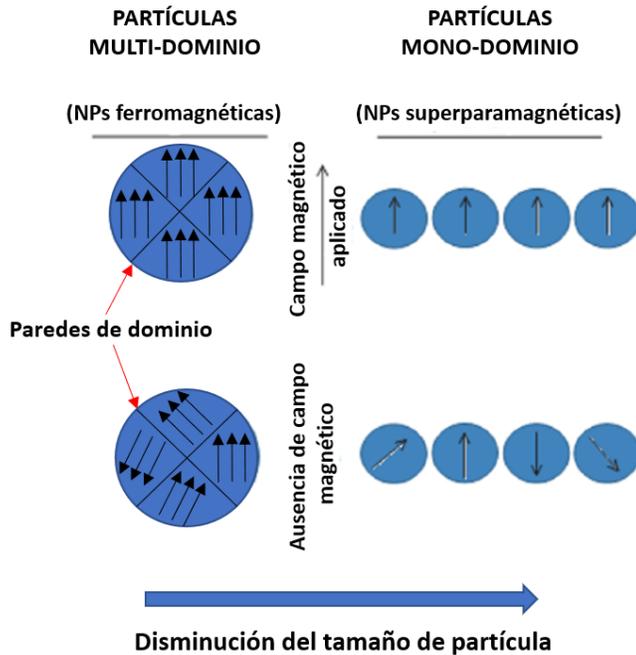
**Figura II.1.1.** Algunos ejemplos importantes de métodos químicos, físicos y bio-sustentables de preparación de nanopartículas metálicas. Adaptado de Thota, S; Crans, D. C. *Metal Nanoparticles: Synthesis and Applications in Pharmaceutical Sciences*. Ed. Wiley-VCH. Weinheim, Germany. 2018.

Los esfuerzos dedicados en torno a la reducción de componentes contaminantes en la fabricación de nanomateriales para la industria biomédica han permitido variar ampliamente las rutas sintéticas para la obtención de NPs. Con este objetivo, se han explorado métodos de obtención biológicos en los cuales bacterias, hongos o extractos vegetales, entre otros, son empleados como reductores, o bien aportan agentes reductores y estabilizantes en la producción de nanopartículas. Adicionalmente, gran cantidad de los métodos biológicos de síntesis involucran

tratamientos hidrotérmicos (agua ultrapurificada como solvente de reacción) a temperaturas entre 25 y 80°C, y tiempos de reacción que varían de 30 min a 1 h, con lo cual no sólo la toxicidad sino el costo energético, son considerablemente reducidos.<sup>17,18</sup> Muchos de estos sistemas de nanopartículas sintetizadas por vías verdes presentan enormes ventajas relacionadas a su actividad biocida, biocompatibilidad y biodisponibilidad. Sin embargo, una desventaja que tienen asociada, es el poco conocimiento acerca de las especies que resultan unidas al núcleo de las NPs las cuales resultan difíciles de identificar en términos de caracterización y optimización de estos sistemas. Es sabido que los extractos vegetales contienen una gran variedad de polioles, péptidos cíclicos, ácidos sórbico, ascórbico, retinoico, etc., que pueden fácilmente unirse al núcleo de las NPs. Si bien el aislamiento previo de determinadas moléculas para ser utilizadas posteriormente como ligandos en la funcionalización de las NPs representaría en principio una estrategia válida, en muchos casos esto conlleva a la obtención de sistemas menos estables o con una marcada reducción en la actividad biocida. Recientemente, Liu et. al. lograron la síntesis de AgNPs estabilizadas con inulina nativa, polisacárido que se encuentra en frutas y vegetales, acercándose un poco más a la biosíntesis con principios activos aislados. Los autores demostraron que estas nanopartículas no sólo son capaces de ejercer actividad biocida contra *S. aureus* y *E. coli*, sino que también se desempeñan eficientemente como catalizadores en la reducción de 4-nitrofenol, lo cual les podría permitir a futuro, alcanzar aplicaciones en degradación de contaminantes.<sup>19</sup>

Entre otras de las plataformas más estudiadas en la actualidad como NMs aptos para uso medicinal, se encuentran las nanopartículas magnéticas (MNPs). Particularmente, las nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), cuya composición radica en una mezcla de óxidos de hierro (II) y (III), presentan propiedades físicas, mecánicas, térmicas y químicas que les otorgan un gran potencial para aplicaciones biomédicas. Dentro de las nanopartículas magnéticas de óxidos de hierro, las conocidas bajo el nombre de SPIONs (“*Superparamagnetic iron oxide nanoparticles*”), presentan características superparamagnéticas que les confieren una respuesta dinámica ante la aplicación de campos magnéticos externos (calentamiento, vectorización, ultrasonido, etc.), y la ausencia de magnetización permanente ante el cese de campos magnéticos aplicados. Esta respuesta variable les otorga la propiedad única de poder ser direccionadas hacia determinados blancos o “*targets*” en diversas aplicaciones nanobiotecnológicas, o adquirir movimientos que les permiten generar calentamiento local.<sup>20</sup>

De manera general, el carácter superparamagnético, está regido por condiciones de contorno de **tamaño finito**, conocidas como *límite de dominio único* (single-domain) y *límite superparamagnético*. En partículas magnéticas grandes o ferromagnéticas, existe una estructura de multidominios, donde regiones de magnetización uniforme (dominios) son separadas por *paredes*. La formación de estos dominios está determinada por un balance entre la energía magnetostática ( $\Delta E_{MS}$ ) que se incrementa proporcionalmente con el volumen de los materiales, y la energía pared-dominio ( $E_{dw}$ ) que se incrementa proporcionalmente al área interfacial entre dominios. Cuando el tamaño de la partícula es reducido a unas décimas de nanómetro, el costo energético para la creación de dominios es demasiado alto y el material en cuestión adquiere un estado de *dominio único*. La condición de contorno de *límite de dominio único* se esquematiza en la **Figura II.1.2**.



**Figura II.1.2.** Comportamiento de magnetización de nanopartículas ferromagnéticas y superparamagnéticas bajo la aplicación de un campo magnético externo. En la imagen puede apreciarse cómo la configuración de dominios magnéticos, cambia en función del tamaño de partícula. Adaptado de Marathe, K.; Doshi, P. Magnetic Nanoparticles: Preparation, Physical Properties, and Applications in Biomedicine. *Nanoscale Res. Lett.* **2012**, 7, 1–13.

El diámetro crítico para una partícula esférica,  $D_C$ , por debajo del cual se alcanza la condición de dominio único, se obtiene cuando  $\Delta E_{MS} = E_{dw}$ , lo cual implica que:

$$D_C \approx 18 \frac{\sqrt{AK_{eff}}}{\mu_0 M^2} \quad (\text{II.1.1})$$

Donde  $A$  es la constante de intercambio,  $K_{eff}$  es la constante de anisotropía,  $\mu_0$  es la permeabilidad en el vacío, y  $M$ , la magnetización de saturación. Así, una partícula con un único dominio, se encuentra uniformemente magnetizada con todos los spines alineados en una misma dirección. La magnetización podrá ser revertida por rotación de spin ya que no hay paredes dominio que deban desplazarse, lo cual produce una disminución drástica de la coercitividad (resistencia de un material ferromagnético a ser desimantado) del sistema. En consecuencia, la desmagnetización de las partículas no requerirá ejercer un trabajo adicional. La evidencia experimental indica que se obtienen NPs de dominio único, cuando el tamaño de las nanopartículas se encuentra en un rango de entre 10-20 nm.

El segundo fenómeno importante que tiene lugar en las nanopartículas magnéticas, es el *límite superparamagnético*. Esta condición opera para nanopartículas de dominio único perfectamente aisladas, y define los valores de energía de anisotropía magnética que establecen los límites para el salto de un estado de magnetización a otro (barreras energéticas de magnetización). La energía de anisotropía magnética por partícula que es responsable de mantener la magnetización a lo largo de una determinada dirección, puede ser expresada según la ecuación **II.1.2**, donde  $V$  es el volumen de la partícula,  $K_{eff}$  la constante de anisotropía y  $\theta$ , el ángulo entre la magnetización y el eje fácil (dirección preferencial de la magnetización total del sistema)

$$E(\theta) = K_{eff} V \sin^2 \theta \quad (\text{II.1.2})$$

La barrera de energía  $K_{eff}V$  separa dos direcciones fáciles de magnetización con energías equivalentes. Con la disminución del tamaño de partícula, la energía térmica excede la barrera de energía ( $k_b T > K_{eff}V$ ), y la magnetización es fácilmente invertida. Por lo tanto, el sistema se comporta como un paramagneto bajo estas condiciones. Si se hace una analogía con átomos paramagnéticos, en lugar de momentos magnéticos atómicos individuales, ahora existe un único momento magnético gigante (*súper*) dentro de cada partícula. Este sistema es definido ahora como *superparamagnético*. Su curva de magnetización denotará ausencia de histéresis y una coercitividad

nula, siendo capaz de responder activamente ante campos magnéticos externos y cesar su respuesta ante la remoción del mismo. Cabe aclarar que, al igual que en la condición de dominio único, también existe una temperatura determinada para estos materiales, por debajo de la cual el sistema perdería su condición de superparamagnetismo. Esta temperatura es denominada *temperatura de bloqueo* ( $T_B$ ), y depende también de la constante de anisotropía, el tamaño de las partículas, el campo magnético aplicado, y los tiempos experimentales de medición, como se discutirá en secciones posteriores.

La gran importancia que han adquirido las nanopartículas magnéticas se debe precisamente a esta capacidad de direccionalidad, control en el encendido/apagado ante la aplicación de campos y modificación de las propiedades magnéticas, sumado a la versatilidad de funcionalidades que puede ser impartida en la superficie. Además, muchas MNPs, especialmente las de óxidos de hierro, presentan baja toxicidad por lo cual son investigadas para su empleo en campos como la reparación de tejidos, terapia y/o diagnóstico dirigido (transporte de fármacos) y resonancia magnética de imágenes entre muchas otras.<sup>21,22</sup>

Las nanopartículas magnéticas han buscado ser sintetizadas desde entonces por diferentes vías con el fin de lograr un mejor grado en control de la forma, tamaño, estabilidad y monodispersidad, los cuales representan factores que tendrán un impacto directo en sus propiedades físicas finales. Entre los métodos más empleados, la coprecipitación representa una vía fácil y conveniente para la síntesis de nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) o maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), a partir de soluciones salinas de  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  y por adición de una base bajo atmósfera inerte a temperatura ambiente o elevada. El tamaño y la forma de estas NPs de óxido de hierro depende del tipo de sal usada (cloruros, sulfatos, nitratos, percloratos, etc.), la relación entre iones férrico/ferroso, temperatura de reacción, pH, fuerza iónica y demás parámetros de reacción.<sup>23</sup> El método de coprecipitación permite obtener NMs cuya magnetización ( $M_S$ ) varía entre 30-80  $\text{emu g}^{-1}$ , siendo estos valores, menores a los que presenta el  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  como material macroscópico (100  $\text{emu g}^{-1}$ ); aún así los NMs obtenidos por estas vías continúan presentando valores que indican que las configuraciones iónicas permanecen inalteradas.<sup>23</sup> Si bien las NPs obtenidas por la vía de coprecipitación presentan un alto grado de polidispersidad, se ha podido lograr con el tiempo y experiencia un buen control del tamaño y la estabilización con surfactantes de naturaleza química variada.<sup>23,24</sup>

En contraste con los protocolos más conocidos, los cuales continúan empleando el método de la coprecipitación, los métodos de síntesis a altas temperaturas: hidrotérmico y descomposición

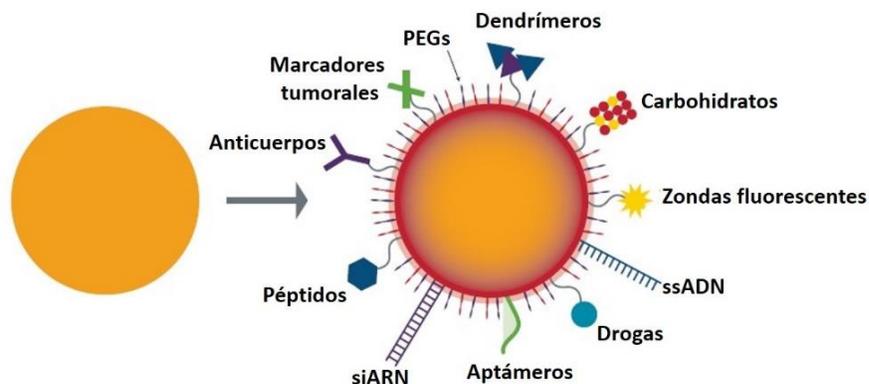
térmica, han atraído considerablemente la atención de muchos grupos de investigación. Estos métodos tienen un gran potencial en cuanto a que ofrecen un mejor control del tamaño, la forma y la capacidad de modificación o “*sintonizado*” de las propiedades magnéticas.<sup>22</sup> Como se mencionó anteriormente en comparación con vías de síntesis de Turkevich, los métodos de descomposición térmica para la síntesis de nanopartículas magnéticas permiten obtener MNPs monodispersas (~20-25 nm) que cuentan además con altos valores de  $M_s$ , y que no pueden ser preparadas por coprecipitación. Cualquiera sea el método de síntesis, para prevenir la agregación y coalescencia de los núcleos magnéticos, se utilizan ligandos como ácido oleico, oleilamina ó trioctilfosfina que permiten la pasivación de la superficie de las partículas.<sup>21</sup> Entre algunos de los ejemplos interesantes a destacar, Sun y Zeng reportaron un método de descomposición térmica para la síntesis de nanopartículas magnéticas monodispersas en el que se puede controlar el tamaño, basadas en una reacción de  $\text{Fe}(\text{acac})_3$  (acac= acetil-acetonato) a altas temperaturas (265°C) en fenil éter en presencia de alcohol, ácido oleico y oleilamina. Este proceso no requirió un procedimiento de selección de tamaños para alcanzar un alto grado de monodispersidad y puede ser fácilmente escalable para su producción en masa.<sup>25</sup> Por otra parte, si bien existe un incremento en la polidispersidad final de las MNPs obtenidas con respecto a la descomposición térmica, los métodos hidrotérmicos resultan ambientalmente benignos dado que emplean menores temperaturas y soluciones menos tóxicas, además de requerir el uso de reactivos menos costosos. Lebedev et al. implementaron esta metodología para la síntesis de MNPs hidrofóbicas partiendo de cloruros de Fe (II) y (III), hidróxido de amonio como agente de precipitación y oleato de sodio como fuente de ligandos oleato para su estabilización. Los autores demostraron que esta vía procedimental permite un amplio control sobre las  $M_s$  resultantes en nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  superparamagnéticas de tamaño y cristalinidad fácilmente regulables.<sup>26</sup>

De igual modo que las AgNPs, las MNPs han sido constantemente investigadas para el desarrollo de dispositivos biomédicos, y pese a que no existe aún un marcado impacto en el mercado para la gran mayoría de las aplicaciones planteadas, es posible encontrar muchos ejemplos de productos basados en dispersiones de NPs solubles en agua para el área biomédica.<sup>27</sup> Las MNPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , en particular las SPIONs, continúan siendo la plataforma más estudiada debido sus características físico-químicas intrínsecas de: (1) biocompatibilidad, (2) alta magnetización con coercividad cero y remanencia despreciable (ausencia de magnetización remanente al remover el campo magnético aplicado), lo cual permite evadir la agregación y “*clustering*” de partículas, siendo fáciles de guiar

en aplicaciones como transporte de fármacos y extremadamente fáciles de separar durante etapas y/o aplicaciones sintéticas; y (3), propiedades fisicoquímicas modificables (distribución de partículas, magnetización de saturación).<sup>28</sup>

### **II.1.2- Ligandos biocompatibles para la funcionalización de nanopartículas de interés biomédico**

Tal como se discutió en secciones previas, la diversidad y versatilidad de los diferentes métodos sintéticos de nanopartículas, permiten modificar la química de superficie de las mismas y así, sus propiedades fisicoquímicas, lo que les permite adaptarse a sistemas celulares y biomoleculares. Esto ha confluído en un gran atractivo para la fabricación de dispositivos con aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico. El empleo de estos nanomateriales en biomedicina requiere de una interacción controlada con las biomoléculas, para lo cual es necesario considerar en su diseño, no solamente la biocompatibilidad, sino también la multiplicidad de interacciones preponderantes en medios biológicos complejos. Así, distintos sistemas de nanopartículas pueden ser modificados para lograr diferentes propósitos tales como una alta capacidad de carga de fármaco, y una mayor estabilidad y durabilidad dentro del sistema circulatorio. En ocasiones, es necesario también lograr un incremento en la capacidad de internalizarse en células, un mayor efecto de señalización, o incluso, no-señalización a los fines de evitar la detección por parte de macrófagos del sistema retículo-endotelial (respuesta inmune) que evitan que la nanopartícula alcance un determinado blanco (efecto “*stealth*”).<sup>29</sup> Por medio de diferentes estrategias se ha logrado impartir multiplicidad de funcionalidades a nanopartículas con núcleos de diferente composición a través de moléculas pequeñas, surfactantes, dendrímeros, polímeros y biomoléculas entre otros, los cuales ya forman parte de numerosos reportes como ligandos bio-activos con fines terapéuticos (Figura II.1.3).<sup>30-35</sup>



**Figura II.1.3.** Diagrama de funcionalización superficial de nanopartículas. **Izquierda:** nanopartícula original. **Derecha:** nanopartícula con funcionalización superficial que permite la unión de una amplia variedad de moléculas vectoriales. Adaptado de Hurst, M.; DeLong, R. Spectral Signature Analysis of Surface Functionalized Nanoparticles. *Mol. Devices* 2016.

Las nanopartículas pueden ser funcionalizadas con determinado tipo de ligandos orgánicos y/o biológicos, con el fin de obtener una sinergia en sus propiedades bio-activas. En el caso de las AgNPs, a fin de reducir su toxicidad sin modificar su capacidad biocida (ejercida por mecanismos como los mencionados en la sección II.1.1), numerosas metodologías en torno a una adecuada funcionalización de superficie, han sido ensayadas. Así, por ejemplo, se ha estudiado que la funcionalización de las AgNPs con biomoléculas como carbohidratos (galactosa, manosa, etc.) logran una importante disminución en la toxicidad de las NPs en lo que respecta a células neuronales y hepatocitos. Esta bio-funcionalización logra además una importante mejora en la captación celular en comparación con otros ligandos de uso convencional como citrato o etilenglicol.<sup>36</sup> Muchos autores sugieren que resulta difícil predecir que parte de la toxicidad de las AgNPs es causada por iones  $Ag^+$ , y que parte puede realmente atribuirse a la “nano-forma” del material.<sup>37</sup> Experimentos de inducción de carbonilación en proteínas, han demostrado que la respuesta al estrés oxidativo que presentan las AgNPs por formación de especies reactivas del oxígeno (ROS), depende en gran medida de la funcionalidad impartida (carbohidrato, citrato, etilenglicol, etc.). De igual modo, tanto la densidad final de carga como el balance hidrofóbico/hidrofílico de las AgNPs, tendrán influencia en el comportamiento biofísico frente a membranas biológicas.<sup>36</sup> Otros estudios han hecho hincapié en el empleo de ligandos tiol para

lograr efectos interesantes en la modulación de la actividad citotóxica. Borowik et. al.<sup>38</sup> demostraron que AgNPs funcionalizadas con ácido 11-mercaptoundecanoico son capaces de modular la toxicidad de determinados mutágenos, aumentando la viabilidad de células tratadas con esta nanopartícula.<sup>38</sup> Estudios llevados a cabo en monocapas de Langmuir empleando un fosfolípido 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC) como modelo de biomembrana, demostraron que AgNPs funcionalizadas con ácido 4-mercaptobenzoico (MBA) presentan una mayor adsorción e interacción con la monocapa en comparación con nanopartículas citratadas. Pese a que ambas funcionalizaciones (citrato y MBA) le confieren una carga neta negativa a las AgNPs, las diferencias en cuanto a la efectividad para interactuar, son debidas a una sinergia entre la interacción electrostática de los grupos cargados y las interacciones hidrofóbicas que se establecen entre los anillos aromáticos de MBA y las cadenas hidrocarbonadas del fosfolípido.<sup>39</sup>

Similares funcionalidades han sido empleadas en nanopartículas de  $Fe_3O_4$ . Como se detalló anteriormente, las MNPs poseen excelente biocompatibilidad y sus características de superparamagnetismo les confieren un gran número de utilidades en el campo de las terapias vectorizadas en las cuales determinadas biomoléculas pueden ser unidas a la superficie de las NPs y finalmente liberadas en el sitio de acción.<sup>40</sup> Dentro del campo de la resonancia magnética de imágenes (MRI), se ha comprobado que MNPs con distinto tipo de recubrimiento superficial producen alteraciones en los tiempos de relajación T1 y T2, incrementando notoriamente la calidad de la imagen obtenida.<sup>41</sup> Las nanopartículas de óxidos de hierro son fácilmente degradadas en el cuerpo e incorporadas a las reservas de hierro del mismo, o bien empleadas en otros procesos metabólicos. Sus altos valores de magnetización permiten una fácil regulación en la relación de los tiempos de relajación que se necesitan para que sean empleadas efectivamente como agentes de contraste, por medio de la variación del tamaño, estado superficial y composición de las partículas. De manera general, efectos de incremento de contraste en agentes tipo T1 (aumento en tiempos de relajación de spin electrónico) son logrados al disminuir el tamaño de las nanopartículas a diámetros de entre 1,8 y 3 nm, mientras que tamaños de entre 4 y 12 nm logran un efecto de mejora en contraste para agentes tipo T2. En lo respectivo a la composición del material que las estabiliza, es necesario contar con una funcionalidad y grado de cobertura tales, que permitan evitar la aglomeración de las MNPs sin alterar o reducir las propiedades magnéticas de las mismas. Ligandos sensibles al pH externo influyen en igual magnitud el equilibrio entre tiempos de relajación, por lo que sus características fisicoquímicas deben ser tenidas en cuenta no

solo para su interacción frente a membranas biológicas sino también en pos de lograr una relajación efectiva en los núcleos activos en resonancia magnética, presentes en el medio (tejido u órgano diana).<sup>41</sup>

Moléculas surfactantes pequeñas son comúnmente utilizadas para la funcionalización de nanopartículas de óxido de hierro.<sup>42</sup> Entre los ligandos biocompatibles más versátiles, los ácidos grasos pueden ser fácilmente empleados como agentes estabilizantes en diferentes medios.<sup>34</sup> La funcionalización de NPs mediante ácidos grasos puede diseñarse para conferirles características hidrofílicas o hidrofóbicas, las cuales pueden lograrse aplicando diferentes métodos de purificación. Así, por ejemplo, las NPs hidrofílicas estabilizadas por ácidos grasos cuentan con una doble capa, en donde el grupo  $\text{COO}^-$  de la capa más externa del estabilizante se expone al medio. En la configuración de una única capa de ácido graso que estabiliza a las NPs, las cadenas hidrocarbonadas quedan expuestas, otorgando propiedades hidrofóbicas.

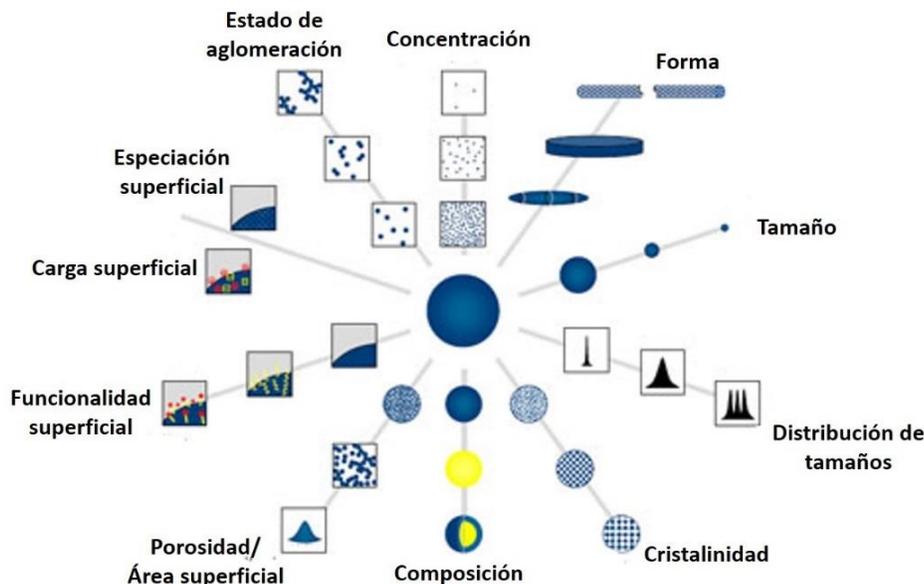
El ácido oleico (OA) ha sido reportado como uno de los ácidos grasos más empleados en estabilización de nanopartículas.<sup>43-45</sup> En consonancia con las propiedades mencionadas para este tipo de ligandos, metodologías de funcionalización a través de la formación de una monocapa de OA conjugada al núcleo magnético, les otorga una gran estabilidad coloidal en solventes orgánicos donde las cadenas hidrocarbonadas del lípido quedan expuestas hacia el medio externo.<sup>43,46</sup> Por otro lado, en la configuración de doble capa, los grupos  $\text{COO}^-$  polarizables del OA, quedan expuestos en la superficie de las nanopartículas, confiriéndoles una buena dispersabilidad en agua y demás medios acuosos.<sup>47</sup> En ambos casos, esta unión estable resulta en la obtención de nanopartículas con un alto grado de monodispersidad, baja toxicidad y alta actividad *in vitro*, manteniendo al mismo tiempo, una respuesta magnética eficiente.<sup>42,44</sup>

La naturaleza hidrofóbica de las nanopartículas también puede modificarse a hidrofílica por medio de metodologías que pueden abarcar desde funcionalización con polímeros e intercambio de ligando hasta oxidación de ácidos grasos en la superficie de las mismas.<sup>29</sup> Cualquiera sea el método implementado, es necesario considerar también la viabilidad del proceso global en la fabricación de estos materiales, la cual se entiende en un contexto donde no solo el destino final de las nanopartículas en el organismo vivo (aspecto principal) importa, sino también la no-toxicidad para el medioambiente que las metodologías necesarias para su síntesis presenten. Si bien el desarrollo de rutas sintéticas que involucren alternativas más “verdes” (Ej., reactivos y solventes menos tóxicos, condiciones de reacción menos extremas) impacta directamente en la

creación de estas nuevas tecnologías enfocadas a terapias de diagnóstico, las mismas representan también avances importantes para la fabricación de nanomateriales con aplicaciones en múltiples campos de la ciencia.

### II.1.3- Caracterización de nanopartículas

Los nanomateriales imponen un gran desafío en materia de técnicas de caracterización. La caracterización implica un factor determinante a la hora de validar sus propiedades, la reproducibilidad en la síntesis, y su comportamiento frente a las moléculas del medio en el cual se encuentran. Una caracterización incompleta debida a la falta de experticia, instrumentación o simple desconocimiento de los aspectos fisicoquímicos del sistema, limita en igual medida el desarrollo y entendimiento de los nuevos materiales. De manera general, dentro del campo de las nanopartículas, algunos de los desafíos más comunes radican en la medida en que las características del sistema se ven modificadas conforme cambian los arreglos estructurales y conformacionales entre las partículas interactuantes. Así las propiedades de estos sistemas pueden verse modificadas en mayor o menor medida, dependiendo de si las nanopartículas se comportan como entidades individuales en el seno de una dispersión (*bulk*) o adquieren una estructuración en superficies o “capas”, donde otro tipo de interacciones (electrostáticas, iónicas, hidrofóbicas, etc.) les permiten adoptar características absolutamente distintas o sinérgicas con respecto al material inicial. El dinamismo característico de las NPs, también las hace propensas a experimentar cambios en el tiempo y acorde al ambiente en el que se encuentran; las partículas se aglomeran, disuelven, pueden ser foto o termo-sensibles, adsorber moléculas del entorno, etc., lo cual pone en riesgo la fiabilidad de los resultados en términos de respuesta experimental en función de las características del sistema.<sup>48,49</sup> Es por ello que, a lo largo del transcurso de la innovación en nanotecnología, se han perfeccionado una amplia gama de metodologías precisas capaces de realizar análisis de caracterización cada vez más específicos dependiendo del nanomaterial y tipo de interacción que se desee estudiar. Algunos parámetros que deben ser evaluados se muestran en la **Figura II.1.4**.



**Figura II.1.4.** Parámetros y propiedades de las nanopartículas que pueden ser estudiados a través de las diferentes técnicas de caracterización. Adaptado de Hassellöv, M.; Kaegi, R. *Analysis and Characterization of Manufactured Nanoparticles in Aquatic Environments*. Lead, J. R., Smith, E. Ed. Wiley. Weinheim, Germany. 2009.

Técnicas como la Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM) y Microscopía de Barrido Electrónico (SEM) permiten llevar a cabo estudios completos para la determinación de la estructura y el tamaño de las nanopartículas. La relación área superficial/volumen de las nanopartículas tiene una gran influencia en el desempeño y las propiedades de las mismas, por lo cual se emplean comúnmente técnicas de determinación de área superficial por medio de modelos de isothermas de adsorción de gases como BET (Brunauer–Emmett–Teller) o Langmuir. La espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS) resulta una de las técnicas más empleadas en la actualidad ya que permite conocer información acerca de la composición elemental superficial de los nanomateriales y realizar un análisis detallado de cada átomo que los compone, estados de oxidación, formación de nuevos enlaces o adsorción de especies. La estructura de red cristalina en un sólido nanoparticulado puede determinarse por medio de espectroscopía de difracción de rayos X de polvo (p-XRD) obteniéndose también información relevante acerca de alteraciones en la estructura de planos cristalinos y grado de cristalinidad.<sup>2</sup>

A continuación, se describen brevemente algunas de las técnicas de caracterización de nanopartículas que fueron empleadas a lo largo de esta tesis. El empleo de estas metodologías

permitió obtener un alto grado de certeza en cuanto a las propiedades fisicoquímicas que presentan las AgNP-OA y MNP-OA estudiadas. El conocimiento de estas propiedades permitió establecer relaciones estructura-respuesta, en base al comportamiento que evidenciaron estas NPs, durante su interacción con las biomoléculas y los modelos de biomembranas a las cuales fueron expuestas.

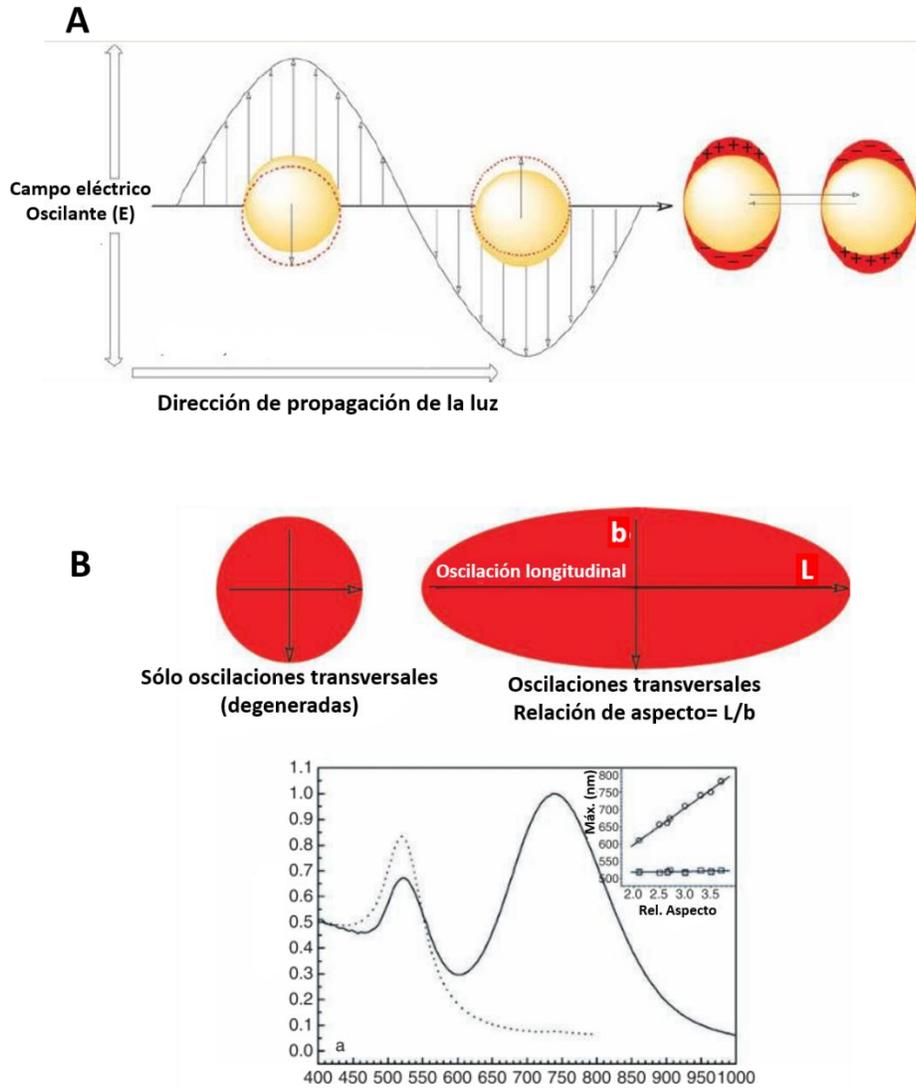
- **Efectos de plasmón superficial en nanopartículas metálicas. Espectrofotometría UV-Visible**

Como fue mencionado en el capítulo anterior, la nanofotónica no sólo permite el diseño de diversas aplicaciones para los NMs, como biosensores, SERS, etc. sino que es, primeramente, una de las herramientas más utilizadas en la caracterización de nanopartículas metálicas.

Dado que un gran número de átomos, en relación al número total, se encuentran en la superficie de las NPs, los electrones de átomos externos forman una nube o “gas” de electrones en continua interacción. Cuando la luz (radiación electromagnética) incide sobre las nanopartículas, su campo eléctrico perturba esta nube electrónica y los electrones en cuestión son excitados hacia la banda de conducción (CB). En partículas pequeñas ( $r \ll \lambda$ ), esto crea una separación de cargas de superficie denominada *resonancia de dipolo*. El momento dipolar por unidad de volumen se conoce como *polarización* (**Figura II.1.5 A**). La oscilación dipolar de todos los electrones, tendrá la misma fase, y cuando la frecuencia del campo electromagnético entra en resonancia con el movimiento coherente de los electrones de superficie, ocurre una fuerte absorción en el espectro óptico. Esta condición de resonancia, se conoce como *Localized Surface Plasmon Resonance* (LSPR). La frecuencia y el ancho de la banda de absorción del LSPR, depende del tamaño y la forma de las nanopartículas metálicas, la constante dieléctrica del metal que constituye a las partículas y la constante dieléctrica del medio que las rodea. De esta manera, es posible adquirir conocimiento acerca de la morfología y dispersión de tamaños de las nanopartículas metálicas basándonos en las características de la o las bandas de plasmón superficial.<sup>50</sup>

Existen múltiples procesos de pérdida de energía cuando las NPs son irradiadas: absorción, *radiation damping*, efectos de retardación, depolarización dinámica, etc., los cuales dan lugar al espectro de extinción del sistema. Sin embargo, bajo condiciones de contorno expresadas anteriormente, en las que el tamaño de las nanopartículas se considera mucho menor a la longitud

de onda de irradiación, solo la resonancia dipolar del plasmón contribuye a la respuesta óptica y podemos considerar al espectro de extinción, dominado por el fenómeno de absorción. Para partículas grandes (ej.: agregados de NPs), la luz no es capaz de polarizar las nanopartículas de manera homogénea, y efectos de retardación dan lugar a fenómenos de excitación de modos de orden mayor o multipolos. Así, múltiples resonancias son generadas, dando lugar a un perfil de extinción ancho o picos adicionales localizados a energías más bajas (*red-shift*) en el espectro de extinción. Para partículas no-esféricas, el campo eléctrico inducido por el plasmón superficial, no se distribuye uniformemente en la superficie de las estructuras (ej.: nanotubos, nanocables). En consecuencia, el plasmón superficial puede constar de múltiples bandas (oscilación de los electrones en diferentes direcciones) con anchos a media altura (FMHW) variados, los cuales dan idea de cuan rápidos son los procesos de dispersión de energía de los electrones<sup>51</sup>, e incluso a distancias diferentes dependiendo de la relación de aspecto de la estructura (ej. Dimensión perpendicular vs. Longitudinal, **Figura II.1.5 B**). La modificación del perfil de la banda de LSPR también puede evidenciar cambios en la estructura de las nanopartículas metálicas como resultado de un determinado tratamiento o interacción posterior con otras moléculas del entorno. De igual modo, puede servir como parámetro para el estudio de la estabilidad de las NPs con el tiempo y la temperatura, su incidencia en procesos de aglomeración o coalescencia, o bien ante determinados estímulos externos.



**Figura II.1.5.A-** Oscilaciones periódicas de la nube de electrones de superficie en las NPs, inducidas por el campo EM de la radiación incidente. A la derecha se muestra la polarización de los electrones del metal. **B-** Variación de la banda del plasmón superficial dependiendo de la relación de aspecto ( $R=L/b$ ) de la nanopartícula. En el caso de NPs esféricas, al ser isotrópicas y poseer dimensiones uniformes ( $R=1$ ), el plasmón mostrará un único pico de absorción (línea de puntos). Por otro lado, en el caso de una nanopartícula anisotrópica como un nanotubo ( $R \neq 1$ ), la banda de absorción del plasmón de superficie evidenciará dos picos correspondientes a los modos de oscilación transversal y longitudinal. Adaptado de Hornyak, G. L., Moore, J. J., Tibbals, H. F., Dutta, J. *Fundamentals of Nanotechnology*; CRC Press: Washington, USA, 2009.

- **Tipo y grado de funcionalización: Espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier (FT-IR) y Análisis Termogravimétrico (TGA)**

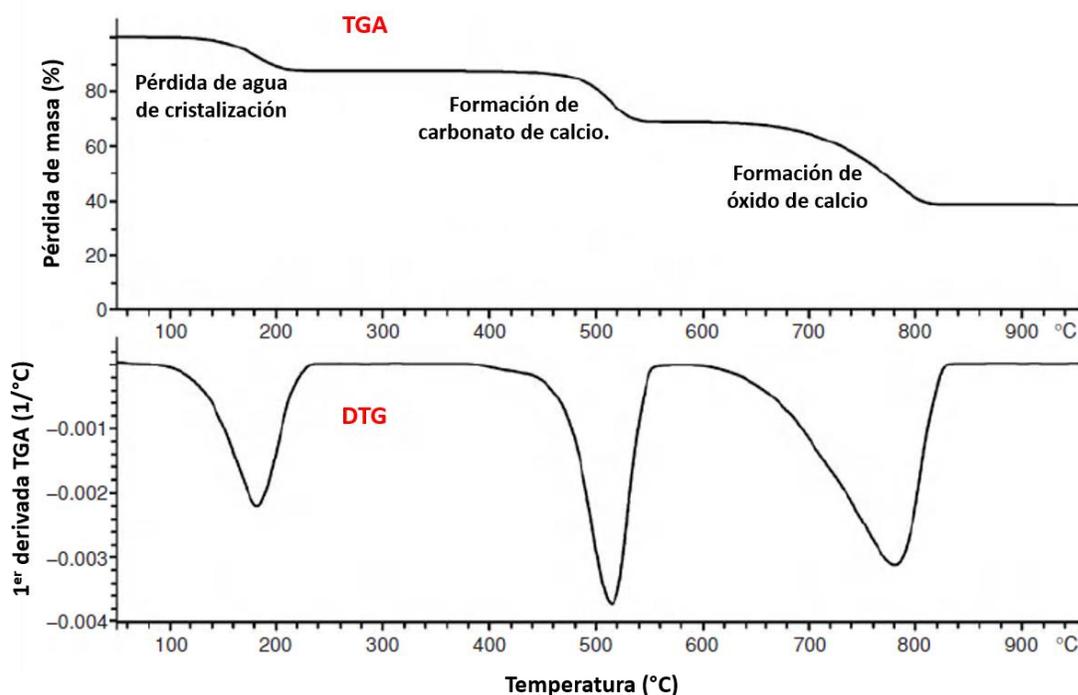
La espectroscopía FT-IR permite obtener información valiosa acerca de los diferentes grupos funcionales que pueden estar presentes en diferentes tipos de nanopartículas con núcleos de diversa constitución, por medio de la medición de las frecuencias vibracionales de los enlaces químicos involucrados. Con la información obtenida por esta técnica se pueden conocer, por ejemplo, los grupos funcionales coordinados a la superficie de las NPs. Esta información puede utilizarse para realizar análisis tanto cualitativos, sobre la estructura y las conformaciones de las moléculas, como cuantitativos teniendo en cuenta relaciones de bandas e identidades de cada uno de ellos. Los métodos más comunes para la medición por espectroscopía FT-IR consisten en *transmitancia* y *reflectancia total atenuada* (ATR). Dado que el arreglo experimental empleado en el modo de transmitancia posee una gran sensibilidad gracias a la baja relación señal/ruido con el que las muestras pueden ser analizadas, este constituye el método de mayor uso en el análisis de materiales. Bajo esta metodología pueden medirse muestras sólidas, líquidas o gaseosas. Las muestras sólidas de nanopartículas secas son usualmente molidas con un mortero convencional, junto con una proporción de un haluro de metal alcalino, usualmente KBr. Estos haluros poseen propiedades de flujo en frío, por lo que cuando son pulverizados y luego sometidos a altas presiones ( $\sim 1000 \text{ kg/cm}^2$ , paso posterior), el mismo presenta propiedades transparentes o translúcidas como el vidrio. La muestra es compactada en una pastilla y colocada en la celda correspondiente. El arreglo óptico de la instrumentación para FT-IR, permite la irradiación homogénea de la mezcla con la energía necesaria. Pese a la practicidad de esta metodología en el análisis de rutina, las técnicas de microscopía FT-IR han avanzado progresivamente hasta convertirse en la opción de preferencia en el análisis de NMs. Esta técnica permite obtener información espectral espacial y química de manera simultánea. En este caso la muestra puede no requerir preparación previa ya que se deposita en forma de polvo sobre la platina del microscopio para su análisis directo. Una vez allí, la radiación IR puede concentrarse para obtener espectros en modo de transmitancia o ATR, según se desee, mucho más precisos.<sup>52</sup>

En términos de funcionalidades químicas, FT-IR puede emplearse para determinar tanto el tipo de ligando presente en la superficie como la configuración del enlace existente entre el ligando y el núcleo de las NPs. Este análisis se basa en los desplazamientos de las frecuencias vibracionales

de cada enlace como resultado de la coordinación o unión de diferentes moléculas a la superficie de las NPs. Por ejemplo, moléculas de ácidos carboxílicos mostrarán en su espectro de infrarrojo, la banda de absorción característica del estiramiento del grupo carbonilo (C=O) entre 1700 y 1750  $\text{cm}^{-1}$ . Estas moléculas, en su rol de ligandos de estabilización, se unen al núcleo de las nanopartículas por medio de los grupos carboxilo. Como consecuencia de unión, el grupo carboxílico pasa a su forma carboxilato, y la frecuencia de enlace correspondiente a este grupo, se desplaza hacia valores menores. Esto se debe a que al estar ahora el grupo ácido carboxílico unido al núcleo de la nanopartícula, el doble enlace C=O tiene características de enlace simple, con lo cual se requiere una menor energía para producir la transición vibracional bajo este estado. Los mismos razonamientos pueden realizarse si se trata de grupos amino ( $\nu_{s, as}$  o  $\nu_{\sigma}$  N-H) en el caso de proteínas o grupos fosfato (P-O) en el caso de fosfolípidos. Estos diferentes desplazamientos en frecuencias vibracionales pueden implementarse para determinar el tipo de enlace o grado de coordinación que se establece entre el ligando y la nanopartícula, como se verá más adelante.

El análisis termogravimétrico (TGA) es una técnica analítica sencilla que mide el cambio de masa en una muestra en función de la temperatura y/o el tiempo, bajo atmósfera controlada.<sup>53</sup> Típicamente no se requiere una preparación compleja de la muestra a excepción de su adecuado secado, y la información que se obtiene permite evaluar pureza y caracterizar diversos tipos de nanomateriales.<sup>54</sup> Básicamente, el analizador termogravimétrico consiste en una termobalanza de alta precisión el cual está conectado a un soporte/receptáculo (usualmente de alúmina), dentro de un horno con temperatura controlada. El receptáculo se localiza en un sensor, conectado a una termocupla para medir la temperatura de la muestra. Un flujo de gas es introducido en el horno, este puede ser  $\text{N}_2$  para obtener una atmósfera inerte o bien aire/ $\text{O}_2$  para obtener una atmósfera oxidante. Los experimentos de TGA usualmente se realizan desde temperatura ambiente a temperaturas próximas a los 700-1000°C. Los materiales son calentados a altas temperaturas, mientras se monitorea la masa de la muestra, lo cual deriva en la curva de descomposición o *curva termogravimétrica*. La curva termogravimétrica permite obtener las proporciones en que la masa cambia, lo cual generalmente se muestra como porcentaje de pérdida de masa (% masa) vs. T (temperatura, °C). Frecuentemente, un gráfico de la derivada de la curva de TGA referida como curva de *derivada termogravimétrica* (DTG), es utilizada para localizar con mayor precisión, la temperatura a la cual ocurren los procesos de pérdida de masa. Los cambios de masa en una muestra pueden deberse a procesos como evaporación, secado, desorción o adsorción, sublimación

y descomposición térmica. Estos cambios de masa son observados como “escalones” en la curva de TGA o como picos en la curva de DTG (**Figura II.1.6**).<sup>55</sup>



**Figura II.1.6.** Curvas de TGA (superior) y DTG (inferior) para una muestra de oxalato de calcio monohidratado. Teniendo en cuenta el 100% como masa total de muestra, cada escalón se corresponde con un proceso de pérdida de masa diferente, cuyas temperaturas pueden ser fácilmente deducidas de la derivada primera (DTG) de la curva termogravimétrica. El programa de calentamiento aplicado fue fijado en 30 K/min bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. Adaptado de *Principles and Applications of Thermal Analysis*, 1st ed.; Gabbott, P., Ed.; Blackwell Publishing Ltd, **2008**.

Esta técnica puede emplearse para determinar la cantidad de compuesto orgánico que recubre un nanomaterial, propiedades y características de polímeros, temperaturas de descomposición, contenido de humedad adsorbida (en entornos cristalinos complejos, puede incluso dar idea de un determinado tipo de estructuración), contenido residual de metales, etc. Dadas sus capacidades, TGA se ha convertido en una herramienta muy útil para determinar el grado de cubrimiento superficial de nanopartículas. Tanto en nanopartículas metálicas como magnéticas funcionalizadas con ligandos orgánicos, esta técnica permite alcanzar una determinación precisa de la masa total que se desprende de la especie orgánica, la cual atraviesa por lo general, por procesos de

combustión tempranos a temperaturas entre 200 y 400°C. Estas temperaturas resultan mucho menores a las temperaturas de fusión del material inorgánico que constituye al núcleo de las nanopartículas y permite realizar la estimación en peso de la masa total correspondiente a cada uno de los componentes (masa en bulk) que puede extrapolarse a las proporciones presentes en una nanopartícula como entidad individual.

Como se mencionó anteriormente, las pérdidas de masa estarán relacionadas a la temperatura de degradación (combustión, oxidación) de cada componente de la muestra; sin embargo, en casos de materiales capaces de ocluir agua u otros solventes en diferentes entornos, será posible observar múltiples “escalones” por eliminación de la misma molécula (mismo solvente, en este caso) ubicado en diferentes entornos estructurales de la muestra. Así también pueden observarse diferentes etapas de pérdida en muestras de NPs, para la oxidación de un mismo ligando orgánico, dependiendo del tipo de interacciones ligando-nanopartícula que se estén rompiendo y la disposición de las moléculas sobre la superficie del núcleo.<sup>56</sup>

- **Análisis por espectroscopía de rayos X para el estudio de la composición atómica y estructura cristalina de las nanopartículas**

### **Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS)**

Uno de los más grandes desafíos de la ciencia de superficies, es la caracterización detallada y cuantitativa de la composición de la superficie a nivel molecular o atómico. La espectroscopía de fotoelectrones de rayos X constituye una técnica poderosa para la investigación de superficies sólidas y adsorbatos.<sup>57</sup> La misma, involucra la irradiación de un sólido en *alto vacío* (UHV), con un haz monocromático de rayos-X y el posterior análisis de los electrones emitidos según su energía (**Figura II.I.7A**). El espectro es obtenido como un gráfico de número de electrones detectados en función de sus energías de enlace. Usualmente se emplean ánodos de MgK $\alpha$  (1253.6 eV) o AlK $\alpha$  (1486.6 eV), cuyos fotones generados tienen un poder de penetración limitado en sólidos, de 1-10 micrómetros. Estos fotones interactúan con átomos en la región superficial, causando la emisión de electrones por efecto fotoeléctrico. Los electrones que logran escapar de la superficie (desde una profundidad máxima de ~10 nm) poseen energías cinéticas (*KE*) medibles según la expresión **II.1.3**, donde *h $\nu$*  es la energía del fotón, *BE* es la energía de enlace

del orbital atómico de donde se origina el electrón eyectado, y  $\phi_s$  la función trabajo del espectrómetro:

$$KE = h\nu - BE - \phi_s \quad (\text{II.1.3})$$

La energía de enlace ( $BE$ ) puede considerarse como la diferencia de energía entre los estados inicial y final, luego de que el fotoelectrón deja el átomo. Dado que hay una amplia variedad de estados finales posibles de los iones de cada tipo de átomo, hay una variedad correspondiente de energías cinéticas de electrones emitidos. Adicionalmente existe una probabilidad diferente o sección transversal para cada estado final. En este sentido, los niveles de orbitales atómicos: p, d y f, llevarán a cabo desdoblamientos luego de la ionización, dando lugar a vacancias en  $p_{1/2}$ ,  $p_{3/2}$ ,  $d_{3/2}$ ,  $d_{5/2}$ ,  $f_{5/2}$  y  $f_{7/2}$ . Por ende, las relaciones de desdoblamiento spin-orbita son 1:2 para niveles p, 2:3 para niveles d y 3:4 para niveles f, las cuales estarán contempladas en el análisis de la línea atómica que se desee estudiar.

Dado que cada elemento tiene un único conjunto de energías cinéticas, XPS puede utilizarse para identificar y determinar la concentración de los elementos en la superficie. Las variaciones en las energías de enlace de cada elemento (desplazamientos químicos) provienen de diferencias en el potencial químico y la polarizabilidad de los compuestos. Estos desplazamientos químicos pueden ser utilizados para identificar el estado químico de los materiales bajo análisis. El proceso de emisión de electrones, normalmente da lugar a dos procesos de emisión que ocurren en simultáneo, un fotoelectrón y un electrón Auger. La emisión Auger ocurre  $10^{-14}$  s después de la emisión del fotoelectrón y corresponde a procesos de relajación en donde un electrón de orbitales externos decae hacia una vacancia generada en un orbital interno, emitiendo un segundo electrón en simultáneo (liberación de energía en exceso). Si bien el camino libre medio de los fotones es del orden de micras, el de los electrones eyectados es del orden de decenas de angstroms, por lo que sólo los electrones que se originan dentro de este rango de distancias por debajo de la superficie del sólido, pueden dejar la superficie sin pérdida de energía y generar los picos espectrales de utilidad. Los electrones que atraviesan procesos de pérdida inelástica antes de emerger, forman parte del *background* o línea de base, mientras que los electrones que dejan la muestra, son detectados por un espectrómetro de electrones acorde a su energía cinética.

XPS permite entonces, la determinación directa de las concentraciones relativas de varios constituyentes por medio de aproximaciones realizadas considerando el área de pico de las señales

elementales.<sup>58</sup> Para una muestra homogénea en el volumen analizado, el número de fotoelectrones por segundo en un pico espectral específico, está dado por la ecuación **II.1.4**:

$$I = nf\sigma\theta y\lambda AT \quad (\text{II.1.4})$$

Donde  $n$  es el número de átomos del elemento por  $\text{cm}^3$  de muestra,  $f$  es el flujo de rayos X en fotones/ $\text{cm}^2\text{s}$ ,  $\sigma$  es la sección transversal fotoeléctrica para el orbital atómico de interés en  $\text{cm}^2$ ,  $\theta$  es el factor de eficiencia angular para el arreglo instrumental basado en el ángulo entre el camino del fotón incidente y el electrón detectado,  $y$  es la eficiencia del efecto fotoeléctrico,  $\lambda$  es el camino libre medio de los fotoelectrones en la muestra,  $A$  el área de la muestra de la cual los fotoelectrones son detectados, y  $T$  es la eficiencia de detección de los fotoelectrones emitidos desde la muestra. Desde la ecuación **II.1.4**, surge la expresión **II.1.5**:

$$n = \frac{I}{f\sigma\theta y\lambda AT} \quad (\text{II.1.5})$$

El denominador de esta última expresión puede definirse como factor de sensibilidad,  $S$ , y si consideramos una línea intensa para dos elementos, entonces:

$$\frac{n_1}{n_2} = \frac{\frac{I_1}{S_1}}{\frac{I_2}{S_2}} \quad (\text{II.1.6})$$

La expresión **II.1.6** puede utilizarse para todas las muestras homogéneas si la relación  $S_1/S_2$  es independiente de la matriz para todos los materiales. Las cantidades  $\sigma$  y  $\lambda$  pueden variar de material a material, pero las relaciones  $\sigma_1/\sigma_2$  y  $\lambda_1/\lambda_2$  se mantienen constantes. Para cualquier espectrómetro, es posible desarrollar una serie de valores relativos de  $S$  para todos los elementos, y de esta manera es posible efectuar una cuantificación elemental relativa de las especies localizadas en la superficie de los materiales.<sup>39</sup>

### **Difracción de rayos X (XRD)**

XRD es un método ampliamente eficaz y robusto para el estudio de nanomateriales (con configuraciones estructurales de al menos una dimensión, en el rango de 1-100 nm) dada la vasta información que es posible extraer del ancho y la forma de las reflexiones, acerca de la subestructura de los materiales; como, por ejemplo, tamaños de microcristales, micro distorsiones de una red, dislocación de estructuras, etc. La precisión de esta técnica en cuanto a mediciones de

espaciamiento atómico, le confiere la capacidad de realizar determinaciones cuantitativas acerca de los arreglos atómicos en las interfaces y estados de tensión en films delgados.

Al igual que en XPS, la técnica de difracción de rayos X (en nuestro caso, específicamente de polvo, *P-XRD*), requiere únicamente el apropiado secado y pulverización homogénea de la muestra que deberá contar con superficies suaves y por lo general, con cristales distribuidos de manera aleatoria. La muestra es situada en un soporte bajo presión con el fin de obtener una superficie lisa y plana. Tal como se describe en la **Figura II.1.7B**, la configuración del arreglo instrumental típico consiste en una fuente de rayos X (cuya irradiación empleada usualmente es de 1.54 Å, Cu K $\alpha$ ), un receptáculo del espécimen, la óptica de recepción y el detector de rayos X. La fuente y el detector con su óptica asociada, se ubican en la circunferencia del círculo de enfoque, y el receptáculo de la muestra, en el centro del círculo. El análisis del patrón de XRD, se basa en la ley de Bragg, tal como está definido en la ecuación **II.1.7**, donde  $\lambda$  es la longitud de onda del haz de rayos X reflejado,  $d$  el espaciamiento entre planos atómicos, y  $n$  y  $\theta$ , el orden y el ángulo de difracción respectivamente.

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad (\text{II.1.7})$$

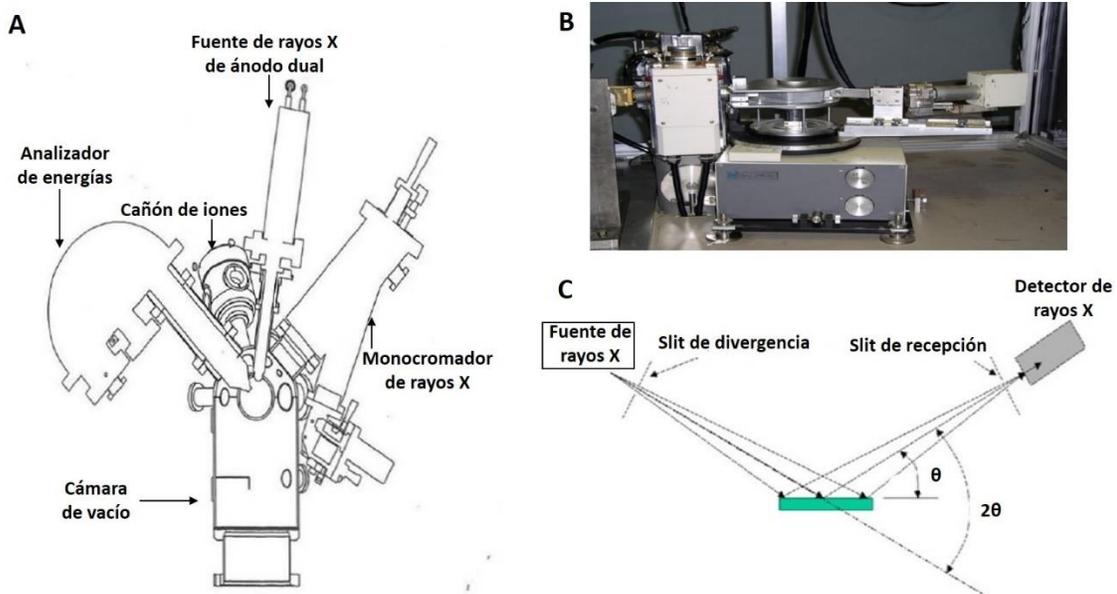
El ángulo entre la radiación incidente y el plano de difracción, es  $\theta$  (ángulo de Bragg), y el ángulo entre los haces transmitidos y difractados, es  $2\theta$  (**Figura II.1.7C**). Cuando el haz incide en la muestra, los rayos X son dispersados por cada átomo de una manera diferente. Si los haces dispersados se encuentran en fase, interfieren constructivamente y se obtiene un máximo de intensidad (pico) para el ángulo en particular. Los planos atómicos desde los cuales los rayos X resultan dispersados, se conocen como *planos de reflexión* y se denotan bajo sus respectivos índices de Miller.<sup>59</sup>

El ensanchamiento de líneas, puede emplearse como medida de tamaño promedio de los cristales bajo la ecuación de Debye Scherrer<sup>60</sup> (**II.1.8**):

$$D_v = \frac{K \lambda}{\beta \cos \theta} \quad (\text{II.1.8})$$

En esta expresión,  $D_v$  es el tamaño promedio de la partícula,  $\lambda$  es la longitud de onda de radiación,  $\beta$  el FWHM (ancho de banda a media altura del máximo) del pico de reflexión analizado, y  $K$ , la constante de Sherrer. Esta constante tiene en cuenta la forma de la partícula y usualmente adquiere un valor de  $\sim 0.9$ . Si bien los tamaños obtenidos a través de esta fórmula permiten conocer el tamaño promedio de las partículas del material, la misma tiene ciertas limitaciones que es necesario tener en cuenta. El valor de la constante puede cambiar de acuerdo a la forma de la

partícula. No tiene en cuenta la existencia de una distribución de tamaños ni la presencia de defectos en la red cristalina, de manera que el cálculo de diámetros de grano a partir de la FWHM, puede sobreestimar el valor del diámetro real. Además, la presencia de defectos en una cantidad significativa puede derivar en un alargamiento adicional de la línea de difracción. Estas limitaciones pueden solucionarse, respaldando las mediciones de XRD con otras técnicas para la determinación del diámetro de partículas como TEM.

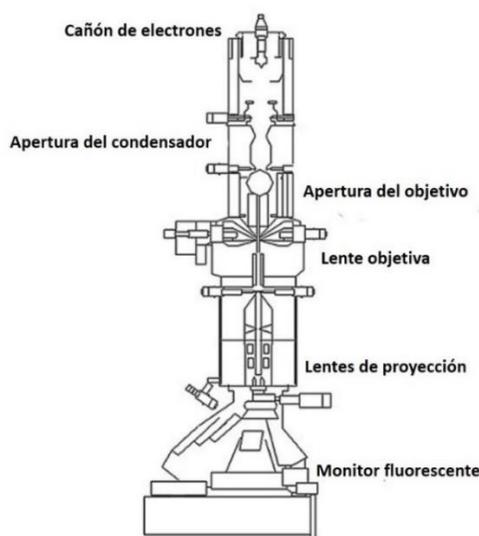


**Figura II.1.7.** A- Diagrama esquemático de un espectrofotómetro de XPS. Adaptado de Moulder, J. F., Stickle, W. F., Sobol, P. E., Bomben, K. D. *Handbook of X-Ray Photoelectron Spectroscopy*; Sobol, P. E., Chastain, J., Eds.; Perkin Elmer Corporation, 1993. B- Difractómetro de rayos X con generador de rayos X de ánodo rotatorio. C- Configuración básica del instrumento de XRD. Adaptados de Sharma, R.; Bisen, D. P.; Shukla, U.; Sharma, B. G. *X-Ray Diffraction : A Powerful Method of Characterizing Nanomaterials*. Recent Res. Sci. Technol. 2012, 4 (8), 77–79.

• **Determinación de la morfología y el diámetro de nanopartículas: Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)**

La información estructural a escala nanométrica, es fundamental para la correlación estructura-propiedad y el desarrollo de investigación básica y aplicada en nanomateriales. La microscopía de

transmisión electrónica (TEM) ha sido por años una de las herramientas más empleadas para los estudios estructurales. Además de información en cuanto distribución de tamaños en nanopartículas, esta técnica aporta información relevante en torno a morfología, número y composición de fases, defectos cristalográficos, etc. La preparación de muestras requiere usualmente la suspensión de un volumen del espécimen (en su solvente de dispersión) sobre grillas de Cu recubiertas con film de C o Formvar. La muestra en cuestión es depositada en una cámara de vacío donde es irradiada por un flujo de electrones generados por un cañón de electrones con energías próximas a los ~120 kV. Este haz es focalizado por medio de aperturas metálicas y lentes electromagnéticas en la columna del TEM. Luego de ser aplicados sobre el espécimen, los electrones son retransmitidos y magnificados por un sistema de lentes electromagnéticas para luego proyectarse sobre una pantalla de fósforo y convertir la información de imagen electrónica, en una forma visible (**Figura II.1.8**).<sup>61</sup>



**Figura II.1.8.** Diagrama esquemático de un microscopio de transmisión electrónica. Adaptado de Tang, C. Y.; Yang, Z. *Transmission Electron Microscopy (TEM)*; Elsevier B.V., 2017.

- **Análisis de propiedades magnéticas: magnetómetro de muestra vibrante (VSM)**

Tal como se detalló en la sección **II.1.1**, la determinación de las propiedades magnéticas de las MNPs es fundamental para el diseño adecuado de los sistemas que utilizan estas nanopartículas y para establecer una relación estructura-propiedad acorde a la respuesta observada. Existe una gran

variedad de técnicas disponibles para medir propiedades magnéticas, las cuales han sido desarrolladas teniendo en cuenta fundamentalmente las ventanas de tiempo adecuadas dentro de las cuales la física de estos sistemas responde según las condiciones de contorno previamente mencionadas. Según lo descrito, las fluctuaciones térmicas son las responsables de promover la inversión en la dirección de la magnetización (rotación), en ausencia de histéresis en materiales superparamagnéticos. Esta dependencia de los tiempos de relajación de los momentos magnéticos en una partícula ( $\tau$ ) con la temperatura, está dada por la expresión de Néel-Brown según la expresión **II.1.9**, donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann y  $\tau_0 \approx 10^{-9}$ s.

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{K_{eff}V}{k_B T}\right) \quad (\text{II.1.9})$$

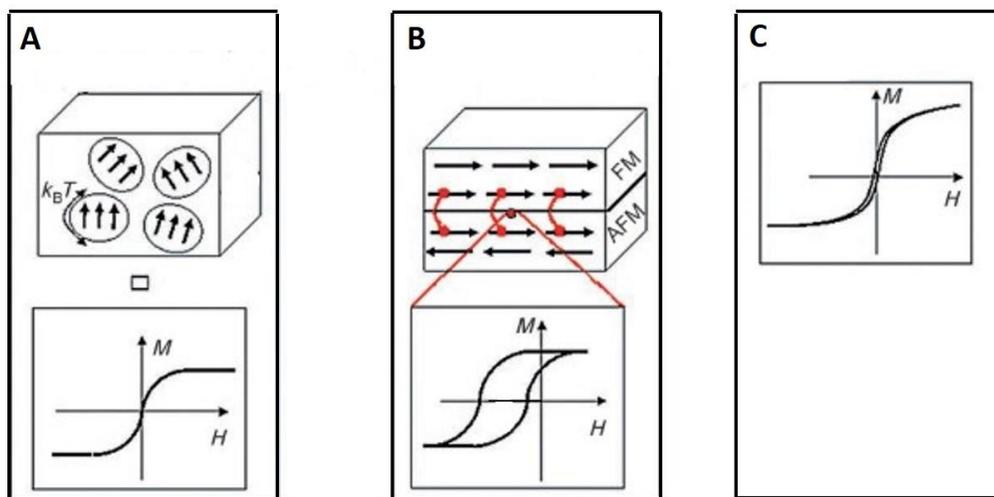
Si el momento magnético de la partícula se invierte a tiempos más cortos que los tiempos experimentales, el sistema se encuentra en un estado *superparamagnético*, mientras que si el tiempo de inversión de spin es más largo, el mismo se define dentro del estado bloqueado. Nuevamente, como se describió en **1.1**, la temperatura de bloqueo ( $T_B$ ) es el parámetro que separa ambos regímenes y puede ser calculada considerando la ventana de tiempo de la medición. Así por ejemplo, mediciones de magnetometría realizadas en un tiempo aproximado de 100s, permiten aproximar  $T_B$  a  $\frac{K_{eff}V}{30k_B}$ .<sup>23</sup>

El magnetómetro de muestra vibrante (VSM) es una de las metodologías más empleadas para realizar este tipo de análisis. La muestra es sometida a un campo magnético externo uniforme, el cual induce magnetización en la muestra. Posteriormente, se inducen vibraciones sinusoidales por medio de un piezoeléctrico, lo cual introduce perturbaciones en el campo externo que son medidas por medio de un set de bobinas (sensores). El flujo magnético que llega a las bobinas, es transformado a una FEM (fuerza electromotriz), y dependiendo de la geometría de estas bobinas, la FEM puede variar según: amplitud y frecuencia de vibración, campo magnético externo y magnetización de la muestra. Por último, los valores de magnetización son deducidos de la FEM obtenida, y es posible registrar la curva de histéresis realizando un barrido de campos magnéticos externos.

Si todas las partículas están en estado superparamagnético, los momentos magnéticos de cada partícula deberán apuntar en direcciones arbitrarias, y la curva de magnetización del ensamblaje de nanopartículas estará dado por la ecuación de Langevin<sup>21</sup> (**II.1.10**):

$$M_H = N\mu L\left(\frac{\mu H}{k_B T}\right) \quad (\text{II.1.10})$$

Donde  $M_H$  es la magnetización del ensamblaje a lo largo de la dirección del campo magnético aplicado  $H$ ,  $N$  es el número de partículas magnéticas por unidad de volumen,  $T$  es la temperatura absoluta y  $k_b$ , la constante de Boltzmann. Las curvas de magnetización para partículas superparamagnéticas, en función de  $H/T$  medidas a diferentes temperaturas, deberían superponerse hasta la saturación. Adicionalmente, si todas las partículas se encuentran en estado superparamagnético, no debería observarse histéresis y tanto la remanencia como el campo coercitivo ( $H_C$ ) deberían ser cero (**Figura II.1.9**). Por otra parte, si todas las partículas no se encuentran en un equilibrio térmico completo con el campo aplicado durante el tiempo que requiere la medición, se visualiza el bucle distintivo de la histéresis.<sup>21</sup>



**Figura II.1.9.** Diferentes efectos magnéticos que tienen lugar en las MNPs. **A-** Arreglo de momentos magnéticos en un material superparamagnético. Ensamblaje de momentos magnéticos gigantes que no interactúan entre sí, y fluctúan cuando la energía térmica  $k_B T$  es mayor que la energía de anisotropía. La curva de magnetización muestra ausencia de histéresis sin remanencia ni campo coercitivo. **B-** Material ferromagnético (FM) con impurezas de material anti ferromagnético (AFM). Se observa bucle de histéresis, la cual se desplaza a lo largo del eje de campo y la coercitividad incrementa sustancialmente. **C-** Nanopartículas anti ferromagnéticas pueden exhibir una magnetización débil con bajo grado de histéresis. Adaptado de Lu, A. H.; Salabas, E. L.; Schüth, F. *Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application*. Angew. Chemie - Int. Ed. 2007, 46 (8), 1222–1244.

## II.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Como punto de partida, se propuso llevar a cabo la puesta a punto de rutas sintéticas para la obtención de nanopartículas de plata funcionalizadas con ácido oleico (AgNP-OA), y nanopartículas magnéticas recubiertas por el mismo ligando (MNP-OA), de manera controlada y reproducible.

En conjunto con ello, se apuntó de manera continua al desarrollo de procedimientos de purificación efectivos de las nanopartículas sintetizadas con el fin de lograr el grado de funcionalización y dispersión en solventes adecuados.

Seguidamente, y en concordancia con el marco introductorio descrito en **II.1.3**, se emplearon diversas técnicas de caracterización con el fin de obtener información precisa acerca de la estructura, morfología y propiedades fisicoquímicas (entre otras) de las AgNP-OA y MNP-OA que serán enfrentadas a los diferentes modelos de biomembrana o sistemas transportadores durante los ensayos diagramados en esta tesis.

Como se explicó anteriormente, tanto el diseño de metodologías de síntesis y purificación reproducibles como una caracterización completa y detallada de los sistemas de nanopartículas fabricados, son esenciales para establecer relaciones estructura-propiedad que permitan luego el entendimiento de las respuestas observadas durante la interacción nanopartícula-biomolécula.

## II.3- MATERIALES Y MÉTODOS

### II.3.1- Síntesis y purificación de nanopartículas hidrofóbicas

Las nanopartículas utilizadas para estudios de interacción con diferentes modelos de biomembranas o sistemas transportadores durante esta tesis, se componen de un núcleo inorgánico (*core*) de plata ( $\text{Ag}^0$ ) o magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), según corresponda, y un recubrimiento de capa única (monocapa) de ácido oleico (OA). Los ligandos OA se unen al núcleo metálico o magnético por quimisorción a través de los grupos carboxilato ( $\text{COO}^-$ ), disponiendo sus cadenas hidrocarbonadas hacia la parte externa; esto les confiere a las NPs sus características hidrofóbicas. El equipo de síntesis consistió en un balón de reacción de dos bocas; por una de ellas se introdujo un burbujeador

para el ingreso de  $N_2$  y se conectó la salida remanente a un tubo refrigerante con oliva y trampa de  $CaCl_2$ . En los siguientes apartados, se describen las metodologías empleadas para la síntesis de estas nanopartículas (**Figura II.3.10**), las cuales fueron adaptadas de trabajos de investigación reportados en la literatura.

- **Nanopartículas de plata funcionalizadas con ácido oleico (AgNP-OA)**

La síntesis de AgNP-OA se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Wang et. al.<sup>62</sup> Las NPs fueron preparadas por reducción térmica de trifluoroacetato de plata ( $CF_3COO^-Ag^+$ ) en éter isoamílico ( $C_{10}H_{22}O$ ) en presencia de ácido oleico. Brevemente, en el balón de reacción se añadieron 0,04 g (0,18 mmol) de trifluoroacetato de plata, junto con 3 mL de éter isoamílico. Posteriormente, se comenzó el calentamiento bajo agitación constante y burbujeo de  $N_2$ , hasta alcanzar una temperatura de 160 °C, momento en el cual tiene lugar la formación de núcleos estables de plata. Una vez alcanzada esta temperatura, se adicionaron 230  $\mu$ L de ácido oleico (0,72 mmol) y se continuó la reacción durante 30 minutos a temperatura constante. La mezcla final se dejó enfriar a temperatura ambiente, bajo atmósfera de nitrógeno y refrigeración continua. A continuación, el producto obtenido durante la síntesis, se trasvasó a un beaker y se añadieron 4 mL de etanol absoluto. Luego de un tiempo de decantación de 1 h, se logró la precipitación completa de las NPs en el medio etanólico.

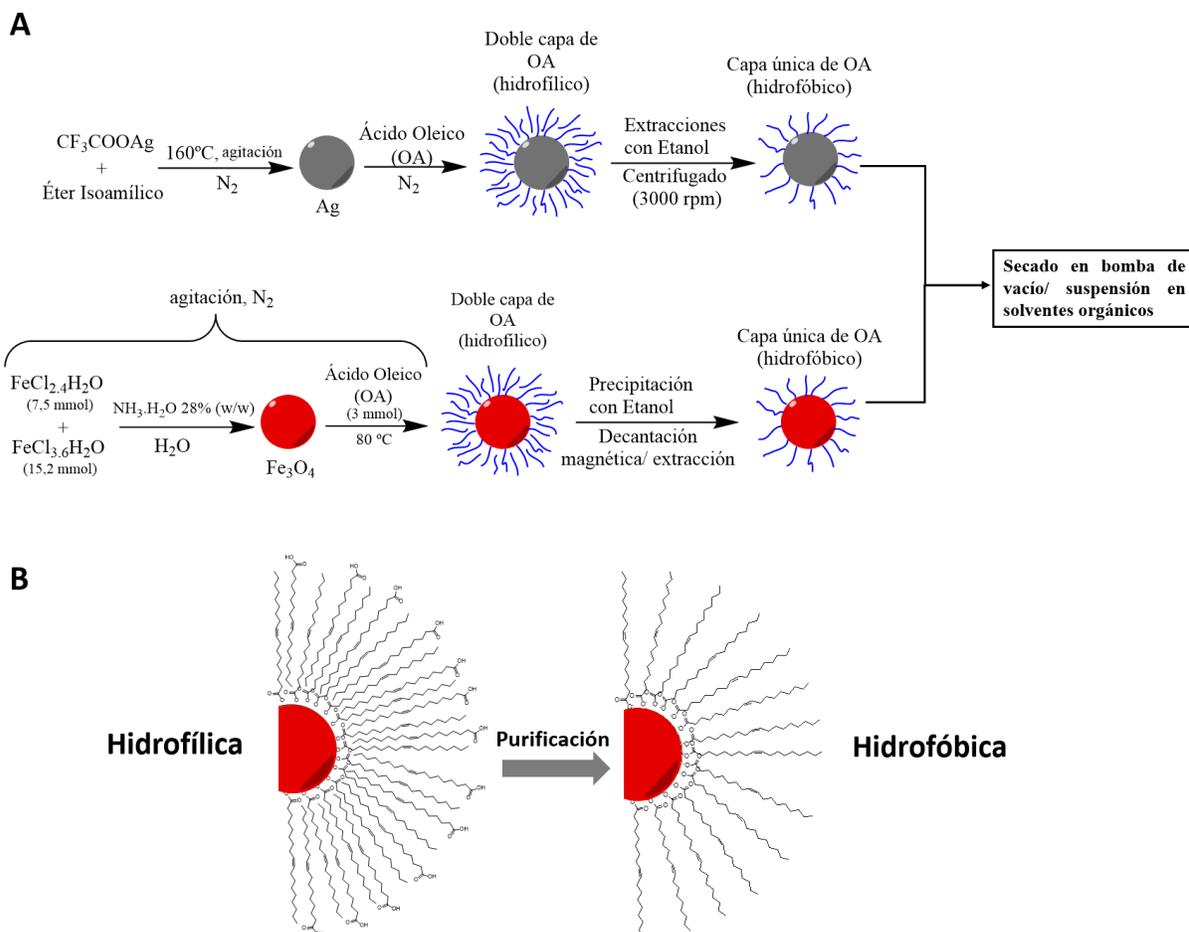
Seguidamente se realizó la purificación de las AgNP-OA con el objetivo de eliminar ácido oleico libre y la segunda capa de OA con la cual las nanopartículas son inicialmente obtenidas (**Figura II.3.10B**). Este proceso les permite adoptar una funcionalización final con una única monocapa densa del ligando lipídico y su posterior dispersión en solvente orgánico (AgNP-OA hidrofóbicas). Con este propósito, se extrajo el sobrenadante etanólico con una pipeta Pasteur y se añadió otra fracción de etanol a las nanopartículas. La mezcla resultante, se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min para favorecer la separación de fases y de esta manera, extraer fase etanólica con sucesivas fracciones de OA remanentes que permanecieron sin reaccionar. De esta manera, se llevaron a cabo un total de cuatro ciclos de extracción en etanol y finalizado el proceso, se procedió al secado de las AgNP-OA por evaporación de solvente con una bomba de vacío. Las AgNP-OA obtenidas fueron suspendidas en *n*-hexano, solvente en el cual produjeron dispersiones de una coloración marrón claro.

- **Nanopartículas magnéticas funcionalizadas con ácido oleico (MNP-OA)**

Las MNPs-OA fueron preparadas mediante el método de co-precipitación descrito por Peng et al.<sup>63</sup> En un balón de dos bocas se colocaron 1,5 g (7,5 mmol) de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 4,1 g (15,2 mmol) de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 120 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  y un agitador magnético. La mezcla se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente hasta la disolución completa de todos sus componentes bajo atmósfera de  $\text{N}_2$ . Una vez obtenida la solución homogénea, se agregaron 20 mL de  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  28% (w/w) con lo cual la coloración de la mezcla cambió de naranja a negro, en simultáneo con la aparición un de precipitado negro. Seguidamente, se incorporó 1 mL de OA (3 mmol) y se llevó la mezcla de reacción a  $80^\circ\text{C}$  bajo agitación constante durante una hora. Una vez cumplido este tiempo, la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente bajo corriente de nitrógeno.

Para la decantación subsiguiente, volúmenes de 10-20 mL del crudo de reacción se trasvasaron a diferentes cristalizadores y se agregó un volumen equivalente de etanol a cada uno de ellos, con el fin de precipitar las nanopartículas. Dicha separación fue favorecida por medio de la colocación de imanes convencionales en la parte inferior de los recipientes, lo cual contribuye a acelerar el proceso de decantación. Seguidamente, se efectuó el procedimiento de purificación con el mismo objetivo que en el caso de las AgNP-OA, realizando cuatro ciclos sucesivos de decantación magnética/extracción de las mezclas de MNP-OA obtenidas. Finalmente, se evaporó el etanol excedente haciendo uso de una bomba de vacío.

El sólido resultante fue suspendido en solvente orgánico (*n*-hexano o THF dependiendo de su futuro uso), medios en los cuales las NPs se mantienen bien dispersadas.



**Figura II.3.10. A-** Metodologías implementadas para la síntesis de nanopartículas hidrofóbicas. Ruta superior (NPs en gris), AgNPs-OA. Ruta inferior (NPs en rojo), MNPs-OA. **B-** Modificación de las características de superficie de las NPs durante el proceso de purificación. Durante este paso, la doble capa de OA que estabiliza inicialmente a las nanopartículas (hidrofilicas) es eliminada, dejando una monocapa lipídica hidrofóbica como cobertura final.

### III.3.2- Caracterización

- **Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)**

La caracterización de nanopartículas por TEM se realizó empleando un microscopio electrónico Jeol 1200 EX II operado a 80 kV; las grillas empleadas fueron provistas por EMS (cobre recubierto con un film de carbono, 400 mesh). Se prepararon soluciones de ~1 mg/mL en *n*-hexano de los

diferentes batch de NPs sintetizados y se sembraron 10  $\mu\text{L}$  de cada dispersión en grillas de cobre. Los diámetros se calcularon empleando el software Image J, y el número de partículas contabilizadas en cada imagen varió entre  $\sim 1000$  y 3000 partículas. El índice de polidispersidad (PDI) se calculó a partir de los datos de TEM por medio de la **Ecuación II.1.11**, donde  $\sigma$  es la desviación estándar y  $D_{\text{Avg}}$  es el diámetro, ambos considerando los valores promediados del total de imágenes analizadas.

$$PDI = \left( \frac{\sigma}{D_{\text{Avg}}} \right)^2 \quad (\text{II.1.11})$$

- **Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR)**

Se adquirieron espectros de infrarrojo de las nanopartículas utilizando un microscopio infrarrojo Thermo Scientific Nicolet iN10 operando entre 500 y 4000  $\text{cm}^{-1}$  con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

*Preparación de Pastillas (Pellets):* Se pesaron aproximadamente 3 mg de muestra (AgNP-OA y/o MNP-OA) y 150 mg de KBr. Las muestras se molieron y mezclaron con KBr hasta obtener un polvo fino y homogéneo. Por último, se las sometió a presión para obtener una pastilla. El espectro IR de OA se midió depositando una gota de OA en una pastilla de AgBr.

- **Difracción de rayos X de polvo (p-XRD)**

El patrón de difracción de nanopartículas secas (polvo), se obtuvo con un equipo Philips PAN analytical X'pert utilizando un haz de radiación de Cu  $K\alpha$  ( $\lambda=0.15406$  nm) operado a un voltaje de 40 kV y una corriente de 30 mA, en el rango de 20-80° (2 $\theta$ ).

- **Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)**

Se analizaron las composiciones químicas de la superficie de las NPs por medio de XPS. Los espectros fueron recolectados empleando un equipo Thermo Fisher Scientific modelo K-alpha+, empleando un monocromador de Al  $K\alpha$  a 140W. La información obtenida, se analizó empleando el software Advantage Surface Chemical Analysis versión 5.9912 y los ajustes se obtuvieron

empleando un modelo Gaussiana-30% Lorenziana y una línea de base Shirley. Las posiciones de los picos fueron referenciadas internamente al pico de C 1s a 284.8 eV.

- **Espectroscopía UV-Visible**

Para corroborar la estabilidad de las AgNPs-OA en solución de *n*-hexano a lo largo del tiempo, se realizaron controles mediante espectrofotometría UV-Visible haciendo uso de un equipo Shimadzu MultiSpec-1501. Se prepararon soluciones de aproximadamente 1 mg/mL de AgNPs-OA en *n*-hexano, y se estudió la señal del plasmón superficial a lo largo de un (1) mes.

- **Análisis termogravimétrico (TGA)**

El comportamiento térmico se evaluó empleando un equipo Shimadzu DTG Simultaneous Thermogravimetric and Differential Thermal Analyzer. El programa de temperatura empleado fue una rampa con una pendiente de 10°C/min con temperatura inicial de 30°C y final de 800°C, con atmósfera de nitrógeno a un flujo de 75 mL/min.

- **Análisis de magnetometría (Magnetómetro de muestra vibrante- VSM)**

La caracterización magnética de las nanopartículas se realizó por medio de un Magnetómetro de Muestra Vibrante (VSM) Lakeshore 7300. El ciclo se midió a temperatura ambiente con campos aplicados entre 13 y -13 kOe.

## **II.4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **II.4.1- Obtención de nanopartículas hidrofóbicas y estudio de sus propiedades fisicoquímicas**

En el caso de las AgNP-OA, la reacción térmica para la obtención de las nanopartículas mostró ser dependiente de varios factores tales como el grado de hidratación del ácido oleico empleado como agente de funcionalización de las nanopartículas y los tiempos de calentamiento antes y

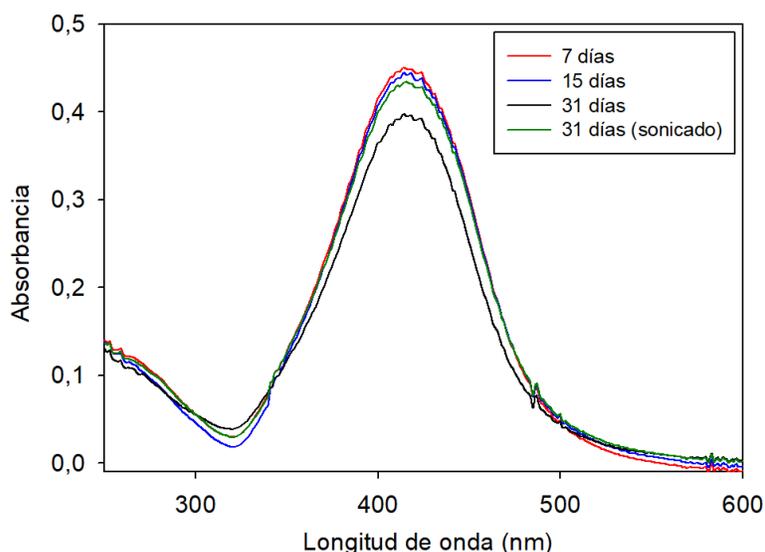
después de la incorporación del OA. La utilización de un OA hidratado en esta síntesis, conduce a la aglomeración de las nanopartículas en el medio de reacción y posteriormente a un bajo grado de dispersión post-precipitación.

Por otra parte, durante el transcurso de ambas rutas sintéticas (AgNP-OA y MNP-OA), el tiempo de nucleación previo al agregado del ligando resultó determinante en la reproducibilidad de la obtención de las nanopartículas; especialmente en el caso de las AgNPs-OA donde la nucleación transcurre dentro de una rampa de temperaturas crecientes. Un tiempo de nucleación de ~1 h fue permitido en ambos casos. De manera subsiguiente, el OA fue agregado lentamente para favorecer un mezclado homogéneo y la estabilización adecuada de las NPs en presencia del surfactante.

Mientras que la purificación de AgNP-OA se llevó a cabo mediante separación de fases facilitada por centrifugación, las ventajas en cuanto a la separación magnética que las MNPs-OA brindan, les confieren una capacidad de purificación simplificada empleando solamente imanes convencionales. Así los tiempos de decantación de las MNPs-OA son substancialmente reducidos, mejorando la purificación ya que todo el OA libre queda más fácilmente desplazado en la fase etanólica. Las AgNP-OA y las MNP-OA mostraron ser estables tanto en sequedad (polvo liofilizado), como en soluciones en diferentes solventes orgánicos (preferentemente, *n*-hexano) almacenadas a 4 °C.

La absorbancia relacionada con la resonancia del plasmón superficial en las AgNP-OA fue utilizada como parámetro para determinar estabilidad y grado de dispersión en estas nanopartículas.

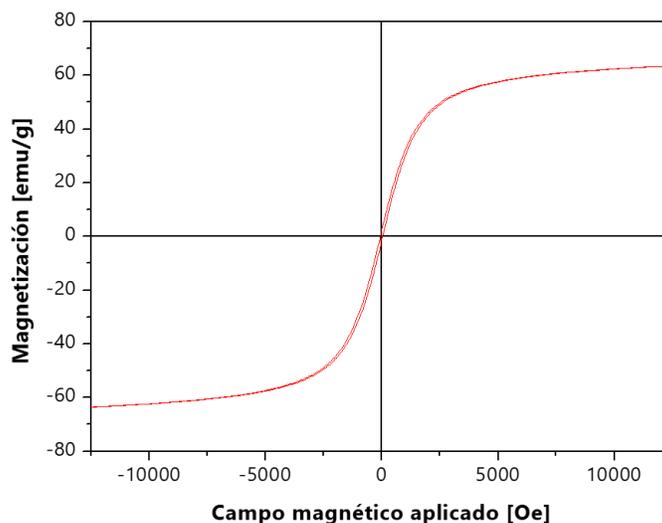
Como se observa en la **Figura II.4.11**, la longitud de onda a la cual se produce la absorción del plasmón de las AgNPs-OA se encuentra entre los 412-414 nm, acorde a lo informado en trabajos previos para nanopartículas de este tamaño.<sup>19,64</sup> Los espectros mostraron que las dispersiones de AgNP-OA son completamente estables hasta los 15 días, luego de lo cual la absorbancia decae (aproximadamente en un 10%) probablemente debido a la precipitación de las nanopartículas. Sin embargo, luego de un ciclo de sonicado, el valor original de absorbancia es recuperado. También es posible observar que la forma del plasmón se ve preservada, indicando la ausencia de agregación o coalescencia de las AgNP-OA.



**Figura II.4.11.** Espectros UV-Visible de las AgNP-OA dispersadas en *n*-hexano a distintos tiempos.

La respuesta inmediata de las MNPs-OA al campo impartido por imanes convencionales y su desmagnetización al extraer el mismo, tanto en estado sólido como en dispersiones en solvente orgánico, nos permitió deducir que las nanopartículas sintetizadas presentaban propiedades características de los materiales ferromagnéticos, esto es, al menos un determinado grado de paramagnetismo. Sin embargo, a los fines de definir si las nanopartículas en cuestión, se comportan como superparamagnetos, se llevó a cabo el análisis de magnetometría, empleando un magnetómetro de muestra vibrante (VSM).

Como se denota en la **Figura II.4.12**, no se observó histéresis alguna durante el ciclo de magnetometría efectuado sobre la muestra, lo cual sugiere que las partículas sintetizadas son superparamagnéticas con un valor de magnetización de saturación ( $M_s$ ) de  $63,4 \text{ emu g}^{-1}$ . Este valor concuerda con los valores reportados en bibliografía para este tipo de nanopartículas.<sup>46</sup> MNPs sin ninguna funcionalización poseen valores de  $M_s$  más altos que rondan los  $81,4 \text{ emu g}^{-1}$ , la subsecuente estabilización con una capa de ligandos diamagnéticos (OA) produce una disminución de este valor por un fenómeno de “quenching” del momento magnético.<sup>44</sup>



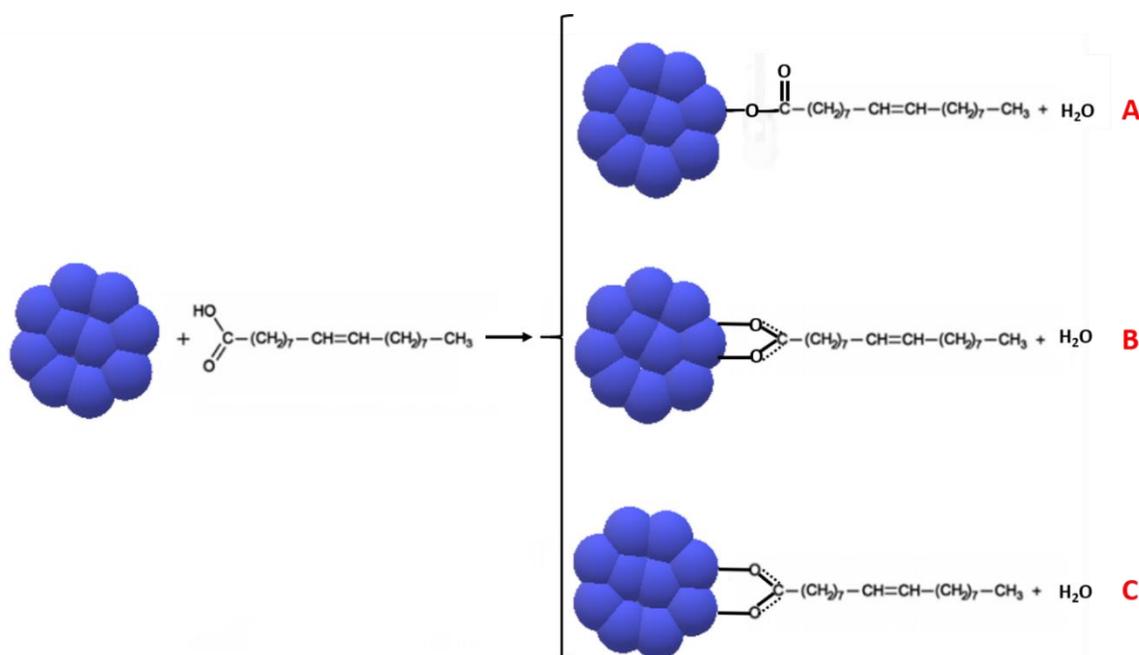
**Figura II.4.12.** Curva de magnetización de las MNP-OA. La curva corresponde al ciclo de magnetización/ desmagnetización realizado, el cual transcurrió en ausencia de histéresis, sin remanencia ni campo coercitivo.

#### II.4.2- Caracterización estructural de las nanopartículas hidrofóbicas

La espectroscopía infrarroja (FT-IR), nos permitió dilucidar primeramente el grado de purificación de las nanopartículas, por lo que esta técnica se precisó como análisis de rutina durante cada síntesis realizada. Si bien las nanopartículas tienen núcleos de diferente composición, el ligando que las estabiliza es el mismo, por lo que las bandas características correspondientes a la unión NP-ligando se conservan, con leves desplazamientos. En la **Figura II.4.14**, se observan los espectros de IR característicos de OA y las nanopartículas sintetizadas junto con las bandas de absorción detalladas para cada frecuencia. Como característica principal, fue posible confirmar la purificación efectiva de las nanopartículas (eliminación de OA libre o de la segunda capa, **Figura II.3.10B**) por desaparición de banda de estiramiento simétrico ( $\nu_s$ ) correspondiente al grupo carbonilo (C=O) del OA, centrada a  $\sim 1700 \text{ cm}^{-1}$  en contraste con la aparición de bandas características de quimisorción de los grupos carboxilato unidos al núcleo de las NPs. Las señales correspondientes al carboxilato quimisorbido mostraron desplazamientos característicos próximos a  $\sim 1560$ ,  $1520$ , y  $1410 \text{ cm}^{-1}$ .<sup>65</sup> Acorde a las observaciones realizadas por Deacon et. al.<sup>66</sup>, y en

concordancia con otros estudios sobre carboxilatos,<sup>46</sup> la interacción entre el grupo carboxilato y átomos metálicos, puede ser categorizada en tres estructuras distintas (**Figura II.4.13**):

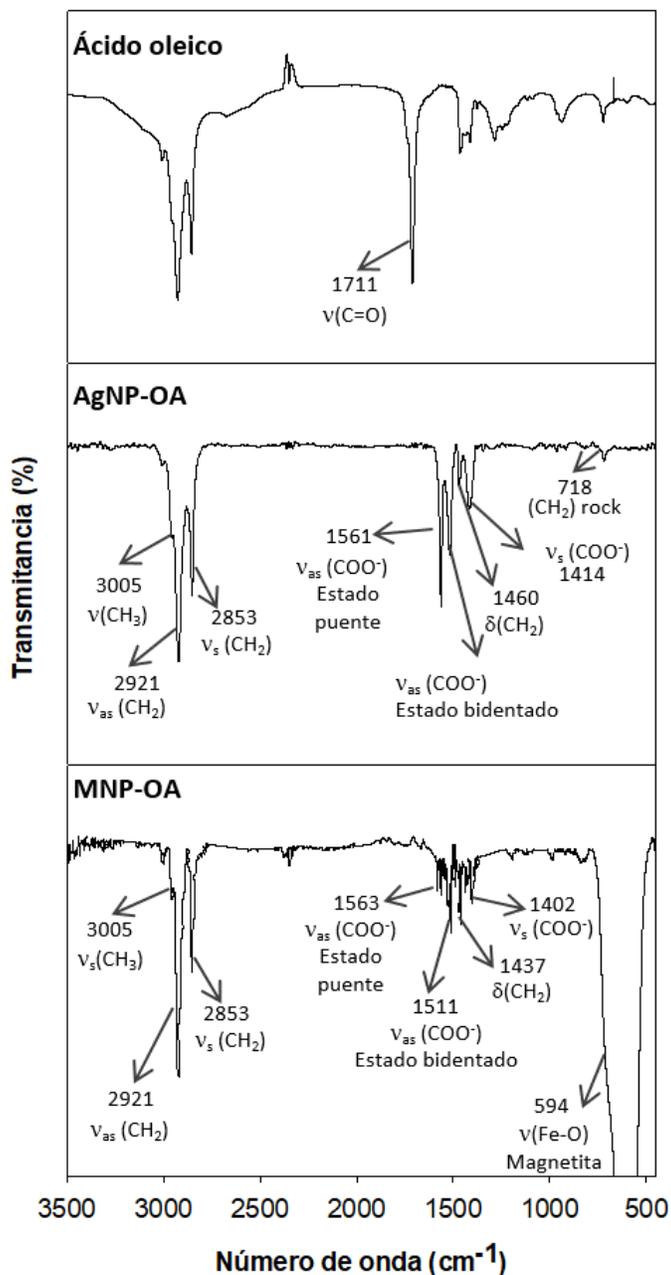
- Complejo monodentado: donde el metal se une con un único átomo de oxígeno del grupo carboxilato.
- Complejo bidentado: (quelando) donde un átomo del metal se une con dos átomos de oxígeno del carboxilato.
- Complejo tipo puente: donde cada átomo de oxígeno del carboxilato se une con un átomo de metal a través de un enlace monodentado.



**Figura II.4.13.** Modos de interacción entre los átomos del núcleo metálico y el grupo carboxilato del OA. **A-** Complejo monodentado. **B-** Complejo bidentado (quelando). **C-** Complejo tipo puente.

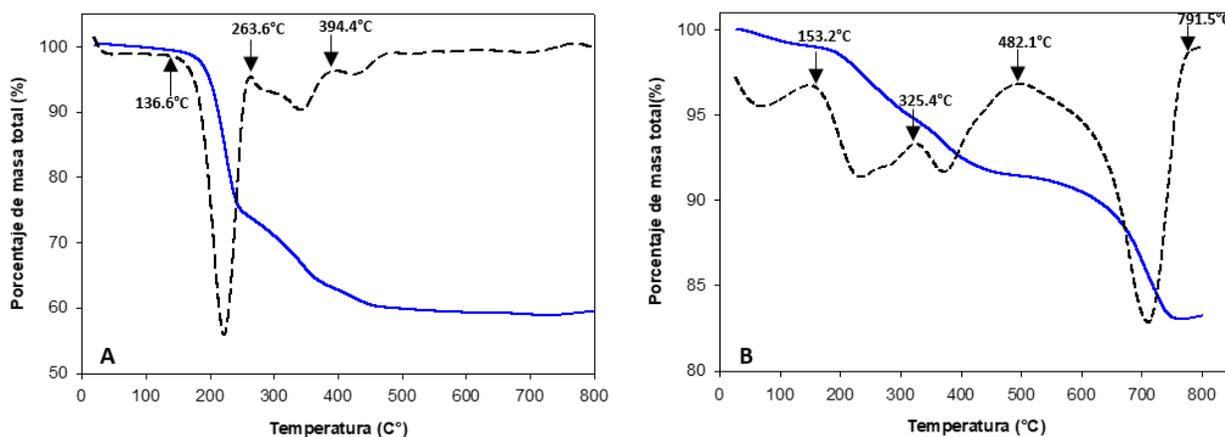
Considerando la relación empírica entre las frecuencias  $\nu_{as}$ , y  $\nu_s$  observadas se propone que un  $\Delta\nu = 200-300 \text{ cm}^{-1}$  se corresponde con la formación del complejo monodentado,  $\Delta\nu \approx 140-190 \text{ cm}^{-1}$  al complejo tipo puente, y  $\Delta\nu < 110 \text{ cm}^{-1}$  al complejo bidentado. En los espectros obtenidos para las AgNP-OA y MNP-OA, esta relación sugiere que el OA se encuentra unido a la superficie de las nanopartículas mediante una configuración de complejo bidentado y mediante estado puente. Estas configuraciones resultan en las uniones fuertes del OA a los núcleos de las NPs en donde además el ligando expone las cadenas hidrocarbonadas del OA hacia el exterior confiriéndole a las NPs

características hidrofóbicas. Las señales ubicadas a  $\sim 2921$ ,  $2853$ ,  $1440$  y  $718 \text{ cm}^{-1}$  pertenecen a los grupos  $-\text{CH}_2-$ , y la señal situada a  $\sim 3005 \text{ cm}^{-1}$  a los grupos  $-\text{CH}_3$  terminales de las cadenas hidrocarbonadas de OA. En el espectro FT-IR de las MNP-OA se destaca la señal correspondiente a la vibración Fe-O de la estructura de la magnetita, a  $\sim 594 \text{ cm}^{-1}$ , en concordancia con lo informado por la bibliografía.<sup>43</sup>



**Figura II.4.14.** Espectros FT-IR de las AgNP-OA y MNP-OA (discos de KBr) y ácido oleico (depositado sobre disco de AgBr).

El grado de cobertura de la superficie de las NPs por OA, fue estimado de manera teórica y medido experimentalmente. El análisis de termogravimetría permitió determinar el grado de funcionalización para ambas nanopartículas, en cuyos termogramas se observan diferentes pérdidas asociadas a la descomposición de OA en diferentes instancias. Experimentalmente también es posible deducir pérdidas debidas a oclusión de solvente o solvente de dispersión remanente en las muestras ensayadas. En particular, las AgNP-OA (**Figura II.4.15A**) resultan difíciles de obtener como polvo seco para efectuar estudios en sólido, sin embargo, la primera pérdida obtenida para estas nanopartículas en el intervalo entre 80-100°C asociada a solvente ocluido, representa una leve disminución casi imperceptible en el porcentaje de masa inicial. Seguidamente, entre los 136,6 y 263,6°C, comienza la degradación de los enlaces  $\text{COO}^- \text{Ag}^+$ , lo cual pospone la oxidación de las moléculas de OA.<sup>56</sup> Entre 263,6 y 394,4°C se experimentan sucesivos procesos de degradación de OA que finalizan alrededor de los 460°C, arrojando un porcentaje de pérdida de masa de ~19%, correspondiente a la cantidad total de ácido oleico en las AgNPs-OA. Valores equivalentes en masa para la cobertura de una monocapa de OA y etapas de degradación similares en nanopartículas del mismo tamaño, han sido reportados por otros autores.<sup>46</sup>



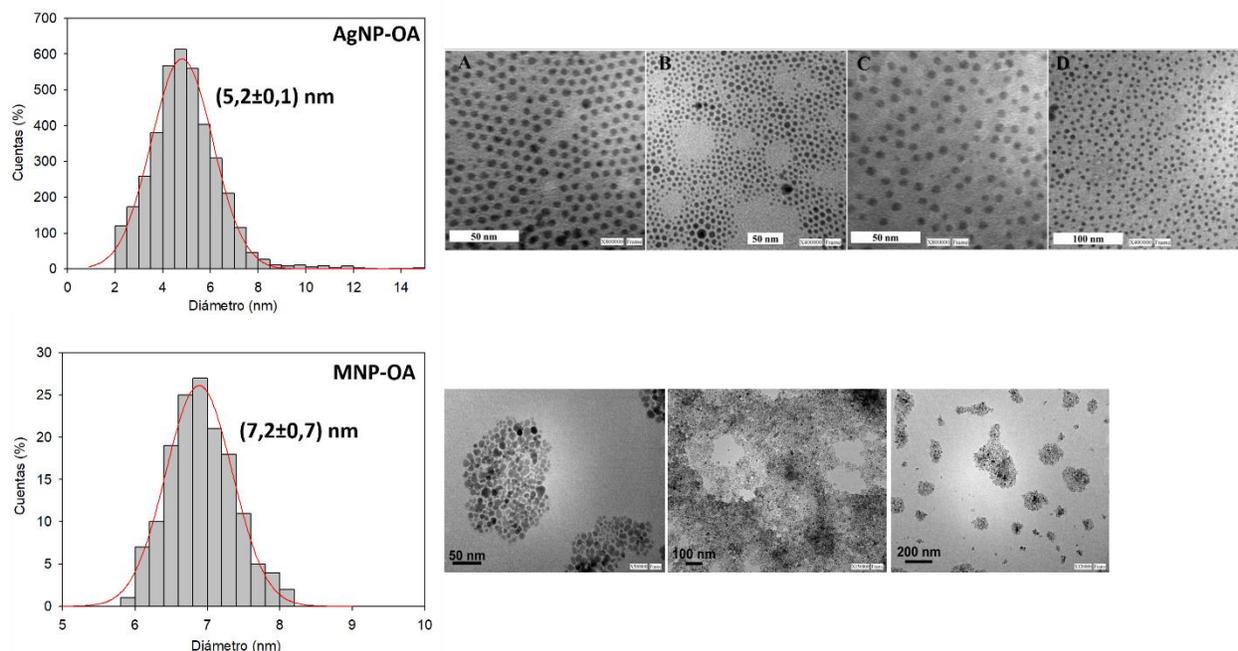
**Figura III.4.15.** Análisis termogravimétrico (TGA, línea sólida) y primera derivada (DTA, línea discontinua) de las **A-** AgNP-OA y **B-** MNP-OA.

Un razonamiento similar se aplicó al análisis del termograma obtenido para las MNPs-OA (**Figura II.4.15B**), las cuales pueden obtenerse fácilmente como polvo seco. En el mismo, la primera pérdida de ~1% en masa se relacionó a pérdida de solvente ocluido. De la primera derivada es posible deducir tres pasos principales de pérdida de masa correspondientes a diferentes procesos

de descomposición del OA, acorde a lo reportado para nanopartículas de magnetita funcionalizadas con una monocapa de ácido oleico.<sup>67</sup> Luego del primer decaimiento (pérdida de solvente), y desde 153,2 a 482,1 °C fue posible observar un primer proceso global de descomposición de OA que muestra una pérdida total de masa de ~7,5%. Finalmente, un ~8,3% de masa se pierde en el segundo paso de degradación de OA, dando lugar a una pérdida neta de masa de 15,8 %, correspondiente a la proporción de surfactante que interviene en la funcionalización de las MNP-OA.

La información obtenida por termogravimetría concuerda bien con lo predicho por estimaciones teóricas de la masa (detalladas más adelante), las cuales denotaron 14 y 18% de masa total de OA para el caso de una funcionalización completa con una monocapa de OA en AgNP-OA y MNP-OA, respectivamente. Las pequeñas diferencias observadas con respecto a las estimaciones teóricas basadas en considerar los diámetros de TEM, la masa de OA, el área ocupada por el mismo y un empaquetamiento de red hexagonal pueden ser atribuidas a procesos de aglomeración o pérdidas desparejas de masa que ocurren normalmente cuando las nanopartículas son llevadas a sequedad.

A fin de caracterizar el núcleo de las nanopartículas, se realizaron estudios por medio de microscopía de transmisión electrónica (TEM), con la cual se recabó información en cuanto a morfología, grado de polidispersidad y estabilidad en el tiempo (AgNP-OA) de las nanopartículas (**Figura II.4.16**). Para las AgNPs-OA, se encontró un diámetro promedio de  $(5,2 \pm 0,1)$  nm. Dado que las AgNP-OA son susceptibles a sufrir oxidación, se realizaron estudios en el tiempo con el fin de determinar si existen alteraciones en la estructura y forma de las NPs como consecuencia de procesos de degradación. Imágenes obtenidas a los 5 y a los 50 días después de sintetizadas (grillas diferentes), permitieron corroborar la ausencia de cambios en la morfología de las AgNP-OA en intervalos de tiempo prolongados, lo cual se condice con lo observado por espectroscopía UV-visible. El diámetro promedio del núcleo de magnetita en las MNP-OA, se estimó en  $(7,2 \pm 0,7)$  nm. Como puede inferirse de las micrografías obtenidas (**Fig. II.4.16**), las nanopartículas metálicas presentaron una morfología más uniforme y homogénea, mientras que las nanopartículas magnéticas son más polidispersas con zonas de aglomeración variable. Estas diferencias son reflejadas por los índices de polidispersidad (PDI) calculados, para los cuales se obtuvieron valores de  $4 \times 10^{-4}$  y  $90 \times 10^{-4}$  para AgNP-OA y MNP-OA, respectivamente.



**Figura II.4.16.** Histogramas de distribución de tamaño promedio (izquierda) realizado a partir de imágenes obtenidas por medio de TEM, de AgNPs-OA (paneles superiores) y MNPs-OA (paneles inferiores) dispersadas en *n*-hexano. En las imágenes correspondientes a AgNP-OA, se obtuvieron micrografías luego de 5 (A, B) y 50 días (C, D) de su síntesis para corroborar su estabilidad y morfología. Debajo, se visualizan las MNP-OA en diferentes campos y magnificaciones. El análisis estadístico tuvo en cuenta un total de 5 imágenes por NP y el número de partículas analizadas varió entre ~1000 y 3000 partículas para cada imagen.

A partir de los diámetros obtenidos por TEM, y considerando la masa y el área ocupada por moléculas de OA en la superficie de las NPs, fue posible realizar cálculos teóricos enfocados a estimar las masas molares (implícitamente, la composición núcleo/ligando) de las nanopartículas sintetizadas (**Ecuación II.4.12**).

$$PM_{NP-OA} = \left[ \left( \frac{4\pi r^3 \delta_{núcleo}}{3} \right) + \left( \frac{MW_{OA} 4\pi r^2 0,9069}{A_{OA}} \right) \right] \times N_A \quad (\text{II.4.12})$$

El peso de las NPs fue estimado considerando el radio ( $r$ ) del núcleo de las mismas, la densidad específica del material que compone cada núcleo ( $\delta_{núcleo}$ ), y la masa molar del ácido oleico ( $MW_{OA}$ ).

Las densidades específicas de Ag y Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> utilizadas, fueron 10490 y 5200 g/dm<sup>3</sup>, respectivamente.<sup>68</sup> Se asumió también, un cubrimiento completo de la superficie de las NPs por OA, con un arreglo de empaquetamiento en red hexagonal. Esto se tuvo en cuenta por medio de la introducción de un factor de corrección igual a 0,9069. A<sub>OA</sub> representa el área de sección transversal promedio ocupada por una molécula de OA en la superficie de la partícula, la cual se definió en 30 Å<sup>2</sup>/molécula (molécula completamente extendida),<sup>45,69</sup> y N<sub>A</sub> es el número de Avogadro.<sup>70</sup> Bajo esta metodología, se obtuvieron masas molares de 529 KDa y 751 KDa para las AgNP-OA y las MNP-OA, respectivamente.

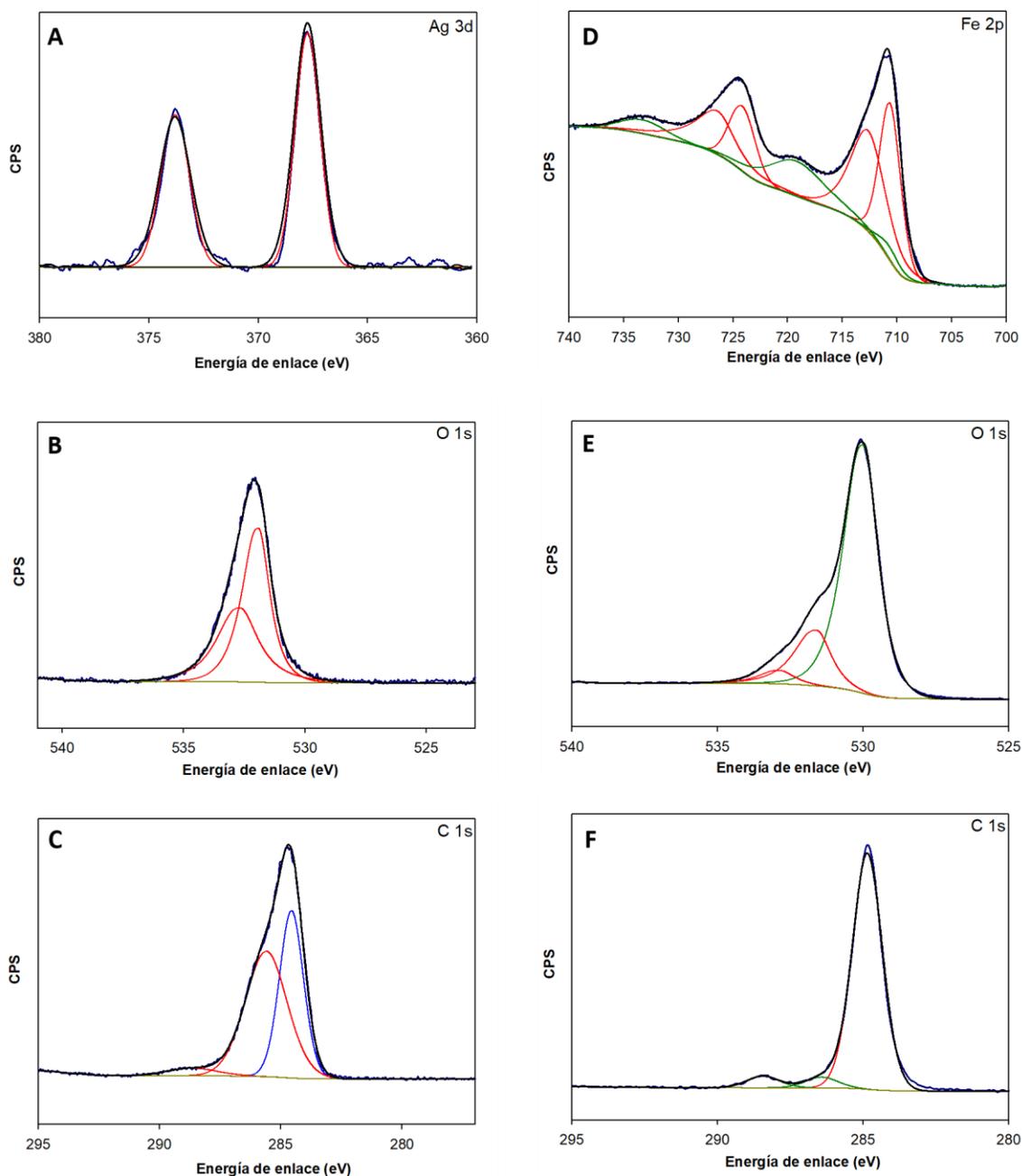
Adicionalmente, se estudiaron las composiciones atómicas superficiales y estructura de red cristalina de las nanopartículas, a través de espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS) y difracción de rayos X de polvo (p-XRD).

En la **Figura II.4.17**, se muestran los espectros de XPS de las nanopartículas sintetizadas. En el caso de los espectros obtenidos para las AgNP-OA (**A-C**), es posible distinguir las señales características de Ag 3d<sub>3/2</sub> y Ag 3d<sub>1/2</sub>, a 367,7 y 373,8 eV respectivamente, con un desdoblamiento spin-órbita de ~6eV como es de esperarse para la Ag (0).<sup>71</sup> La región de O 1s (**B**) muestra dos contribuciones principales a 531,9 y 532,7 eV, los cuales corresponden en este orden a los átomos de oxígeno de los grupos carboxilato con uniones de tipo mono- y bidentado al núcleo metálico.<sup>72</sup> En este sentido, es válido aclarar que la unión monodentada identificada por la técnica de XPS hace referencia a la configuración de complejo tipo puente, observada en estudios de FT-IR (**Figura II.4.13**). A diferencia de la técnica de FT-IT, XPS no puede discriminar entre una unión netamente monodentada y una de tipo puente, dado que sólo obtiene información acerca de la unión entre un átomo de oxígeno y un átomo de Ag o Fe, con energías de enlace (BE) degeneradas.

Estos mismos desplazamientos en la región de O 1s pueden apreciarse en el caso de las MNP-OA (**E**), donde adquieren energías similares de 531,6 y 532,8 eV, con la contribución adicional del oxígeno de red propio de la estructura cristalina que compone el núcleo de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, la cual adquiere un valor de energía de ~530 eV.<sup>73</sup> La configuración de enlace ligando-nanopartícula, también queda en evidencia cuando se analizan las regiones de C 1s para cada material. Como observa en la región de C 1s para las AgNPs-OA (**C**), las señales están compuestas por tres contribuciones diferentes, que surgen del entorno químico de los diferentes átomos de carbono en las moléculas de ácido oleico. El pico más intenso a 284,6 eV, se asignó a la cadena hidrocarbonada de OA. De manera análoga a la región de O 1s, los picos en la región de C 1s centrados en 285,6

y 288,7 eV corresponden a los enlaces C-O simple y doble (característicos de uniones mono- y bidentado respectivamente, al núcleo de las NPs), provenientes de los grupos carboxilato del OA. La región de C 1s en las MNP-OA (**F**), comprende los mismos valores de desplazamiento en energía para las tres contribuciones pertenecientes a esta señal (284,8, 286,4 y 288,4 eV). La relación de señales denotada por las áreas de cada pico, sugiere que los ligandos OA se unen al núcleo de magnetita por medio de enlaces mono- (puente) y bidentado en proporciones semejantes, en tanto que para las AgNP-OA, la relación es diferente. Por este motivo, se realizaron cuantificaciones de proporciones atómicas relativas en la superficie teniendo en cuenta las áreas de pico para cada contribución de las señales observadas en las regiones de O 1s. Descontando las señales provenientes del oxígeno de red ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) en MNPs-OA, se obtuvo que, para ambas nanopartículas la superficie posee un tipo de unión en proporciones aproximadas de 80:20, monodentado (con ambos O de un grupo  $\text{COO}^-$  unidos a dos átomos diferentes de Ag o Fe)/bidentado (**ec. II.1.6**), teniendo en cuenta la concentración total de grupos carboxilatos aportados por el surfactante. De esta forma, las características de enlace encontradas por medio de esta técnica, concuerdan con lo observado por FT-IR, donde la relación establecida por medio de las diferencias en frecuencias de absorción en el infrarrojo, denotaron un equilibrio quelando bidentado/puente (**Figuras II.4.13-14**) en lo respectivo a la naturaleza del enlace núcleo-ligando.

El espectro de XPS de las nanopartículas de magnetita en la región del Fe 2p, comprende señales pertenecientes a ambos estados de oxidación,  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ ; el primero coordinado octaédricamente y el segundo, distribuido entre sitios octaédrico y tetraédrico (solapamiento de señales  $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{FeO}$ ). La región del Fe 2p en las MNP-OA (**D**) presenta dos señales dobletes correspondientes al desdoblamiento spin-órbita para Fe  $2p_{3/2}$  y  $2p_{1/2}$  con sus respectivos satélites. El pico a más baja energía, centrado en 710,6 eV corresponde a la señal de  $\text{Fe}^{2+} 2p_{3/2}$  y su respectivo satélite en 712,6 eV. Alrededor de los 710,8 eV se muestran algunas especies octaédricas de  $\text{Fe}^{3+}$  y satélites correspondientes a estructuras octaédricas/tetraédricas de esta misma especie, se sitúan en 719,1 eV aproximadamente. Seguidamente se encuentra la señal correspondiente al Fe  $2p_{1/2}$  en 724,2 eV, su satélite en 726,4 eV y una señal satélite adicional de  $\text{Fe}^{3+}$ , alrededor de 733,2 eV.<sup>73</sup>

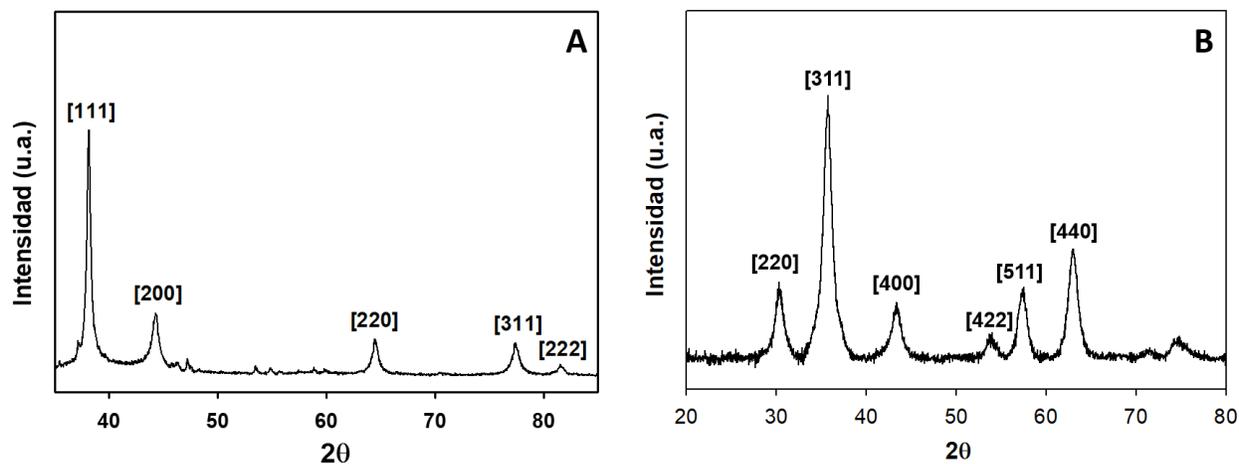


**Figura II.4.17.** Espectros de HR-XPS de las AgNP-OA (A-C) y las MNP-OA (D-F) mostrando las regiones Ag 3d, Fe 2p, O 1s y C 1s.

Por último, se estudió la estructura cristalina de las nanopartículas mediante difracción de rayos X de polvo (p-XRD). Como se visualiza en la **Figura II.4.18A**, se corroboró la estructura cristalina de la  $\text{Ag}^0$  en las AgNP-OA obteniéndose las señales características a  $38,1^\circ$ ,  $44,3^\circ$  y  $64,5^\circ$

correspondientes a las familias de planos atómicos (111), (200) y (220), propias de la estructura cúbica centrada en las caras (fcc).<sup>71</sup>

El patrón de XRD de las MNP-OA (**Figura II.4.18B**), muestra los picos característicos a  $2\theta$  de  $30.4^\circ$ ,  $35.7^\circ$ ,  $43.4^\circ$ ,  $53.7^\circ$ ,  $57.3^\circ$  y  $62.9^\circ$  correspondientes a las difracciones de los planos (220), (311), (400), (422), (511) y (440) de las caras cristalinas de la estructura de magnetita.<sup>44</sup> Cálculos de tamaño de grano efectuados por ajustes gaussianos de los picos del difractograma y por medio de la ecuación de Debye-Scherrer (**Ec. II.1.8**), mostraron una buena correlación con los tamaños obtenidos por TEM, evidenciando un diámetro promedio de  $(7,0 \pm 0,9)$  nm del núcleo de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  en las MNP-OA. En el caso del difractograma obtenido para las AgNP-OA el ajuste gaussiano presentó una menor correlación, evidenciando diámetros levemente mayores a los obtenidos por TEM, pero con una mayor desviación estándar acorde a esta discrepancia ( $(6,4 \pm 2,0)$  nm).



**Figura II.4.18.** Patrón de difracción de rayos X de polvo (p-XRD) de AgNP-OA (A) y MNP-OA (B).

## II.5- CONCLUSIÓN

La vasta cantidad de estudios existentes en torno a la síntesis y funcionalización de nanopartículas con aplicaciones en las nanobiociencias ha permitido abrir caminos innovadores en el desarrollo de estrategias para la fabricación de estos materiales.

En esta tesis doctoral, se llevaron a cabo exitosamente rutas sintéticas para la obtención de nanopartículas de plata y magnetita, funcionalizadas con ácido oleico (AgNP-OA y MNP-OA) de manera controlada y reproducible. A través de metodologías que hacen uso de las propiedades fisicoquímicas intrínsecas de las nanopartículas hidrofóbicas obtenidas (superparamagnetismo, absorción de plasmón superficial), fue posible mejorar los procesos de separación y purificación de los nanocompuestos en cuestión.

De manera subsiguiente, se abordó un amplio espectro de técnicas de caracterización de nanomateriales con las cuales fue posible estudiar las propiedades fisicoquímicas de AgNPs-OA y MNPs-OA. Como se mencionó anteriormente, se confirmó la presencia de la banda de resonancia del plasmón superficial en AgNPs-OA, la cual nos proporcionó una vía útil para medir la estabilidad de estas NPs en dispersiones. La magnetometría nos permitió por otra parte, determinar la propiedad de superparamagnetismo en las MNPs-OA, requisito fundamental para abordar los estudios de fusión de membranas planteados como objetivo principal de aplicación de estas nanopartículas durante el presente trabajo de tesis. Las técnicas implementadas para el estudio de la morfología y estructura de las nanopartículas sintetizadas, permitieron obtener información relevante que será determinante en su comportamiento frente a los modelos de biomembranas a las cuales se las expondrá. Así, las técnicas asistidas por irradiación de rayos X (p-XRD y XPS) arrojaron luz sobre configuraciones de red cristalina y estructura superficial de las NPs, disposición de ligandos y estados de oxidación predominantes. La caracterización de superficie fue debidamente acompañada por la información adquirida mediante espectroscopía infrarroja (FT-IR), la cual además de representar una herramienta útil en términos de control de rutina para la purificación de las nanopartículas, hace posible la determinación de la naturaleza del enlace núcleo-OA. Por medio de microscopía de transmisión electrónica (TEM), se analizó la morfología del núcleo de las nanopartículas y se adquirieron conocimientos acerca del grado de polidispersidad de los sistemas ensayados. A través de breves modelos teóricos aplicados, teniendo en cuenta la información extraída por TEM, se estimó tamaño y masa molar de las nanopartículas. Esta información teórica fue acompañada con datos obtenidos por medio de análisis

termogravimétricos (TGA), orientados a determinar experimentalmente la relación de masas entre los componentes del núcleo (Ag o  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) y las moléculas de ligando (OA), y así poder estimar la masa molar de las NPs. Este dato es importante cuando se desean hacer comparaciones relacionadas a la cantidad relativa de nanopartículas respecto a los componentes de los modelos de biomembrana (fosfolípidos).

**II.6- REFERENCIAS**

- (1) Jeevanandam, J.; Barhoum, A.; Chan, Y. S.; Dufresne, A.; Danquah, M. K. Review on Nanoparticles and Nanostructured Materials: History, Sources, Toxicity and Regulations. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2018**, *9* (1), 1050–1074.
- (2) Ealias, A. M.; Saravanakumar, M. P. A Review on the Classification, Characterisation, Synthesis of Nanoparticles and Their Application. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **2017**, *263* (3), 1–15.
- (3) Burduşel, A.; Gherasim, O.; Grumezescu, A. M.; Mogoantă, L.; Fikai, A.; Andronescu, E. Biomedical Applications of Silver Nanoparticles: An Up-to-Date Overview. *Nanomaterials* **2018**, *8* (681), 1–26.
- (4) Bapat, R. A.; Chaubal, T. V.; Joshi, C. P.; Bapat, P. R.; Choudhury, H.; Pandey, M.; Gorain, B.; Kesharwani, P. An Overview of Application of Silver Nanoparticles for Biomaterials in Dentistry. *Mater. Sci. Eng. C* **2018**, *91* (2017), 881–898.
- (5) Carbone, M.; Donia, D. T.; Sabbatella, G.; Antiochia, R. Silver Nanoparticles in Polymeric Matrices for Fresh Food Packaging. *J. King Saud Univ. - Sci.* **2016**, *28* (4), 273–279.
- (6) Baptista, P. V.; McCusker, M. P.; Carvalho, A.; Ferreira, D. A.; Mohan, N. M.; Martins, M.; Fernandes, A. R. Nano-Strategies to Fight Multidrug Resistant Bacteria-"A Battle of the Titans". *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–26.
- (7) Marambio-Jones, C.; Hoek, E. M. V. A Review of the Antibacterial Effects of Silver Nanomaterials and Potential Implications for Human Health and the Environment. *J. Nanoparticle Res.* **2010**, *12* (5), 1531–1551.
- (8) Brobbey, K. J.; Haapanen, J.; Gunell, M.; Mäkelä, J. M.; Eerola, E.; Toivakka, M.; Saarinen, J. J. One-Step Flame Synthesis of Silver Nanoparticles for Roll-to-Roll Production of Antibacterial Paper. *Appl. Surf. Sci.* **2017**, *420*, 558–565.
- (9) Wani, I. A.; Ganguly, A.; Ahmed, J.; Ahmad, T. Silver Nanoparticles: Ultrasonic Wave Assisted Synthesis, Optical Characterization and Surface Area Studies. *Mater. Lett.* **2011**, *65* (3), 520–522.

- (10) Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55–75.
- (11) Taleb, A.; Petit, C.; Pileni, M. P. Synthesis of Highly Monodisperse Silver Nanoparticles from AOT Reverse Micelles: A Way to 2D and 3D Self-Organization. *Chem. Mater.* **1997**, *9* (4), 950–959.
- (12) Szczęsny, R.; Szymańska, I.; Piszczek, P.; Dobrzańska, L.; Szłyk, E. Chemical Vapour Deposition (CVD) of Metallic Layers Prepared from Silver Carboxylates Complexes with Tertiary Phosphines. *Mater. Sci. Pol.* **2005**, *23* (3), 671–676.
- (13) Lee, S. J.; Han, S. W.; Kim, K. Perfluorocarbon-Stabilized Silver Nanoparticles Manufactured from Layered Silver Carboxylates. *Chem. Commun.* **2002**, *5*, 442–443.
- (14) Szlyk, E.; Piszczek, P.; Chaberski, M.; Goliński, A. Studies of Thermal Decomposition Process of Ag(I) Perfluorinated Carboxylates with Temperature Variable IR and MS. *Polyhedron* **2001**, *20* (22–23), 2853–2861.
- (15) Lin, X. Z.; Teng, X.; Yang, H. Direct Synthesis of Narrowly Dispersed Silver Nanoparticles Using a Single-Source Precursor. *Langmuir* **2003**, *19* (24), 10081–10085.
- (16) Dey, J.; Biswas, K.; Thapa, U.; Joshi, S.; Kharbangar, I. S.; Sultana, N.; Ismail, K. Facile Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Synergistic Antibacterial Activity in Combination with Commercial Antibiotics. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2015**, *88* (2), 352–357.
- (17) Tippayawat, P.; Phromviyo, N.; Boueroy, P.; Chompoosor, A. Green Synthesis of Silver Nanoparticles in Aloe Vera Plant Extract Prepared by a Hydrothermal Method and Their Synergistic Antibacterial Activity. *PeerJ* **2016**, *4*, e2589.
- (18) Gallucci, Nicolás M., Fraire, Juan C., Ferreryra Maillard, Anike P.V., Páez, Paulina L., Aiassa Martínez, I. M.; Pannunzio Miner, Elisa V., Coronado Eduardo, A.; Dalmasso, P. R. Silver Nanoparticles from Leafy Green Extract of Belgian Endive (*Cichorium Intybus* L. Var. *Sativus*): Biosynthesis, Characterization, and Antibacterial Activity. *Mater. Lett.* **2017**, *197*, 98–101.
- (19) Xu, W.; Huang, K.; Jin, W.; Luo, D.; Liu, H.; Li, Y.; Liu, X. Catalytic and Anti-Bacterial Properties of Biosynthesized Silver Nanoparticles Using Native Inulin. *RSC Adv.* **2018**, *8*

- (50), 28746–28752.
- (20) Kumar, C. S. S. R. *Magnetic Nanomaterials*, Volume 4.; Wiley-VCH: Germany, **2009**.
- (21) Rivas, J.; Kolen'ko, Y. V.; Bañobre-López, M. Magnetic Nanocolloids. In *Nanocolloids: A Meeting Point for Scientists and Technologists*; Elsevier: Amsterdam, Netherlands, **2016**; pp 75–129.
- (22) Marathe, K.; Doshi, P. Magnetic Nanoparticles: Preparation, Physical Properties, and Applications in Biomedicine. *Nanoscale Res. Lett.* **2012**, *7*, 1–13.
- (23) Lu, A. H.; Salabas, E. L.; Schüth, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2007**, *46* (8), 1222–1244.
- (24) Wu, W.; He, Q.; Jiang, C. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Nanoscale Res. Lett.* **2008**, *3* (11), 397–415.
- (25) Sun, S.; Zeng, H. Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (28), 8204–8205.
- (26) Kolen'Ko, Y. V.; Bañobre-López, M.; Rodríguez-Abreu, C.; Carbó-Argibay, E.; Sailsman, A.; Piñeiro-Redondo, Y.; Cerqueira, M. F.; Petrovykh, D. Y.; Kovnir, K.; Lebedev, O. I.; et al. Large-Scale Synthesis of Colloidal Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles Exhibiting High Heating Efficiency in Magnetic Hyperthermia. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118* (16), 8691–8701.
- (27) Sutariya, V. B.; Pathak, Y. *Biointeractions of Nanomaterials*; CRC Press, **2014**.
- (28) Kharisov, B. I.; Dias, H. V. R.; Kharissova, O. V.; Vázquez, A.; Peña, Y.; Gómez, I. Solubilization, Dispersion and Stabilization of Magnetic Nanoparticles in Water and Non-Aqueous Solvents: Recent Trends. *RSC Adv.* **2014**, *4* (85), 45354–45381.
- (29) Mout, R.; Moyano, D. F.; Rana, S.; Rotello, V. M. Surface Functionalization of Nanoparticles for Nanomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2539–2544.
- (30) Bajaj, A.; Rana, S.; Miranda, O. R.; Yawe, J. C.; Jerry, D. J.; Bunz, U. H. F.; Rotello, V. M. Cell Surface-Based Differentiation of Cell Types and Cancer States Using a Gold Nanoparticle-GFP Based Sensing Array. *Chem. Sci.* **2010**, *1* (1), 134–138.
- (31) Choi, C. H. J.; Alabi, C. A.; Webster, P.; Davis, M. E. Mechanism of Active Targeting in

- Solid Tumors with Transferrin-Containing Gold Nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107* (3), 1235–1240.
- (32) Mirkin, Chad A., Letsinger, Robert L., Mucic, Robert C., Storhoff, J. J. A DNA-Based Method for Rationally Assembling Nanoparticles into Macroscopic Materials. *Nature* **1996**, *382*, 607–609.
- (33) Mout, R.; Moyano, D. F.; Rana, S.; Rotello, V. M. Surface Functionalization of Nanoparticles for Nanomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2539–2544.
- (34) Raliya, R., Singh, T., Hadad, K., Biswas, P. Perspective on Nanoparticle Technology for Biomedical Use. *Curr Phar Des.* **2016**, *22* (17), 2481–2490.
- (35) Ling, W.; Wang, M.; Xiong, C.; Xie, D.; Chen, Q.; Chu, X.; Qiu, X.; Li, Y.; Xiao, X. Synthesis, Surface Modification, and Applications of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *J. Mater. Res.* **2019**, *34* (11), 1828–1844.
- (36) Kennedy, D. C.; Orts-Gil, G.; Lai, C. H.; Müller, L.; Haase, A.; Luch, A.; Seeberger, P. H. Carbohydrate Functionalization of Silver Nanoparticles Modulates Cytotoxicity and Cellular Uptake. *J. Nanobiotechnology* **2014**, *12* (1), 1–8.
- (37) McShan, D.; Ray, P. C.; Yu, H. Molecular Toxicity Mechanism of Nanosilver. *J. Food Drug Anal.* **2014**, *22* (1), 116–127.
- (38) Borowik, A.; Butowska, K.; Konkol, K.; Banasiuk, R.; Derewonko, N.; Wyrzykowski, D.; Davydenko, M.; Cherepanov, V.; Styopkin, V.; Prylutsky, Y.; et al. The Impact of Surface Functionalization on the Biophysical Properties of Silver Nanoparticles. *Nanomaterials* **2019**, *9* (973), 1–23.
- (39) Maya Girón, J. V.; Vico, R. V.; Maggio, B.; Zelaya, E.; Rubert, A.; Benítez, G.; Carro, P.; Salvarezza, R. C.; Vela, M. E. Role of the Capping Agent in the Interaction of Hydrophilic Ag Nanoparticles with DMPC as a Model Biomembrane. *Environ. Sci. Nano* **2016**, *3* (2), 462–472.
- (40) Guo, T.; Lin, M.; Huang, J.; Zhou, C.; Tian, W.; Yu, H.; Jiang, X.; Ye, J.; Shi, Y.; Xiao, Y.; et al. The Recent Advances of Magnetic Nanoparticles in Medicine. *J. Nanomater.* **2018**, *2018*.

- (41) Lee, N.; Yoo, D.; Ling, D.; Cho, M. H.; Hyeon, T.; Cheon, J. Iron Oxide Based Nanoparticles for Multimodal Imaging and Magnetoresponse Therapy. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (19), 10637–10689.
- (42) Zhu, N.; Ji, H.; Yu, P.; Niu, J.; Farooq, M. U.; Akram, M. W.; Udego, I. O.; Li, H.; Niu, X. Surface Modification of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Nanomaterials* **2018**, *8* (10), 1–27.
- (43) Velusamy, P.; Chia-Hung, S.; Shritama, A.; Kumar, G. V.; Jeyanthi, V.; Pandian, K. Synthesis of Oleic Acid Coated Iron Oxide Nanoparticles and Its Role in Anti-Biofilm Activity against Clinical Isolates of Bacterial Pathogens. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2016**, *59*, 450–456.
- (44) Mahdavi, M.; Ahmad, M. Bin; Haron, J.; Namvar, F.; Nadi, B.; Zaki, M.; Rahman, A.; Amin, J. Synthesis, Surface Modification and Characterisation of Biocompatible Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Molecules* **2013**, *18*, 7533–7548.
- (45) Matshaya, T. J.; Lanterna, A. E.; Granados, A. M.; Krause, R. W. M.; Maggio, B.; Vico, R. V. Distinctive Interactions of Oleic Acid Covered Magnetic Nanoparticles with Saturated and Unsaturated Phospholipids in Langmuir Monolayers. *Langmuir* **2014**, *30* (20), 5888–5896.
- (46) Zhang, L.; He, R.; Gu, H.-C. Oleic Acid Coating on the Monodisperse Magnetite Nanoparticles. *Appl. Surf. Sci.* **2006**, *253* (5), 2611–2617.
- (47) Sharma, K. S.; Ningthoujam, R. S.; Dubey, A. K.; Chattopadhyay, A.; Phapale, S.; Juluri, R. R.; Mukherjee, S.; Tewari, R.; Shetake, N. G.; Pandey, B. N.; et al. Synthesis and Characterization of Monodispersed Water Dispersible Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles and in Vitro Studies on Human Breast Carcinoma Cell Line under Hyperthermia Condition. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 1–11.
- (48) Baer, D. R.; Engelhard, M. H.; Johnson, G. E.; Laskin, J.; Lai, J.; Mueller, K.; Munusamy, P.; Thevuthasan, S.; Wang, H.; Washton, N.; et al. Surface Characterization of Nanomaterials and Nanoparticles: Important Needs and Challenging Opportunities. *J. Vac. Sci. Technol. A Vacuum, Surfaces, Film.* **2013**, *31* (5), 1-34.

- (49) Baer, D. R. The Chameleon Effect : Characterization Challenges Due to the Variability of Nanoparticles and Their Surfaces. *Front. Chem* **2018**, 6 (145), 1–7.
- (50) Hornyak, G. L., Moore, J. J., Tibbals, H. F., Dutta, J. *Fundamentals of Nanotechnology*; CRC Press: Washington, USA, **2009**.
- (51) Coronado, E. A.; Schatz, G. C. Surface Plasmon Broadening for Arbitrary Shape Nanoparticles: A Geometrical Probability Approach. *J. Chem. Phys.* **2003**, 119 (7), 3926–3934.
- (52) Faghihzadeh, F.; Anaya, N. M.; Schifman, L. A.; Oyanedel-Craver, V. Fourier Transform Infrared Spectroscopy to Assess Molecular-Level Changes in Microorganisms Exposed to Nanoparticles. *Nanotechnol. Environ. Eng.* **2016**, 1 (1), 1–16.
- (53) *Principles and Applications of Thermal Analysis*, 1st ed.; Gabbott, P., Ed.; Blackwell Publishing Ltd, 2008.
- (54) Mansfield, E.; Tyner, K. M.; Poling, C. M.; Blacklock, J. L. Determination of Nanoparticle Surface Coatings and Nanoparticle Purity Using Microscale Thermogravimetric Analysis. *Anal. Chem.* **2014**, 86 (3), 1478–1484.
- (55) Dongargaonkar, A. A.; Clogston, J. D. Quantitation of Surface Coating on Nanoparticles Using Thermogravimetric Analysis. In *Methods in Molecular Biology*; **2018**; Vol. 1682, pp 57–63.
- (56) Han, L.; Zhou, X. Synthesis and Characterization of Liposomes Nano-Composite-Particles with Hydrophobic Magnetite as a MRI Probe. *Appl. Surf. Sci.* **2016**, 376, 252–260.
- (57) Papp, C.; Steinrück, H. In Situ High-Resolution X-Ray Photoelectron Spectroscopy – Fundamental Insights in Surface Reactions. *Surf. Sci. Rep.* **2013**, 68 (3–4), 446–487.
- (58) Moulder, J. F., Stickle, W. F., Sobol, P. E., Bomben, K. D. *Handbook of X-Ray Photoelectron Spectroscopy*; Sobol, P. E., Chastain, J., Eds.; Perkin Elmer Corporation, **1993**.
- (59) Sharma, R.; Bisen, D. P.; Shukla, U.; Sharma, B. G. X-Ray Diffraction : A Powerful Method of Characterizing Nanomaterials. *Recent Res. Sci. Technol.* **2012**, 4 (8), 77–79.

- (60) Dorofeev, G. A.; Streletskii, A. N.; Povstugar, I. V.; Protasov, A. V.; Elsukov, E. P. Determination of Nanoparticle Sizes by the X Ray Diffraction Method. *Colloid J.* **2012**, *74* (6), 678–688.
- (61) Tang, C. Y.; Yang, Z. *Transmission Electron Microscopy (TEM)*; Elsevier B.V., **2017**.
- (62) Wang, Y.; Wong, J. F.; Teng, X.; Lin, X. Z. “ Pulling ” Nanoparticles into Water : Phase Transfer of Oleic Acid Stabilized Monodisperse Nanoparticles into Aqueous Solutions of  $\alpha$ -Cyclodextrin. *Nano Lett.* **2003**, *3* (11), 1555–1559.
- (63) Sun, Y.; Ding, X.; Zheng, Z.; Cheng, X.; Hu, X.; Peng, Y. Surface Initiated ATRP in the Synthesis of Iron Oxide/Polystyrene Core/Shell Nanoparticles. *Eur. Polym. J.* **2007**, *43* (3), 762–772.
- (64) Wani, I. a.; Ganguly, A.; Ahmed, J.; Ahmad, T. Silver Nanoparticles: Ultrasonic Wave Assisted Synthesis, Optical Characterization and Surface Area Studies. *Mater. Lett.* **2011**, *65* (3), 520–522.
- (65) Nakashini, K., Solomon, P. *Infrared Absorption Spectroscopy*, 2nd ed.; Holden-Day INC.: Oakland, **1977**.
- (66) Deacon, G.B., Phillips, R. J. Relationships between the Carbon-Oxygen Stretching Frequencies of Carboxylato Complexes and the Type of Carboxylate Coordination. *Coord. Chem. Rev* **1980**, *33*, 227–250.
- (67) Yang, K.; Peng, H.; Wen, Y.; Li, N. Re-Examination of Characteristic FTIR Spectrum of Secondary Layer in Bilayer Oleic Acid-Coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles. *Appl. Surf. Sci.* **2010**, *256* (10), 3093–3097.
- (68) Mursky, G. A.; Thompson, R. M. A Specific Gravity Index for Minerals. *Can. Mineral.* **1958**, *6* (2), 273–287.
- (69) Maggio, B. B.; Lucy, J. A. Studies on Mixed Monolayers of Phospholipids and Fusogenic Lipids. *Biochemistry* **1975**, *149*, 597–608.
- (70) McCarthy, S. A.; Davies, G. L.; Gun’ko, Y. K. Preparation of Multifunctional Nanoparticles and Their Assemblies. *Nat. Protoc.* **2012**, *7* (9), 1677–1693.

- (71) Prieto, P.; Nistor, V.; Nouneh, K.; Oyama, M.; Abd-Lefdil, M.; Díaz, R. XPS Study of Silver, Nickel and Bimetallic Silver-Nickel Nanoparticles Prepared by Seed-Mediated Growth. *Appl. Surf. Sci.* **2012**, 258 (22), 8807–8813.
- (72) Parker, B.; Immaraporn, B.; Gellman, A. J. Carboxylic Acid Deprotonation on the Ag(110) and Ag(111) Surfaces. *Langmuir* **2001**, 17 (21), 6638–6646.
- (73) Wilson, D.; Langell, M. A. XPS Analysis of Oleylamine/Oleic Acid Capped Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles as a Function of Temperature. *Appl. Surf. Sci.* **2014**, 303, 6–13.

## CAPÍTULO III

### Interacción de nanopartículas de plata funcionalizadas con ácido oleico (AgNP-OA) con modelos de biomembranas

#### RESUMEN

En este capítulo se describen los estudios realizados en relación a la interacción entre nanopartículas de plata funcionalizadas con ácido oleico (AgNP-OA) y modelos de biomembranas con diferente composición. Utilizando el modelo de monocapas de Langmuir como eje principal y por medio de diversas técnicas de microscopía acopladas al mismo, se accedió a información relevante acerca del comportamiento termodinámico y topográfico de los sistemas NP/Lípido. Se realizaron, además, ensayos para la determinación de la capacidad de estas NPs para adsorber fosfolípidos del entorno y liberar iones  $\text{Ag}^+$ , los cuales tienen actividad biocida en diferentes medios. Estas técnicas en conjunto permitieron abarcar un extenso estudio sobre el desempeño de las AgNP-OA hidrofóbicas como potencial plataforma biocida. El entendimiento de los factores que regulan la interacción entre estas nanopartículas hidrofóbicas y biomembranas, permite sentar bases importantes para el desarrollo y diseño racional de nanopartículas con aplicaciones en biomedicina.

## III.1- INTRODUCCIÓN

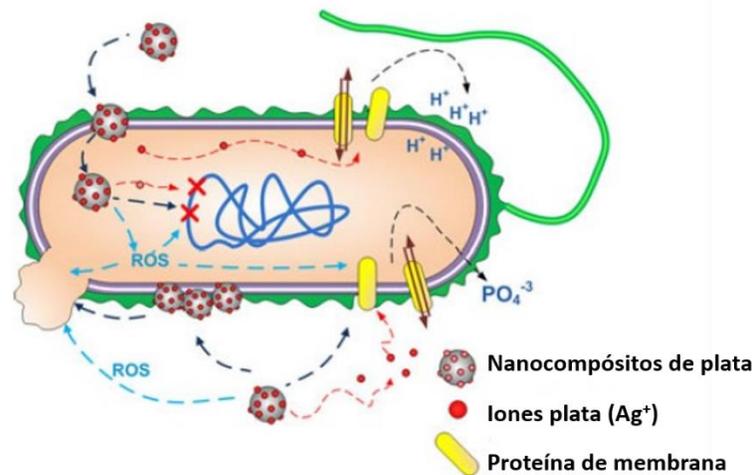
### III.1.1- Principales mecanismos de acción antimicrobiana de las nanopartículas de plata (AgNPs)

Entre las nanoestructuras integradas por compuestos de plata, las nanopartículas de plata (AgNP) han sido ampliamente utilizadas por años como agentes antibacterianos y antifúngicos, con una amplia inserción en la manufactura de dispositivos quirúrgicos, de higienización y para el tratamiento de quemaduras; debido a sus propiedades antimicrobianas. Específicamente, nanopartículas de plata con diámetros menores que 20 nm, han demostrado una mayor actividad antimicrobiana en comparación con otros compuestos no-particulados de plata. Esto puede ser atribuido a la gran relación superficie/volumen que poseen las NP, lo cual provee un mayor contacto con el medio que las rodea, favoreciendo la continua liberación de iones plata ( $\text{Ag}^+$ ), considerados una de las especies biológicamente activas de la plata.<sup>1</sup> Asimismo, la ionización de la plata metálica está estrechamente relacionada al área superficial expuesta, y estudios clínicos realizados en diversos modelos animales han probado que la velocidad de liberación de iones  $\text{Ag}^+$  es unas 100 veces mayor desde nanocristales de plata que desde materiales de plata con dimensiones en la escala micro- o macroscópica.<sup>2</sup>

En cuanto a los mecanismos de acción de la nano-plata sobre las bacterias, si bien no han sido completamente elucidados, algunos de los más importantes pueden resumirse en tres procesos generales: (1) generación de iones plata libres, seguidos por la disrupción en la producción de metabolitos y en la replicación de ADN, (2) generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) por parte de las AgNPs e iones  $\text{Ag}^+$ , y (3) daño directo de las nanopartículas de plata sobre la membrana celular (**Figura III.1.1**).

Es sabido que las AgNPs en su forma metálica son inertes y no exhiben acción biocida; sin embargo, se ioniza en presencia de humedad, fluidos corporales (tejidos) y otras secreciones, liberando  $\text{Ag}^+$ . En un primer paso, los iones plata se unen a receptores de electrones, usualmente residuos disulfuro, amino, carbonilo y/o fosfato en las membranas celulares dando lugar a la absorción intracelular que puede ocurrir por diferentes vías. Seguidamente, la inactivación de enzimas relacionadas a procesos de membrana como la fosfomanosa isomerasa, conllevan a la

disrupción de la envoltura celular bacteriana y la disfuncionalidad en su capacidad para regular tanto el ingreso de nutrientes por difusión como la salida de metabolitos y electrolitos esenciales hacia el medio externo. En suma, el efecto intracelular predominante de la plata radica fundamentalmente en su capacidad para dañar los sistemas enzimáticos intracelulares clave, alterando los metales traza y electrolitos necesarios para desempeñar su funcionamiento normal. Esto conduce finalmente al malfuncionamiento de la respiración celular y defectos en mecanismos de replicación de ARN y ADN.<sup>3</sup>



**Figura III.1.1.** Diagrama esquemático de las interacciones probables de nanocompuestos de plata con células bacterianas. Las AgNPs pueden (1) liberar iones plata y generar ROS; (2) interactuar con proteínas de la membrana afectando su funcionamiento; (3) acumularse en la membrana celular afectando la permeabilidad; y (4) entrar en la célula donde puede generar ROS, liberar iones plata y afectar el ADN. Las ROS generadas pueden también afectar el ADN, la membrana celular, y las proteínas de membrana; de igual modo la liberación de iones plata puede afectar el ADN y las proteínas de membrana. Adaptado de Marambio-Jones, C.; Hoek, E. M. V. A Review of the Antibacterial Effects of Silver Nanomaterials and Potential Implications for Human Health and the Environment. *J. Nanoparticle Res.* **2010**, *12* (5), 1531–1551.

Estudios respecto a los diferentes mecanismos de acción biocida, describen a la generación de especies reactivas del oxígeno como una de las vías más probables por las cuales las AgNPs pueden ejercer su efecto antimicrobiano. Las ROS son subproductos naturales del metabolismo respiratorio de diversos organismos. Si bien, bajos niveles de estas especies reactivas del oxígeno

pueden ser controladas por las defensas de las células como, por ejemplo, la relación glutatión y disulfuro de glutatión (GSH/GSSG), una sobreproducción de ROS puede dar lugar a estrés oxidativo. La generación adicional de radicales libres puede atacar los lípidos de membrana y conducir a una ruptura de la función mitocondrial o causar daño en el ADN. En presencia de oxígeno disuelto, la molécula de  $O_2$  pueden adsorberse químicamente sobre la cara (111) de la superficie de las AgNPs y ser reducidas de manera incompleta a ROS ( $\cdot OH$ ,  $O_2^{\cdot -}$ ), estas especies radicalarias son en principio, las responsables del ataque directo a las membranas celulares, mientras que los iones  $Ag^+$  se unen a los receptores electronegativos de la membrana, interfiriendo con su integridad. Además, las AgNPs internalizadas por endocitosis, poseen un efecto de tipo *caballo de Troya*, por el cual iones  $Ag^+$  son liberados en el citoplasma por medio de reacciones con organelas como las mitocondrias. Los iones plata intracelulares pueden unirse directamente a las enzimas que contienen grupos tiol, causando la interrupción de la transferencia de electrones y la producción de ROS, que conlleva a un estrés oxidativo adicional y severas lesiones celulares. Si la mortalidad de las células bacterianas es causada por la generación extracelular de ROS iniciada en la superficie de las AgNPs o por la interrupción de la maquinaria celular mediante un efecto tipo *caballo de Troya* gestado en el interior del citoplasma, sigue siendo un interrogante que precisa hasta el día de hoy, el desarrollo de estudios y ensayos de bio-modelado para la determinación de los principales factores desencadenantes del efecto biocida en estas nanopartículas.<sup>4</sup>

Se ha reportado que las nanopartículas de plata son capaces de interactuar con la membrana bacteriana e internalizarse en las células como entidades moleculares.<sup>5</sup> En el caso de nanopartículas puramente metálicas a las que se le forma una cubierta de óxido de plata ( $Ag_2O$  NPs), los mecanismos de actividad antimicrobiana por interacción directa transcurren por medio de la formación de “huecos”, irregularidades o deformaciones en la membrana externa, que desencadenan cambios en la permeabilidad de la misma. Esto conduce a la posterior liberación de proteínas de membrana y metabolitos hacia el medio externo que culmina en la muerte celular. Sin embargo, se ha determinado que este fenómeno macroscópico está guiado por interacciones electrostáticas atractivas entre las nanopartículas y los grupos cargados en la superficie de las membranas celulares fundamentalmente hacia proteínas que contienen sulfuro, del mismo modo que ocurre durante la interacción entre los iones  $Ag^+$  y los grupos tiol de las proteínas de la cadena respiratoria.<sup>6</sup> De este modo, si bien en todos los casos la química de superficie de las AgNPs es

determinante en la actividad antimicrobiana final, es lógico pensar que el mecanismo de interacción directa estará fuertemente supeditado a este factor, en cuyo caso fuerzas electrostáticas o de tipo puente hidrógeno serán dominantes en nanopartículas hidrofílicas, y las interacciones de van der Waals definirán el comportamiento de nanopartículas hidrofóbicas.

### **III.1.2- Nanopartículas de plata en aplicaciones biomédicas y estudios emergentes en relación a su interacción con biomembranas**

Una gran preocupación en el sistema de salud mundial radica en el emergente y alarmante fenómeno de la creciente abundancia de organismos patógenos resistentes a diferentes fármacos antimicrobianos. Gracias a los efectos bactericidas de amplio espectro contra cepas Gram-negativas y Gram-positivas, sumado a sus propiedades fisicoquímicas intrínsecas, las AgNPs se han convertido al día de hoy en una de las nanopartículas metálicas más empleadas para aplicaciones antimicrobianas modernas.<sup>7</sup> Algunas de las plataformas que han sido ampliamente estudiadas incluyen AgNPs inmersas en matrices poliméricas biocompatibles como la policaprolactona, quitosano co-polimerizado con hidroxiapatita, etc., para su empleo como recubrimiento en vendajes para heridas y dispositivos empleados en prótesis. En este último caso, las NPs se incorporan durante el proceso de manufactura, como parte del *cemento* del material para ejercer liberación controlada de iones  $\text{Ag}^+$  y reconstrucción ósea.<sup>8</sup> Los polímeros utilizados como matriz para el transporte de las AgNPs, han sido también modificados para soportar la angiogénesis y la vascularización, confiriéndole a estas plataformas la capacidad de cumplir un rol dual en regeneración ósea y buena actividad antimicrobiana. La alta porosidad de los materiales que conforman este tipo de compósitos incrementan la superficie de adsorción de las nanopartículas de plata ocluidas permitiendo una liberación incrementada y sostenida de iones  $\text{Ag}^+$ , al tiempo que iguala la fuerza mecánica necesaria para actuar de soporte en tejidos óseos dañados por ejemplo, por osteoporosis.<sup>9</sup>

Adicionalmente, y tal como se mencionó en el capítulo II, métodos comunes para la estabilización de las AgNPs y su posterior estudio en aplicaciones biomédicas incluyen el empleo de agentes hidrofílicos pasivos para su funcionalización como citrato de sodio (Cit) o polietilenglicol (PEG).<sup>10,11</sup> Pese a la buena actividad antimicrobiana y compatibilidad con medios acuosos que exhiben las AgNPs funcionalizadas con este tipo de agentes, los mismos pueden

presentar algunas dificultades cuando son utilizados en ambientes lipofílicos, especialmente en términos de alcanzar y permanecer en un sitio deseado. Otras desventajas incluyen la problemática asociada a la significativa cantidad de bacterias que pueden quedar unidas o adheridas sobre el polímero o ligando estabilizante hidrofílico, causando desorción o degradación oxidativa a pH fisiológico.<sup>12</sup>

Para aplicaciones antimicrobianas tópicas, las AgNP hidrofóbicas encuentran muchas ventajas por sobre aquellas de carácter hidrofílico debido a la naturaleza hidrofóbica de la piel. Las AgNP necesitan pasar las primeras barreras conformadas por el estrato córneo y las membranas celulares para poder alcanzar sitios de acción específicos. En consecuencia, considerables esfuerzos han sido dirigidos a entender los mecanismos por los cuales las NPs llevan a cabo la penetración en la piel, los cuales, tanto en materia de su destino en las células como su mecanismo de acción y toxicidad, se encuentran estrechamente relacionados con las propiedades fisicoquímicas de las NPs.<sup>13,14</sup> Sin embargo, la distribución local, partición y organización de las nanopartículas a nivel de la mesoescala y sus interacciones y efectos en biomembranas, no están aún del todo elucidados.<sup>15,16</sup> El estudio de las interacciones físicas entre las AgNP y los lípidos de membrana pueden contribuir a la obtención de conocimiento acerca de su mecanismo de acción y toxicidad. El esquema de trabajo empleando modelos de biomembrana ofrece muchas ventajas en comparación con el empleo de células, dado que es posible controlar fácilmente la composición y la organización del sistema, cuyos cambios producidos luego de la interacción entre sus componentes con un agente externo como por NPs, pueden ser medidos directamente y en tiempo real. Entre los modelos de biomembranas existentes, los films de Langmuir resultan una excelente alternativa para el estudio de la biofísica de estas membranas, considerando que las membranas biológicas pueden ser concebidas como dos monocapas acopladas.<sup>17,18</sup> Los estudios en monocapas de Langmuir proveen un conocimiento valioso para el entendimiento acerca de cómo ocurre la interacción entre drogas anfifílicas o proteínas de transmembrana en la célula.<sup>19</sup> En el marco de este modelo experimental, algunas investigaciones han permitido determinar que nanopartículas de características hidrofóbicas, son capaces de afectar las propiedades fisicoquímicas y viscoelásticas de monocapas lipídicas.<sup>11,20</sup> El comportamiento de estas nanopartículas frente a diferentes fosfolípidos ha sido frecuentemente asociado a la habilidad de estas nanopartículas para segregarse de diversas maneras y modificar la elasticidad en el plano de los films lipídicos.<sup>15,20</sup>

De manera adicional, la reproducibilidad de estos resultados y su correspondencia con el comportamiento farmacológico o toxicológico *in vitro* e *in vivo*, justifican y respaldan fuertemente su uso.<sup>17,21</sup> Debido a que la modelización por monocapas de Langmuir es capaz de homologar las condiciones de presión lateral presentes en células reales, muchos estudios han sido diseñados, implementando composiciones lipídicas de monocapas con el objetivo de simular ensayos de captación celular (“*celular uptake*”).<sup>22</sup> Nanopartículas funcionalizadas con péptidos que poseen dominios específicos de proteínas integrales, han sido estudiadas como transportadores de fármacos de acción antirretroviral por medio de ensayos en membranas modelo cuya composición se asemeja a la de celulares endoteliales.<sup>23</sup> Los dominios peptídicos son capaces de llevar a cabo una translocación de la membrana, mejorando la captación celular. Estos estudios demostraron que tanto la secuencia de péptidos como la cantidad de biomolécula conjugada a las NPs afectan las interacciones que presentan las NPs frente a los modelos de membrana de células endoteliales. Estas interacciones se correlacionaron también con el transporte del fármaco encapsulado hacia el interior de la célula.

Otros modelos de biomembrana ampliamente ventajosos pueden ser obtenidos por modelado computacional. Dentro de este campo, Gupta y Rai han empleado simulaciones de dinámica molecular para estudiar el efecto de la hidrofobicidad, hidrofiliidad, la carga de superficie y el tamaño de nanopartículas de oro (AuNP) en la permeabilidad de la piel. Por medio de la simulación del estrato corneo de piel compuesto por ceramida, un ácido graso de cadena larga, y colesterol, demostraron que las AuNP hidrofóbicas son capaces de producir una disrupción (desorganización) de la bicapa, entrar y permanecer en ella; mientras que, AuNP cargadas positiva- o negativamente solamente pueden ser adsorbidas en la interfase de la bicapa en cuestión. Sus estudios también les permitieron observar que la permeabilidad de las AuNP hidrofóbicas es varias veces mayor en comparación con sus contrapartes hidrofílicas.<sup>16</sup>

Considerando la importancia de la interacción de las NPs con biomembranas y el rol de los iones plata liberados para aplicaciones antimicrobianas, el uso de AgNP hidrofóbicas, que puedan ser retenidas en la biomembrana, podría permitir un incremento en la acción local, reduciendo la dosis y optimizando el desempeño transdérmico.

### III.1.3- Monocapas de Langmuir como sistema modelo de biomembranas para el estudio de interacciones entre nanopartículas y modelos de membranas celulares

#### • Teoría del modelo y análisis de las isothermas de Langmuir

Las monocapas de Langmuir (ML), constituyen uno de las plataformas más utilizadas para el estudio detallado de las interacciones intermoleculares en interfaces aire/agua. A diferencia de las vesículas que se encuentran en constante equilibrio en ausencia de presión lateral neta, los films monomoleculares de Langmuir formados por fosfolípidos dispersados a lo largo de una interfase aire/agua (o aceite/agua), están impedidos de adquirir esta condición termodinámica, debido a las restricciones geométricas del sistema.<sup>24</sup> Sin embargo, como se define en la ecuación III.1.1 en condiciones en las cuales la presión superficial de la monocapa ( $\Pi_m$ ), iguala energéticamente a la densidad de energía libre hidrofóbica, se establece una correspondencia directa entre monocapas y bicapas que hace que los sistemas de ML, sean perfectamente capaces de reproducir condiciones análogas a las que se presentan en las bicapas que son las estructuras encontradas en las membranas celulares.

$$\Pi_m(a_b^0) = \gamma_{phob} + [\varphi'_{m-m}(a_b^0) - \varphi'_{m-u}(a_b^0)] \quad (\text{III.1.1})$$

Así, con el requerimiento de que el área por molécula de lípido ( $a_b^0$ ) en monocapas, sea igual que en bicapas, la ecuación de correspondencia considera la energía involucrada en la tensión hidrofóbica de cohesión ( $\gamma_{phob}$ ), y las energías libres de interacción entre las cadenas lipídicas de monocapas opuestas en ensamblajes de bicapa ( $\varphi'_{m-m}$ ), y entre cadenas lipídicas y la fase superior (aire o aceite),  $\varphi'_{m-u}$ . Esta condición es importante dado que en monocapas es posible explorar una región mucho más grande de la ecuación de estado del ensamblaje lipídico, a partir de las isothermas de  $\pi$  (presión superficial) vs. A (área), en comparación con experimentos de bicapas tensionadas.<sup>25</sup> Entonces, es primordial definir en qué consiste el sistema de monocapas autoensambladas de Langmuir como modelo experimental de biomembranas.

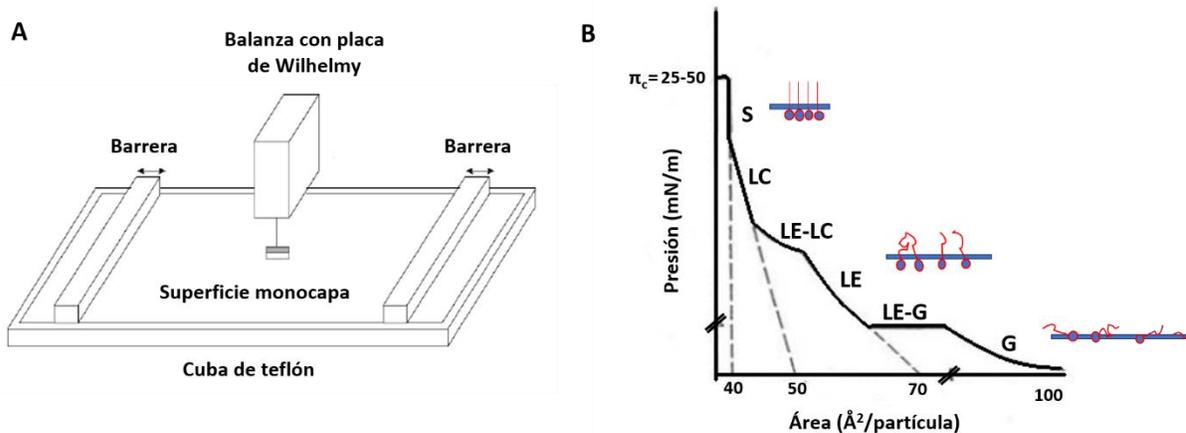
El balance de fuerzas establecido en la interfase aire/agua que tiene lugar entre las moléculas de la subfase, con el fin de minimizar las áreas de contacto con la fase superior, trae como

consecuencia la aparición de una energía libre superficial. Esta energía libre, se cuantifica en términos de tensión superficial ( $\gamma$ ). La tensión superficial del agua es alrededor de 73 mN/m a 20°C, que es un valor excepcionalmente alto comparado con otros líquidos. Esta propiedad hace que el agua, sumada a ser el solvente de los sistemas biológicos, sea una muy buena subfase para estudios de monocapa. Cuando anfifilos (por ejemplo: lípidos presentes en biomembranas), son disueltos en un solvente inmiscible con el agua, y son depositados sobre la superficie del agua con una microjeringa, la solución se distribuye rápidamente para cubrir toda el área disponible. A medida que el solvente se evapora, los anfifilos orientan sus cabezas polares hacia la fase acuosa y su cadena hidrofóbica hacia la fase aire, formando la monocapa. Cuando el área disponible para la monocapa es grande, la distancia entre moléculas adyacentes es grande y sus interacciones son débiles. La monocapa puede considerarse como un gas en dos dimensiones. Bajo esta condición la monocapa tiene un pequeño efecto en la tensión superficial del agua. Cuando el área disponible para las moléculas se reduce, al entrar en contacto cercano, la fuerza repulsiva entre moléculas anfifílicas es responsable del grado de dispersión de las mismas y del origen de una *presión superficial* positiva,  $\Pi$  (o  $\Pi_m$ , como fue definido anteriormente), dada por la siguiente relación:

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma \quad (\text{III.1.2})$$

La presión superficial se define entonces como la diferencia entre la tensión superficial de la subfase acuosa antes ( $\gamma_0$ ) y después ( $\gamma$ ) de la dispersión de la monocapa.<sup>26</sup> Con el objetivo de desarrollar un modelo para el estado líquido, Irving Langmuir mejoró un dispositivo (desarrollado por Agnes Pockels) capaz de medir los cambios en  $\Pi$ , mientras barreras móviles ejercen compresión a lo largo de la interfase aire/agua, cambiando el área disponible por molécula,  $A$ . Este instrumento conocido como Balanza de Langmuir está conformado por una cuba de teflón que contiene a la subfase y que se encuentra controlada térmicamente por canales colocados debajo de ella (**Figura III.1.2A**). El área superficial se varía por medio de las barreras móviles, generalmente de Delrin<sup>®</sup>, que es un material hidrofílico y lo suficientemente pesado para prevenir cualquier fuga de la monocapa debajo de la barrera. La presión superficial de la monocapa y el área de la cuba son monitoreadas continuamente durante el proceso de compresión. La presión superficial se mide por el método de placa de Wilhelmy. En este método se mide la fuerza debida a la tensión superficial en la placa suspendida (generalmente de platino), de manera tal que se encuentra

parcialmente inmersa en la subfase. La fuerza es convertida en tensión superficial (mN/m o dinas/cm) con la ayuda de las dimensiones de la placa.



**Figura III.1.2. A-** Representación esquemática de una Balanza de Langmuir. **B-** Esquema de una isoterma de Langmuir con regiones diferenciadas según estados de fase y transiciones de fase. Las líneas de punto muestran el área extrapolada ( $A_0$ ) de las diferentes fases a  $\pi=0$  mN/m. El área molecular alcanzada al momento del colapso ( $\pi_c$ ) de las partículas en la interfase ( $\sim 40 \text{ \AA}^2/\text{partícula}$  en el ejemplo), puede definirse como  $A_C$ . Adaptado Davies, J. T., Rideal, E. K. *Interfacial Phenomena*; Academic Press Inc. London, England, 1961.

Por medio de estos dos conjuntos de datos, **II** y **A**, es posible obtener una isoterma de presión superficial-área a temperatura constante, como se muestra en la **Figura III.1.2B**. Luego, considerando las dimensiones de la cuba (generalmente  $\text{cm}^2$ ) y la cantidad de moléculas dispersadas en la interfase, es posible calcular el área molecular promedio que tiene el anfifilo a las diferentes presiones de superficie.

Durante la compresión, podemos estudiar diferentes propiedades que dependen del área molecular, como densidad superficial del anfifilo, densidad de carga superficial, compresibilidad superficial ( $C_s$ , módulo de Young), y módulo de compresibilidad ( $C_s^{-1}$ ).<sup>24</sup> Las diferentes discontinuidades observadas a lo largo de una isoterma están asociadas a diferentes *cambios de fase* experimentados por las monocapas de anfifilos y su comportamiento está determinado por diversos factores tales como, propiedades fisicoquímicas del anfifilo y/o los materiales que forman parte de la monocapa, temperatura y composición de la subfase, pH, etc.<sup>24,27</sup> Así, los muchos estados existentes en las monocapas dependen de las fuerzas cohesivas, repulsivas y atractivas

experimentadas por las moléculas en la interfase agua/aire durante la compresión. Por ejemplo, una longitud creciente de las cadenas hidrocarbonadas de los anfifilos tendrá como resultado una mayor prevalencia de fuerzas de van der Waals en las interacciones establecidas, de igual modo que la presencia de grupos ionizables dará lugar a efectos de repulsión/atracción de cargas que guiarán los patrones de interacción de distintas formas.<sup>25</sup> Las distintas regiones de una isoterma son de manera general, distinguidas a través de una terminología asociada a cada estado de fase. Cuando las moléculas disponen de un área suficientemente grande como para que no interaccionen entre sí, las monocapas existen en estado gaseoso (**G**) y a través de la subsecuente compresión, pueden alcanzar diferentes estados de fase. Los diferentes estados de fase que se alcanzan, dependerán de cada anfifilo en particular. Hay anfifilos que a lo largo de toda la isoterma exhiben una única fase, y otros que pueden presentar más de un estado de fase con regiones de transición de fases, en donde se produce la coexistencia de las mismas. En el ejemplo mostrado en la **Figura III.1.2B**, se observa que luego de la fase **G**, se alcanza una fase líquido expandida (**LE**) pasando por una primera transición de fase **G-LE**. Al seguir la compresión, la fase **LE** experimenta una transición (**LE-LC**), y pasa a un estado líquido-condensado (**LC**). A mayores densidades (o menores áreas), la monocapa finalmente alcanza el estado sólido (**S**). Si la monocapa se comprime después de alcanzar su máximo empaquetamiento, la misma colapsará en estructuras tridimensionales, o estados que son generalmente caracterizados por la formación de multicapas. El colapso ( $\pi_c$ ) es usualmente visto como una rápida disminución en la presión superficial o como una ruptura horizontal en la isoterma, si la monocapa se encuentra en estado líquido.<sup>19,28</sup>

Las isotermas de Langmuir nos permitirán entonces, estudiar cambios significativos en las propiedades físicas y químicas que los films lipídicos experimenten como consecuencia de la interacción en presencia de las nanopartículas.<sup>21</sup> Una manera clásica de determinar el tipo de interacción entre los componentes de la monocapa, es examinar como los cambios de composición afectan el área molecular media en el film mixto.<sup>26,27</sup> El área molecular media obtenida de manera experimental para el film mezcla, puede compararse con el área ideal considerando la isoterma de cada componente puro (NPs o lípido) y la fracción molar en que se encuentra en la mezcla a una presión de superficie específica. Como se define en la ecuación **III.1.3**, las áreas esperadas ( $A_{ideal}$ ) son calculadas sumando las áreas moleculares de los componentes individuales puros ( $A_n$ ), acorde a las fracciones molares en la mezcla ( $X_n$ ).<sup>24</sup>

$$A_{ideal} = [A_1 \cdot X_1 + A_2 \cdot X_2]_{\pi} \quad \text{(III.1.3)}$$

Dado que la interacción ideal considera la aditividad de las secciones transversales de las moléculas en la interfase (componentes ubicados uno al lado de otro en determinadas proporciones), un fenómeno de desviación negativa con respecto al área ideal (es decir,  $A_{exp} < A_{ideal}$ ), es entendido como un comportamiento de *condensación*, y sugiere un acomodamiento intermolecular entre los lípidos que comprenden la monocapa (ej. Efecto cavidad, efecto paraguas); este comportamiento también puede atribuirse a la pérdida de material de la interfase. Por el contrario, una desviación positiva con respecto al área ideal ( $A_{exp} > A_{ideal}$ ) sugiere un comportamiento de expansión del film mixto, evidenciando un fenómeno de interacción a distancia de los componentes en la interfase. Fuerzas electrostáticas de repulsión intermoleculares podrían ser causantes de este tipo de comportamientos.<sup>24</sup>

La expresión recíproca para la compresibilidad bidimensional ( $C_S^{-1}$ ) de una monocapa a diferentes áreas, definida por (III.1.4), permite obtener información valiosa acerca de las propiedades reológicas del film formado<sup>27</sup>:

$$C_S^{-1} = -A \left( \frac{d\pi}{dA} \right)_T \quad (\text{III.1.4})$$

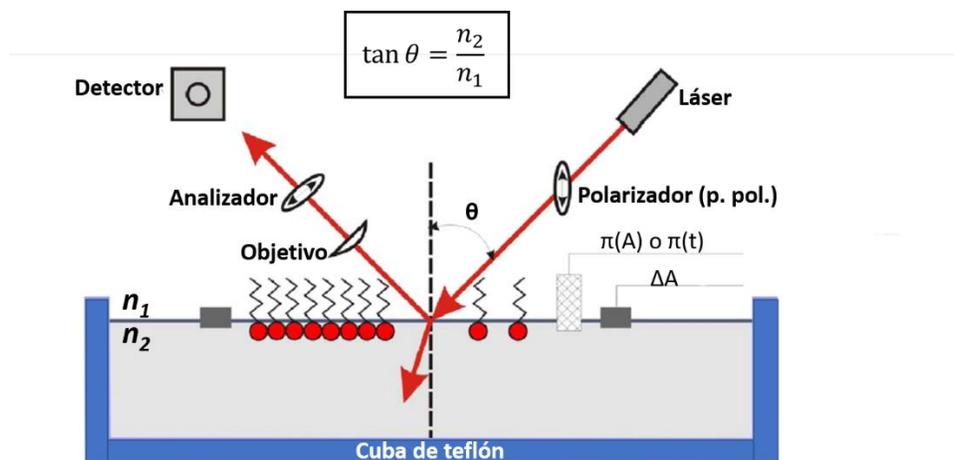
Donde  $\pi$  es la presión superficial medida a cada área ( $A$ ) a lo largo de toda la isoterma. Así, para una superficie limpia,  $C_S^{-1}$  tenderá a cero, y su magnitud se incrementará con la cantidad de material de tensoactivo, presente en la superficie. También,  $C_S^{-1}$  dependerá del estado de fase del film, siendo mayor para films más condensados.<sup>24</sup> De igual manera que en el cálculo de diferencias en áreas moleculares, cuando se estudian mezclas binarias en la interfase, la aditividad ideal de los módulos de compresibilidad ( $\overline{C_S^{-1}}$ ), también puede ser modelada teniendo en cuenta los módulos de compresibilidad individuales para cada componente puro ( $C_{S_n}^{-1}$ ), acorde a la fracción de área molecular ( $A^n$ ) y fracción molar ( $X^1$ ) en la que se encuentran (III.1.5).<sup>29</sup> Entonces, a una dada presión superficial constante:

$$\overline{C_S^{-1}} = \left( X_1 \left( \frac{C_{S1}^{-1}}{A_1} \right)_\pi + X_2 \left( \frac{C_{S2}^{-1}}{A_2} \right)_\pi \right) (X^1 A^1 + X^2 A^2)_\pi \quad (\text{III.1.5})$$

$C_S^{-1}$  provee información acerca de la elasticidad del empaquetamiento lateral (facilidad/resistencia a la compresión lateral) dentro de la monocapa. Además, en contraste con el cálculo de áreas de condensación, los valores de  $C_S^{-1}$ , resultan más sensibles a cambios súbitos en la estructura lipídica durante la interacción lateral con lípidos modelo de biomembrana como el colesterol.<sup>26</sup>

- **Microscopía de Ángulo de Brewster (BAM)**

A lo largo de muchas décadas durante el siglo 20, la medición de presión superficial fue la principal fuente de información acerca de las monocapas de la interfase aire/agua. Con ella, es posible deducir la presencia de diferentes fases en las monocapas, a través de la existencia de una meseta en isothermas de presión superficial vs. área molecular. Sin embargo, las mediciones de  $\pi$ -A de las isothermas, proveen resultados termodinámicos y, en consecuencia, la evidencia y la caracterización de fenómenos estructurales en la mesoescala son excluidos cuando sólo se emplea esta técnica. La microscopía de ángulo de Brewster (BAM) representa un método poderoso desarrollado para la visualización de la topografía y la textura de monocapas de anfífilos o surfactantes en la escala mesoscópica, sin ninguna perturbación externa debido a que no se requiere la utilización de sondas o marcadores.<sup>30,31</sup> Esta técnica se basa en los principios de la espectroscopía de reflexión (**Figura III.1.3**).



**Figura III.1.3.** Representación esquemática del arreglo experimental y principio físico de la microscopía de ángulo de Brewster (BAM). Adaptado de Vollhardt, D. Brewster Angle Microscopy: A Preferential Method for Mesoscopic Characterization of Monolayers at the Air/Water Interface. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2014**, 19 (3), 183–197.

El haz de un láser es polarizado paralelo al plano de incidencia y dirigido en el ángulo de Brewster ( $\sim 53^\circ$  para el agua) sobre la interfase aire/agua. Bajo estas condiciones, la luz no es reflejada. Sin embargo, la adición de un film en la interfase aire/agua, produce un cambio en el

índice de refracción que resulta en la reflexión de la luz en dirección a un detector (cámara CCD) que provee imágenes en tiempo real de la interfase. El detector transforma la señal medida de luz reflejada en una imagen en escala de grises. La intensidad del gris de la imagen es proporcional al cuadrado de la altura del film que la genera ( $R \cong h^2$ ). En una imagen obtenida por BAM las áreas oscuras de igual intensidad de gris que la interfase limpia, indican ausencia del film en esa región, en tanto que zonas claras indican la presencia de surfactante y mientras más clara sea la imagen, mayor es la altura o el índice de refracción de la monocapa en esa región. El arreglo experimental incluye también una balanza de Langmuir que provee información adicional sobre el empaquetamiento del film registrando los cambios en la presión superficial luego de la reducción del área molecular (cambios denotados por la isoterma).

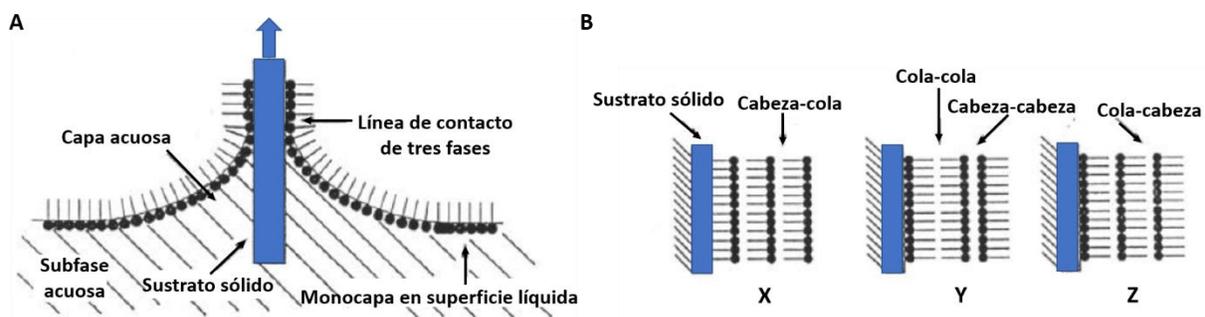
- **Caracterización de films depositados por la técnica de Langmuir-Blodgett mediante Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)**

La técnica de Langmuir-Blodgett ofrece una de las formas más simples y robustas para la preparación de ensamblajes moleculares altamente organizados, los cuales poseen potenciales aplicaciones en sensores, optoelectrónica, procesamiento de señales ópticas, interruptores ópticos digitales y modelos de biomembranas soportadas.<sup>19,32</sup> En este método, un sustrato sólido es inmerso verticalmente en una monocapa previamente organizada sobre la superficie de una subfase acuosa, dispuestas en una balanza de Langmuir. El procedimiento es realizado a una presión superficial constante (monitoreada por la placa de Wilhelmy), la cual se alcanza por medio de la reducción del área a través del desplazamiento de las barreras móviles. A este arreglo experimental convencional, le es incorporado un brazo mecánico controlado por una computadora denominado *dipper* o inmersor. Por medio de la direccionalidad impartida en los movimientos de inmersión verticales del brazo mecánico (arriba o abajo), es posible lograr la adsorción de la monocapa flotante sobre el sustrato sólido a una dada presión (**Figura III.1.4A**). Estas estructuras de ensamblajes supramoleculares sobre superficies sólidas transferidas por vías de esta metodología, son denominadas films de Langmuir-Blodgett (o films LB). Si el proceso es sucesivamente repetido, es posible preparar films en multi-capas.

Cuando el sustrato sólido es de naturaleza hidrofílica (vidrio, SiO<sub>2</sub>, etc.) la primera capa es depositada levantando el sustrato sólido desde la subfase hacia el aire a través de la monocapa,

mientras que si el sustrato sólido es hidrofóbico (HOPG, SiO<sub>2</sub> silanizado, etc.) la primera capa es depositada sumergiendo el sustrato desde el aire hacia la subfase a través de la monocapa. Asimismo, existen muchos parámetros que afectan la calidad de la película LB que se produce, tales como la naturaleza de la película extendida, la composición y la temperatura de la subfase, la presión superficial durante la deposición y la velocidad de deposición, el tipo y naturaleza del sustrato sólido y el tiempo de exposición del sustrato sólido al aire o en la subfase entre los ciclos de deposición.<sup>33</sup>

La cantidad y la calidad de la monocapa depositada en un soporte sólido se mide por la relación de transferencia (*transfer ratio* o *Tr*). Este factor es definido como la relación entre la disminución en el área de la monocapa durante la deposición, *At*, y el área de sustrato *As*. Para una transferencia ideal, el *Tr* resulta igual a 1.



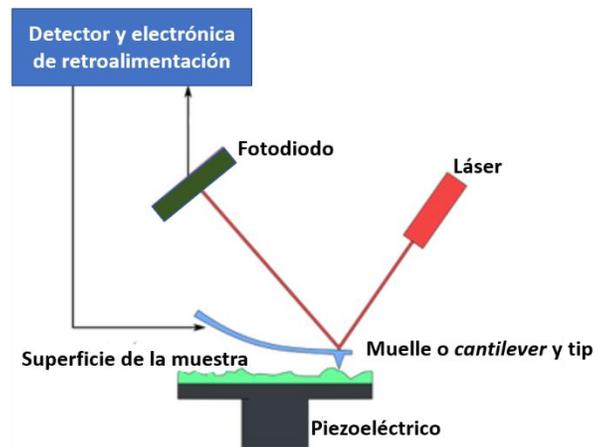
**Figura III.1.4.** A- Esquema de deposición de una monocapa sobre un sustrato sólido por medio de la técnica de Langmuir-Blodgett. B- Arreglos moleculares posibles a través de distintas metodologías de deposición. Adaptado de Birdi, K. S. *Lipid and Biopolimer Monolayers at Liquid Interfaces*; Plenum Press: New York, USA., 1989.

La estructura y orientación de las moléculas anfifílicas depositadas, está gobernada por el ángulo de contacto entre la monocapa y la superficie sólida. Las monocapas depositadas, han sido caracterizadas en arreglos moleculares de tipos *x*, *y*, *z* (**Figura III.1.4B**). De estos tres tipos de arreglos, el más empleado es el *y*, el cual es producido cuando la transferencia de la monocapa transcurre con la inmersión del sustrato hacia arriba y hacia debajo de la interfase. Por otra parte, cuando la transferencia del film tiene lugar cuando el sustrato es únicamente sumergido, se denomina film LB tipo *x*; mientras que, si la deposición transcurre por medio de la sustracción del

sustrato sólido desde el bulk de la subfase hacia afuera de la interfase, adquiere la denominación tipo z.<sup>34</sup>

Uno de los factores determinantes que convierten al sistema de films de LB, en una de las plataformas más estudiadas como estructuras con aplicación tecnológica y biomédica es la amplia gama de herramientas de caracterización que permiten obtener información relevante acerca de los patrones de ensamblajes supramoleculares diseñados sobre los sustratos sólidos. Estos films han sido caracterizados por espectroscopía UV-Visible, espectroscopía de fluorescencia (FL), Microscopía de barrido electrónico (SEM), Microscopía de fuerza atómica (AFM), RAMAN, FT-IR, etc.<sup>33</sup> Entre estas metodologías, la microscopía de fuerza atómica se destaca en la actualidad como una de las técnicas más empleadas para la exploración de la estructura de muestras biológicas en tiempo real, alcanzando una resolución (sub) nanométrica y una alta sensibilidad para la detección de cambios en la magnitud de fuerzas electrostáticas. Con el advenimiento de las nanobiotecnologías emergentes, AFM ha permitido una gran accesibilidad a información morfológica y topográfica precisas, con las cuales es posible llevar a cabo estudios de interacción entre nanomateriales y biomembranas, soportados (adsorbidos) en sustratos sólidos.<sup>35–38</sup>

Brevemente, la instrumentación de AFM consiste en un tip (punta fina) montada al final de un muelle o *cantilever*, el cual le permite al tip moverse hacia arriba y abajo a medida que se escanea la muestra. Este muelle típicamente posee una muy baja constante de fuerza, lo cual le permite al AFM controlar la fuerza entre el tip y la muestra con gran precisión. La distancia entre la punta y los átomos de superficie, está en el orden donde se manifiestan diferentes fuerzas dependiendo del tipo de contacto, tales como van der Waals, fuerzas de capilaridad, fuerzas electrostáticas, etc. A separaciones relativamente grandes, cualquier fuerza atractiva entre los átomos de la muestra y aquellos en la punta del tip, resulta muy pequeña como para exhibir un efecto significativo (muelle sin deflexión aparente). A medida que la separación se reduce, la fuerza entre el tip y la muestra incrementa rápidamente y el muelle comienza a curvarse bajo la influencia de las fuerzas atractivas (usualmente van der Waals, dominante a separaciones grandes). Seguidamente, el tip de AFM experimenta un aparente contacto con la muestra, y el muelle exhibe una curvatura que tiende a extraer el tip de la muestra, hacia la dirección opuesta. Estas sucesivas deflexiones que dependen de la topografía de la superficie, son monitoreadas por un fotodetector que traduce los movimientos del muelle en una señal óptica, a lo largo de todo el escaneo. En la **Figura III.1.5** se muestra el esquema operacional de esta técnica.



**Figura III.1.5.** Representación esquemática de un microscopio de fuerza atómica (AFM). Adaptado de Morris, V. J., Kirby, A. R., Gunning, A. P. *Atomic Force Microscopy for Biologists*, 2nd edition.; Imperial College Press: London, England, 2010.

Existen muchos modos disponibles para realizar AFM, los cuales se encuentran diferenciados por la naturaleza de la interacción de fuerzas involucradas en cada caso: *modo contacto*, *modo sin contacto*, *modo oscilante*. Tal como se infiere, en el modo de contacto, el tip de AFM se encuentra en contacto directo con la superficie de la muestra y la interacción tip-muestra es de naturaleza repulsiva. En el modo sin contacto, el tip nunca toca la superficie de la muestra. Así, el muelle oscila con una amplitud de unos pocos nm mientras se desplaza por encima de la muestra. Las fuerzas de van der Waals de larga distancia entre la muestra y el tip, producen un efecto de “amortiguación” en el muelle oscilante, reduciendo su oscilación a medida que se aproxima a la superficie. Por último, el modo oscilante o *tapping*, representa una mezcla entre los dos modos previamente mencionados y es también el modo de escaneo comúnmente más seleccionado para análisis de materiales. En este caso, el muelle es deliberadamente excitado por un oscilador eléctrico a amplitudes de hasta 100 nm, de manera que efectivamente se producen saltos hacia arriba y abajo (toca la superficie de manera intermitente) a medida que viaja sobre la muestra. Los contactos oscilatorios tip-muestra son producidos en períodos de muy corta duración (generalmente segundos) y le confiere a este modo ciertas ventajas, entre las cuales se encuentran la reducción de la fuerza lateral en la muestra. Esto es muy útil a la hora de realizar escaneos por medio de esta técnica, e implica que puedan obtenerse imágenes de muestras muy delicadas (ej. Redes de moléculas) sin distorsiones severas o daños impartidos por estas fuerzas de corte.<sup>39</sup>

## III.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Durante el desarrollo experimental abarcado en este capítulo se propuso estudiar la interacción entre las nanopartículas de plata funcionalizadas con ácido oleico (AgNP-OA), y fosfolípidos modelos de biomembrana. Para ello, se implementó el modelo de monocapas de Langmuir con el fin de adquirir información reológica y termodinámica relevante, acerca de las proporciones en que las propiedades de las biomembranas se ven modificadas debido a la presencia de las nanopartículas. Dentro de los modelos de membrana empleados, se seleccionaron monocapas de lípidos simples (principales constituyentes de membranas celulares) con diferentes estados de fase, y una mezcla de lípidos que mimetiza el estrato córneo (SCM).

En forma paralela, se procuró obtener información topográfica y morfológica de estos films llevando a cabo diversas técnicas de microscopía. Por un lado, se procedió a realizar mediciones por microscopía de ángulo de Brewster (BAM) de los films formados en la interfase agua/aire. Dado que esta técnica es desarrollada directamente sobre la monocapa a lo largo de su compresión (y/o compresión-expansión) en tiempo real, la misma permite obtener información valiosa acerca de las variaciones en la morfología de los films como resultado de la interacción NP-lípido a diferentes presiones de superficie. Por otro lado, se propuso estudiar la estructura, defectos y propiedades mecánicas de films de Langmuir transferidos a un sustrato sólido por medio de la técnica de Langmuir-Blodgett. Como herramienta de análisis de estas estructuras se empleó microscopía de fuerza atómica (AFM), la cual permite, además, determinar la presencia de posibles patrones estructurales formados por films NP-lípido que podrían no ser observados durante los experimentos en superficie líquida.

De manera subsiguiente, se procedió a efectuar estudios concernientes a la estabilidad, comportamiento y desempeño de las AgNP-OA, frente a biomembranas en su rol como agentes antimicrobianos. Por medio de espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS), se evaluó la adsorción de fosfolípidos sobre la superficie de las AgNP-OA. Considerando los antecedentes descritos en la primera parte de este capítulo (**III.1.1-2**) acerca del rol de las AgNPs como agentes biocidas, se propuso estudiar la capacidad de las AgNP-OA hidrofóbicas para liberar iones plata en medio acuoso, y una vez que se encuentran incorporadas dentro de un modelo de biomembrana, en este caso vesículas multilamelares (MLVs). Para ello, se implementó un método de

cuantificación colorimétrica de iones  $\text{Ag}^+$  por espectroscopía UV-Visible, y se estudió la liberación de estos iones tanto en agua como en solución fisiológica (NaCl 145 mM), a través del tiempo.

### III.3- MATERIALES Y MÉTODOS

#### III.3.1- Monocapas de Langmuir

Los films de Langmuir de AgNP-OA puras, lípidos puros (o mezclas de lípidos) y AgNP-OA/lípido se obtuvieron por medio del sembrado de soluciones stock de las muestras correspondientes en la interfase aire/agua de una balanza de Langmuir. Soluciones de POPC, DPPC, DMPC, DSPC y mezcla 50:50 DMPC/DSPC ( $X_{\text{DMPC}} = 0,5$ ,  $X_{\text{DSPC}} = 0,5$ ) fueron preparadas en cloroformo. La mezcla de estrato córneo (SCM) fue preparada mezclando ceramida C24 (Cer24), ácido lignocérico (LA) y colesterol (Cho) en proporción 1:1:1 con la adición de un 5 % p/p de colesterol sulfato (ChoS) empleando *n*-hexano:etanol (0,98:0,02) como solvente.<sup>40</sup>

Las muestras conteniendo AgNP-OA/lípidos fueron típicamente preparadas mezclando los volúmenes adecuados de soluciones stock de lípidos y dispersiones de AgNP-OA en *n*-hexano, manteniendo una fracción molar de AgNP-OA ( $X^{\text{AgNP-OA}}$ ) de 0,0005 (correspondiente a 0,5 mg/mL de AgNP-OA o 0,95  $\mu\text{M}$  AgNP-OA). La fracción molar de  $X^{\text{AgNP-OA}} = 0,0005$ , fue seleccionada con el fin de obtener resultados comparativos con datos previamente reportados en la bibliografía.<sup>19,20,28</sup> La concentración total de plata en cada solución stock AgNP-OA/lípido fue verificada por el método colorimétrico de TMB.

Las monocapas se obtuvieron por sembrado de AgNP-OA puras, lípidos puros o mezclas AgNP-OA/lípido en la interfase acuosa de un equipo KSV minitrough (KSV, Helsinki, Finland) formado por una cuba de Teflón<sup>®</sup>, barreras de Derlin<sup>®</sup> y empleando un platillo de Wilhelmy de platino para la medición de la presión superficial ( $\pi$ ). El volumen de la subfase empleada fue de 272 mL (agua Milli-Q) siendo el área máxima de la cuba de 24750 mm<sup>2</sup>. Se esperó un tiempo de 10 min luego del sembrado de las muestras en la interfase aire/agua y antes de llevar a cabo la compresión, a modo de permitir la evaporación del solvente orgánico de dispersión. Adicionalmente, se trabajó a una temperatura de 24-25 °C con una velocidad de compresión de 10 mm/min. La ausencia de impurezas superficialmente activas en la subfase y el solvente de dispersión fueron medidos

diariamente. Al menos tres isotermas de presión superficial versus área media fueron medidas y posteriormente promediadas para asegurar un comportamiento reproducible.

Las concentraciones de las soluciones de los lípidos fueron calculadas a partir de sus isotermas de Langmuir comparando con valores de bibliografía. De manera general, se asigna para una dada presión de superficie, un área molecular promedio. Puesto que en el experimento se conoce el volumen y la concentración de la solución sembrada en la interfase y el área que ocupan los elementos a esta  $\pi$ , es posible por extrapolación calcular la concentración de la solución de lípido. La reproducibilidad de las isotermas de Langmuir se encuentra dentro de la media del error estándar (SEM) de 1 mN/m para la presión superficial y debajo del 1% para el área de la media.

Para evaluar las desviaciones de las isotermas mezclas con respecto al comportamiento ideal, se compararon las isotermas experimentales de las monocapas resultantes de las mezclas lípido/AgNPs-OA con la isoterma de la mezcla ideal en donde se asume que no ocurren interacciones entre los distintos componentes de la monocapa. Las isotermas mezclas ideales se calcularon de acuerdo a la ecuación **III.3.6**.

$$A_{ideal} = [A^{AgNP-OA} \cdot X^{AgNP-OA} + A^L \cdot X^L]_{\pi} \quad (\text{III.3.6})$$

Donde  $A_{ideal}$  es el área calculada a presión superficial constante ( $\pi$ ) para films mixtos ideales, mientras que  $A^{AgNP-OA}$ ,  $A^L$  son las áreas correspondientes obtenidas para las isotermas de AgNP-OA pura y lípido puro, y  $X^{AgNP-OA}$ ,  $X^L$  son las fracciones molares de AgNP-OA y lípido, respectivamente presentes en la mezcla.

El módulo elástico interfacial de compresibilidad de área, el cual refleja las variaciones en elasticidad que presenta un film en el plano, fue calculado como  $C_s^{-1} = -A \left( \frac{d\pi}{dA} \right)$  donde  $C_s$  es la compresibilidad y  $\pi$ , la presión superficial medida a cada punto de las áreas (A) de la isoterma. Los valores de elasticidad en el plano para las mezclas de AgNP-OA con diferentes lípidos se obtuvieron de las isotermas de Langmuir experimentales medidas y posteriormente se compararon con la elasticidad para films mixtos ideales. Este último parámetro se calculó para mezclas binarias empleando el  $C_s^{-1}$  de los componentes puros, las fracciones molares ( $X^{AgNP-OA}$  y  $X^L$ ), y el área molecular media ( $A^{AgNP-OA}$  y  $A^L$ ) en la mezcla a las presiones ( $\pi$ ) correspondientes (**Ec. III.3.7**).

$$\overline{C_s^{-1}} = \left( X^{AgNP-OA} \left( \frac{C_s^{-1} A_{AgNP-OA}}{A_{AgNP-OA}} \right)_{\pi} + X^L \left( \frac{C_s^{-1}}{A_L} \right)_{\pi} \right) + (X^{AgNP-OA} A^{AgNP-OA} + X^L A^L)_{\pi} \quad (\text{III.3.7})$$

### III.3.2- Caracterización topográfica y morfológica

#### • Microscopía de Ángulo de Brewster (BAM)

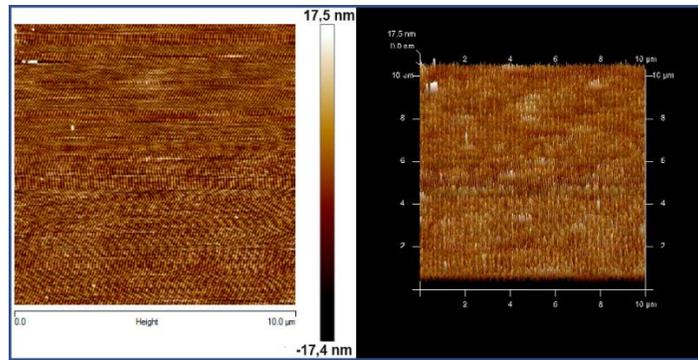
La topografía superficial, morfología y textura de los films, se estudió por medio de Microscopía de Ángulo de Brewster (BAM). El equipo empleado fue un EP<sup>3</sup>-BAM (Nanofilm Technologie GmbH, Göttingen, Germany) con un objetivo de 20X. Las imágenes fueron capturadas con una cámara CCD (dispositivo de carga-acoplada enfriado) con una velocidad de 25 Hz. La longitud de onda del láser utilizado fue 532 nm y el ángulo de incidencia de 53,1° (ángulo de Brewster) fue determinado por el equipo empleando cuadrados mínimos a partir de una curva de trabajo de la señal detectada en función del ángulo. La presión superficial fue medida por medio de una balanza de Langmuir montada debajo del microscopio, adquiriendo las micrográficas del film a medida que se realiza la compresión de la monocapa. Estas últimas se prepararon de la misma manera que durante el registro de las isoterma, con un tiempo inicial de espera de 10 minutos, velocidad de compresión de 5 mm/minuto y 25 °C. La compresión del film se detuvo durante los registros de imágenes para disminuir su movimiento. Como se mencionó anteriormente, en BAM, la intensidad de la luz reflejada representa un “espesor óptico” operacional que es proporcional al espesor ( $d$ ) y al índice de refracción ( $n$ ) del film.

#### • Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) sobre films de Langmuir-Blodgett (LB)

Adicionalmente, se realizaron análisis por microscopía de fuerza atómica, con el objetivo de obtener datos comparativos acerca de la estructuración y estabilidad de los films de AgNP-OA, SCM y AgNP-OA/SCM formados, y posteriormente depositados sobre un sustrato sólido. Para ello, se comenzó con la transferencia de las monocapas al sustrato, mediante la técnica de Langmuir-Blodgett. Haciendo uso del módulo inmersor anexo a la balanza de Langmuir, vidrios cubre-objetos (soporte sólido) fueron completamente insertados en la subfase acuosa. Films de

AgNP-OA, SCM y AgNP-OA/SCM fueron dispersados en la interfase aire/agua, como fue descrito en **III.3.1**. Luego de ello, se comenzó la compresión inicial por medio de las barreras móviles hasta alcanzar las presiones superficiales a las cuales se efectuó la transferencia. A los fines de obtener datos reales y comparables con respecto a la alteración de la membrana de estrato córneo como resultado de la adición de las nanopartículas, films de SCM y AgNP-OA/SCM fueron transferidos a presiones superficiales de 30 mN/m. Los films de AgNP-OA en ausencia de lípido fueron transferidos a 5 mN/m, únicamente a fines de visualizar la topografía de las nanopartículas en el soporte sólido, evitando la presencia de aglomerados. Seguidamente, los soportes fueron extraídos verticalmente desde la subfase acuosa hacia el aire a una velocidad de 5 mm/min, manteniendo la presión superficial constante (compensación por medio de barreras de Delrin). En todos los casos se obtuvieron relaciones de transferencia ( $Tr$ ) próximas a 1, dentro del error experimental, para los films depositados a ser analizados.

Los vidrios cubreobjetos empleados para las transferencias de films LB, atravesaron previamente por un procedimiento de limpieza y activación hidrofílica. En primer lugar, los vidrios son lavados con una solución de detergente no iónico 1:100% v/v y estacionados en este medio, durante 30 min. Luego de sucesivos enjuagues con agua MilliQ, se secaron en una estufa para proseguir con el trabajo de activación. Esta activación genera una mayor disposición de grupos hidroxilo libres en la superficie del vidrio, permitiendo una mejor adsorción de las cabezas polares de los anfífilos de la monocapa sobre el sustrato sólido. Para esto, los vidrios lavados y secados, se incubaron en solución fresca de piraña preparada *in situ* ( $H_2SO_4:30\%H_2O_2$  3:1), durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se enjuagaron reiteradamente con agua MilliQ y se dejaron secar en estufa a 100°C durante 1 h. En la **Figura III.3.6** se muestra la topografía evaluada a través de AFM de los sustratos sólido activados. Dicha topografía, representa el blanco que se descontará luego de las imágenes finales para cada muestra analizada.



**Figura III.3.6.** Imágenes de AFM de vidrios cubreobjetos luego de los procedimientos de limpieza y activación hidrofílica para la deposición de los films LB.

Una vez transferidos, los films de LB de monocapa única, se analizaron por AFM haciendo uso de un instrumento VEECO diInnova (Bruker Corp., Billerica, Massachusetts, USA). Las imágenes fueron obtenidas en modo *tapping* u oscilante, empleando una frecuencia de resonancia aproximada de 300 kHz, una velocidad de escaneo de 1,0 Hz y áreas escaneadas de 10,0x10,0 μm de los films depositados sobre los sustratos sólidos. Las áreas, dimensiones de dominio y rugosidad superficial fueron determinadas haciendo uso del software NanoScope Analysis V.1.40 (Bruker Corp., Billerica, Massachusetts, USA).

### III.3.3- Análisis de adsorción de fosfolípidos sobre las AgNP-OA por medio de XPS

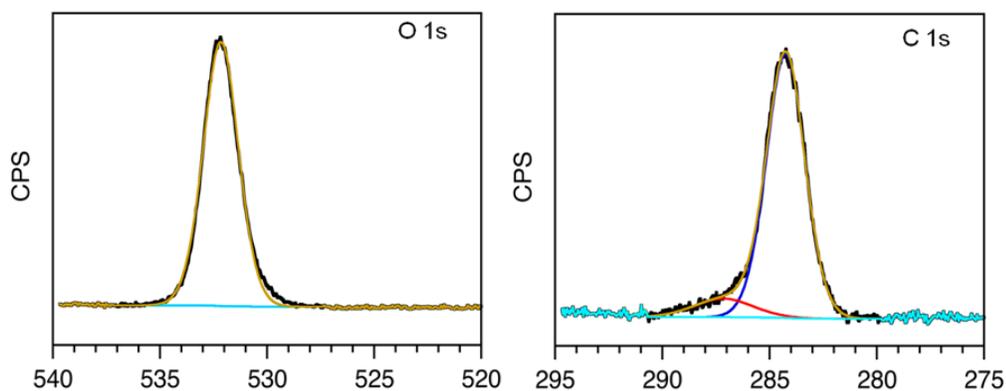
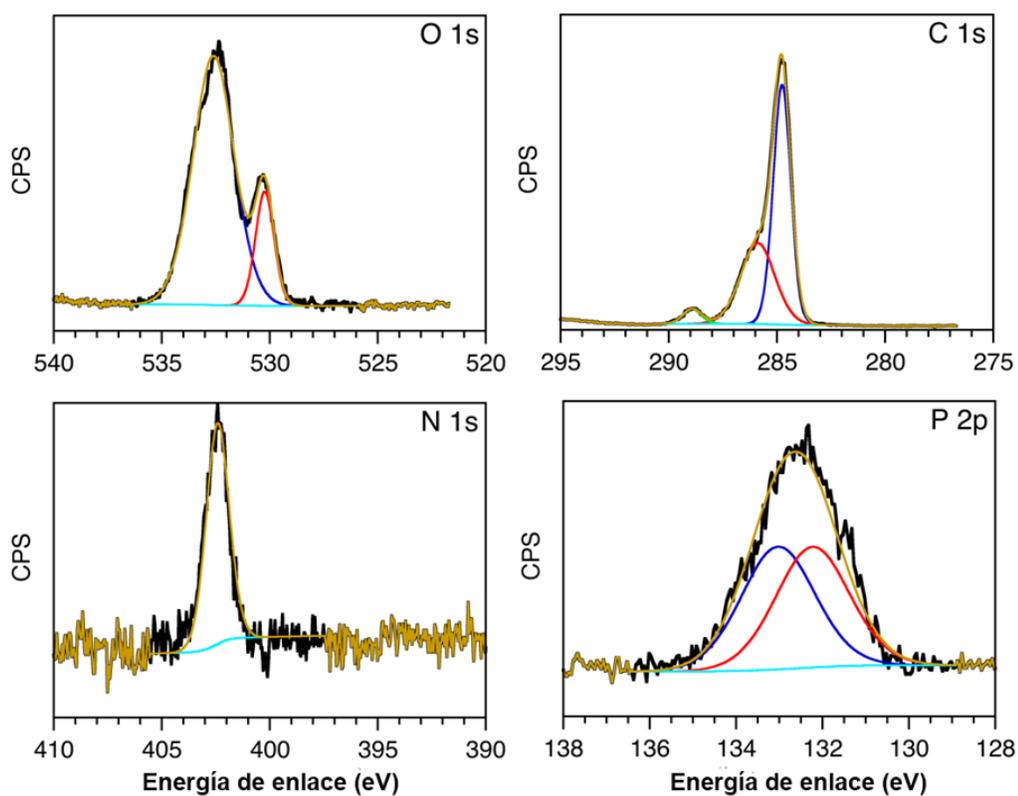
Las composiciones químicas de superficie fueron analizadas por espectroscopía de fotoelectrones de rayos-X (XPS). Los espectros fueron recolectados empleando un equipo Kratos analytical model Axis Ultra DLD, empleando un monocromador de Al Kα a 140W. La información obtenida, se analizó empleando el software CasaXPS, versión 2.3.14 y los ajustes se obtuvieron empleando un modelo Gaussiana-30% Lorentziana y una línea de base Shirley. Las posiciones de los picos fueron referenciadas internamente al pico de C 1s a 284,8 eV.

Mediciones por XPS de alta resolución (HR-XPS) se llevaron a cabo con el fin de evaluar si los fosfolípidos son efectivamente adsorbidos en la superficie de las nanopartículas de plata. Para ello, las muestras se prepararon de la siguiente manera: 200 μL de una dispersión stock de AgNP-

OA/POPC ( $X^{\text{AgNP-OA}} = 0,0005$ ) se colocaron en un vial y seguidamente se evaporó la totalidad del solvente orgánico a través de una corriente de  $\text{N}_2$ , formando un film delgado en las paredes del recipiente. Esta película se suspendió luego en 2 mL de agua MilliQ y se agitó vigorosamente (plancha de agitación con barra magnética) a temperatura ambiente durante 4 días. Con el objetivo de remover la POPC libre de la dispersión, la muestra fue sometida primeramente a un ciclo de centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante fue descartado y el pellet, re-suspendido en 2 mL de cloroformo. Luego de un total de tres ciclos de centrifugado y extracción en cloroformo, el pellet final se suspendió en 50  $\mu\text{L}$  de cloroformo para su posterior deposición sobre un sustrato de Si previamente lavado con solución sulfonítrica (mezcla 2:1  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ ). A modo de control, 50  $\mu\text{L}$  del último sobrenadante se sembraron sobre un sustrato de Si con el objetivo de confirmar la ausencia de POPC libre en el solvente de lavado. Controles de los componentes puros fueron igualmente realizados. La **Figura III.3.7** muestra los espectros de XPS obtenidos para el fosfolípido POPC y el ácido oleico (OA). Los espectros de XPS para las AgNP-OA sintetizadas se muestran en el **Capítulo II**.

Acorde al análisis realizado en esta sección, el espectro de HR XPS del ácido oleico (**III.3.7A**) muestra la región del O 1s donde se visualiza el pico a 532,2 eV característico de los enlaces C-O simples y dobles. La región del C 1s muestra los picos a 284,3 y 287,1 eV atribuidos a los carbonos en las cadenas alquílicas de los OA y a los enlaces C-O simples y dobles de los dominios carboxílicos, respectivamente.

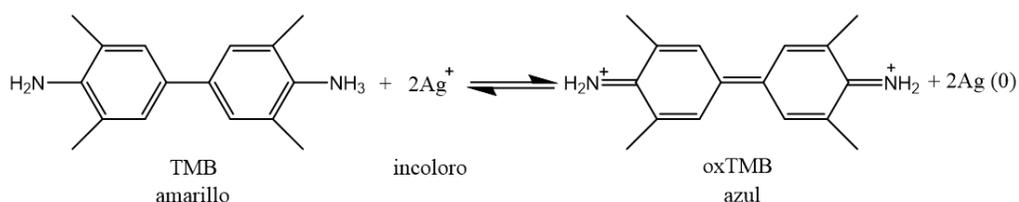
Por otro lado, los espectros HR XPS de la POPC pura (**III.3.7B**) muestran los picos característicos para O 1s, C 1s, N 1s y P 2p. La señal de O 1s puede deconvolucionarse claramente en dos picos, uno centrado en 532,2 eV atribuido a los enlaces C-O simple y doble; y el segundo a 529,8 eV asignado a los enlaces P-O.<sup>41</sup> La región del C 1s muestra el pico más intenso situado en 284,8 eV perteneciente a los carbonos de las cadenas alquílicas de la POPC. Los picos a 285,8, 288,4 and 289,7 eV corresponden a los enlaces carbono-oxígeno simples y dobles de los carboxilatos de la POPC, así como a los enlaces C-N.<sup>42</sup> El pequeño desdoblamiento spin-órbita (1 eV) observado en la señal de P 2p concuerda con lo reportado en literatura, así como el pico centrado en  $\sim 133,6$  eV ( $2p_{1/2}$ ).<sup>43</sup> La región del N 1s muestra el pico a  $\sim 402,5$  eV característico del enlace N-C presente en el grupo colina.

**A- Ácido Oleico (OA)****B- POPC**

**Figura III.3.7.** Espectros de HR XPS de los controles realizados para ácido oleico (panel A) y POPC pura (panel B).

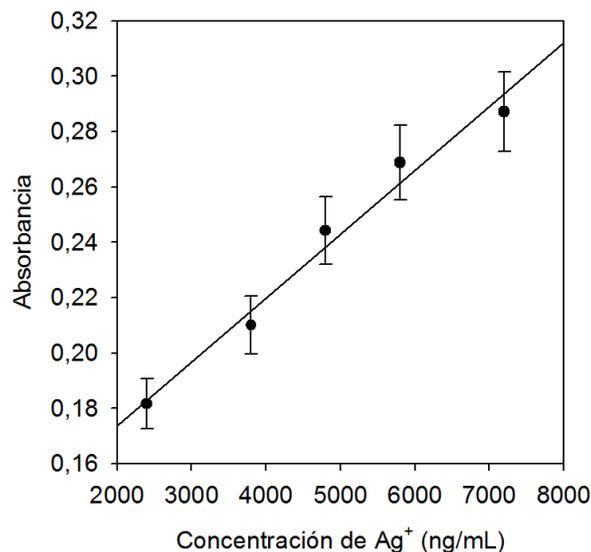
### III.3.4- Cuantificación de iones plata ( $\text{Ag}^+$ )

Para determinar la concentración de  $\text{Ag}^+$  liberada se realizó una cuantificación colorimétrica por reacción de los iones plata con el reactivo TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina), siguiendo la metodología reportada por Gonzalez-Fuenzalida et. al.<sup>44</sup> Durante la reacción redox, se produce la oxidación de TMB (reducción de  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$ ) con su consecuente cambio de color de amarillo a azul, el cual es posible seguir espectrofotométricamente de acuerdo a la siguiente reacción (**Esquema III.3.1**). Es de notar que esta reacción permite la cuantificación de  $\text{Ag}^+$  en presencia de  $\text{Ag}^0$ .



**Esquema III.3.1.** Reacción de oxidación de la TMB en presencia de iones plata.

Típicamente se construyó una curva de calibración añadiendo 1,2 mL de una solución acuosa de  $\text{AgNO}_3$  (de concentraciones entre 2 y 10 ppm) a 100  $\mu\text{L}$  de una solución etanólica de TMB (10 mM) previamente mezclada con 200  $\mu\text{L}$  de una solución buffer acetato de sodio/ácido acético ( $\text{NaAc}/\text{AcH}$ )  $\text{pH}=4$ , 1 M. Luego de un tiempo de reacción óptimo de 15 minutos, se llevó a cabo la medición de absorbancia a 655 nm. La curva de calibración se midió por triplicado a  $25^\circ\text{C}$  (**Figura III.3.8**).



**Figura III.3.8.** Curva de calibración para la cuantificación de Ag<sup>+</sup>, empleando la sonda colorimétrica TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina), R<sup>2</sup>= 0,975.

Con el fin de determinar si las AgNP-OA hidrofóbicas son capaces de liberar iones plata en medio acuoso, se cuantificó la cantidad de iones Ag<sup>+</sup> liberados en el tiempo por parte de estas nanopartículas. Para ello 200  $\mu$ L de una dispersión stock de AgNP-OA (conteniendo 1 mg/mL de AgNP-OA, lo cual aporta  $\sim$ 0,82 mg de Ag<sup>0</sup>) o 200  $\mu$ L de mezclas AgNP-OA:POPC o AgNP-OA:DMPC con una fracción molar de NPs de  $X^{\text{AgNP-OA}} = 0,0005$  (conteniendo AgNP-OA en una concentración de 0,5 mg/mL, lo cual aporta  $\sim$ 0,41 mg de Ag<sup>0</sup>) se colocaron en un vial de vidrio y luego de la evaporación completa del solvente, se añadieron 2 mL de agua Milli Q (ó 2 mL de solución NaCl 145 mM). La mezcla final fue agitada vigorosamente durante todo el experimento. En el caso de la muestra conteniendo NPs/lípido se observó dispersión en el medio acuoso, en tanto que aquella conteniendo solamente AgNP-OA, no se dispersó. Posteriormente, alícuotas de 217  $\mu$ L de cada muestra fueron tomadas a distintos tiempos, a las cuales se les añadieron 100  $\mu$ L de solución TMB (10 mM en etanol) y 683  $\mu$ L de solución buffer NaAc/AcH (pH=4). La liberación de Ag<sup>+</sup> se estudió en agua o en presencia de NaCl con el fin de comparar si la presencia de iones cloruro afecta de algún modo la liberación de iones plata.

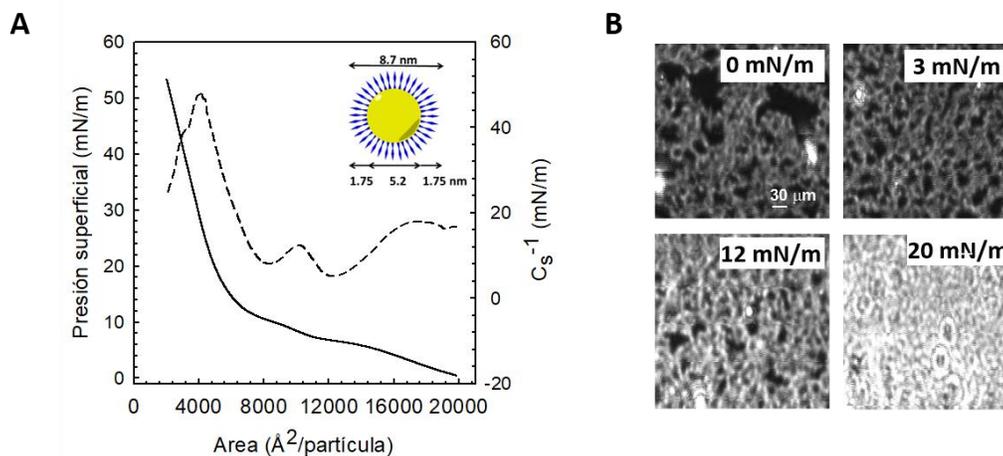
Para cuantificar la cantidad total de plata presente en la dispersión stock de AgNP-OA en *n*-hexano, las nanopartículas fueron previamente digeridas con HNO<sub>3</sub> efectuando la completa oxidación de Ag(0) a Ag(I). Esto se realizó a fines de contar con otra metodología adicional a la de masa pesada de AgNP-OA, para estimar la concentración de AgNP-OA en la solución stock. Para esto, 1 mg de AgNP-OA fueron digeridas empleando HNO<sub>3</sub> al 65%. Una vez completa la disolución total del sólido, se agregaron 200 µL de NaOH 50% P/V a los fines de neutralizar el exceso de protones y se llevó la solución a un volumen final de 2 mL con agua MilliQ. Una alícuota de 50 µL de esta solución fue trasvasada a un vial de vidrio y enrasada a 1,2 mL con solución buffer. Seguidamente, se añadió el volumen necesario de solución buffer/TMB (NaAc/AcH, 200 µL, 1M, pH=4; TMB 100 µL, 10 mM en etanol) a la muestra y se registró la absorbancia a 655 nm luego de 15 minutos de transcurrida la reacción. La cuantificación colorimétrica fue coincidente con la masa pesada dentro del error experimental, obteniéndose una diferencia aproximada 0,2 mg/mL entre las concentraciones calculadas por ambas vías.

## III.4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### III.4.1- Estabilidad, organización y propiedades mecánicas de las AgNP-OA en la interfase aire-agua

La organización de las AgNP-OA en la interface aire/agua se estudió por medio de isothermas de Langmuir ( $\pi$  vs. área media). La **Figura III.4.9A** muestra la isoterma de compresión y el módulo de compresibilidad ( $C_s^{-1}$ ) obtenido para las AgNP-OA. El film formado por estas nanopartículas de plata hidrofóbicas es altamente estable luego de la compresión y permitió realizar una evaluación completa del comportamiento a lo largo de toda la isoterma hasta alcanzar la presión de colapso del film ( $\pi_c$ ), donde tienen lugar transiciones de 2D a 3D con la consecuente formación de material de volumen o multicapas. Cabe destacar que isothermas de films de Langmuir de nanopartículas hidrofílicas, en general, no pueden ser del todo investigadas debido a desorción que estas NPs presentan desde la interface a la subfase mucho antes de alcanzar el colapso del film.<sup>11,15</sup>

A través de los estudios aquí realizados con las AgNP-OA, hemos demostrado que estas nanopartículas hidrofóbicas exhiben una alta presión de colapso, cercana a los 50 mN/m.

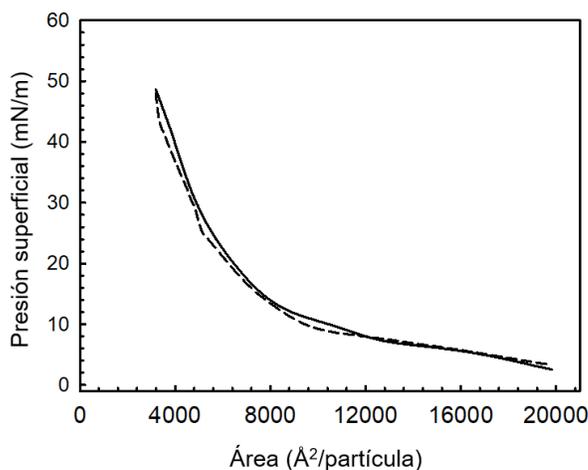


**Figura III.4.9.** (A) Variación de la presión superficial (línea sólida) y módulo de compresibilidad ( $C_s^{-1}$ , línea discontinua) con el área promedio de las AgNP-OA en la interface aire/agua. La imagen zoom (*inset*) muestra el tamaño de las AgNP-OA (núcleo de Ag amarillo, cadenas de OA azules). El área seccional calculada (núcleo de Ag más 2 moléculas de OA) fue de  $\sim 5600 \text{\AA}^2/\text{partícula}$ . (B) Imágenes de BAM de la topografía de las AgNP-OA en la interface aire/agua a la presión de superficie indicada. La barra de escala corresponde a 30  $\mu\text{m}$ .

Respecto a la topografía superficial de films de AgNP-OA obtenida con imágenes de BAM, fue posible observar conglomerados de NPs separados por espacios vacíos en la interface aire/agua (**Figura III.4.9B**) a presiones de superficie bajas. Por encima de los 12 mN/m, tanto la presión superficial y el módulo de compresibilidad como el espesor óptico, se incrementan de manera pronunciada. Luego de esta presión, el espacio vacío es “llenado” debido probablemente a que las NPs experimentan una mayor interacción entre sí, dando como consecuencia el rápido incremento en la presión de superficie y en el módulo de compresibilidad superficial. Estas características revelan la existencia de un film menos elástico. Un comportamiento similar fue reportado por You et. al. para monocapas de Langmuir compuestas por AgNP estabilizadas con oleilamina.<sup>45</sup> El área limitante extrapolada a presión superficial cero ( $A_0$ ) para las AgNP-OA, la cual corresponde a la sección transversal de las NPs en la región más condensada de la isoterma, es de  $\sim 6300 \text{\AA}^2/\text{partícula}$ . Este valor es similar al calculado con el área seccional teórica de las AgNP-OA

( $\sim 5600 \text{ \AA}^2/\text{partícula}$ ) teniendo en cuenta el diámetro del núcleo de plata (5,2 nm) y la longitud de las cadenas de OA completamente extendidas (1,75 nm cada OA), como se muestra en el recuadro de la **Figura III.4.9A**. Estos hallazgos sugieren que por encima de los 12 mN/m, las AgNP-OA se organizan en un arreglo 2D con dislocaciones respecto al plano interfacial, hasta presiones cercanas al colapso.

También se evaluó el comportamiento de los films de AgNP-OA frente a la compresión y posterior expansión (**Figura III.4.10**).



**Figura III.4.10.** Curva de compresión-expansión de las AgNP-OA que corrobora la ausencia de histéresis.

Una vez que el film de AgNP-OA es comprimido hasta las cercanías de su colapso (2 mN/m por debajo de su  $\pi_c$ ), luego de expandirlo, las isothermas prácticamente no presentan histéresis. Este comportamiento indica que el sistema no retiene energía, por ejemplo, en forma de nuevas interacciones partícula-partícula que puedan conllevar a fenómenos de “clustering” o aglomeraciones entre NPs, incluso cuando ellas son forzadas a un contacto íntimo. Los resultados encontrados, contrastan con los observados por Matshaya et. Al., donde para nanopartículas magnéticas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) hidrofóbicas que poseen un tamaño similar e igual agente estabilizante (OA), los films de NP muestran una histéresis importante.<sup>20</sup> En consecuencia, las interacciones interpartícula establecidas en la interface aire/agua podría decirse que no se encuentran únicamente dictadas por las moléculas que estabilizan a las nanopartículas y expuestas directamente al medio, sino que también la naturaleza del núcleo o “core” de las mismas, cumple un importante rol en la

regulación de estas interacciones y la organización que estas estructuras sean capaces de adquirir en las interfaces.

### III.4.2- Interacción de las AgNP-OA con modelos de biomembranas

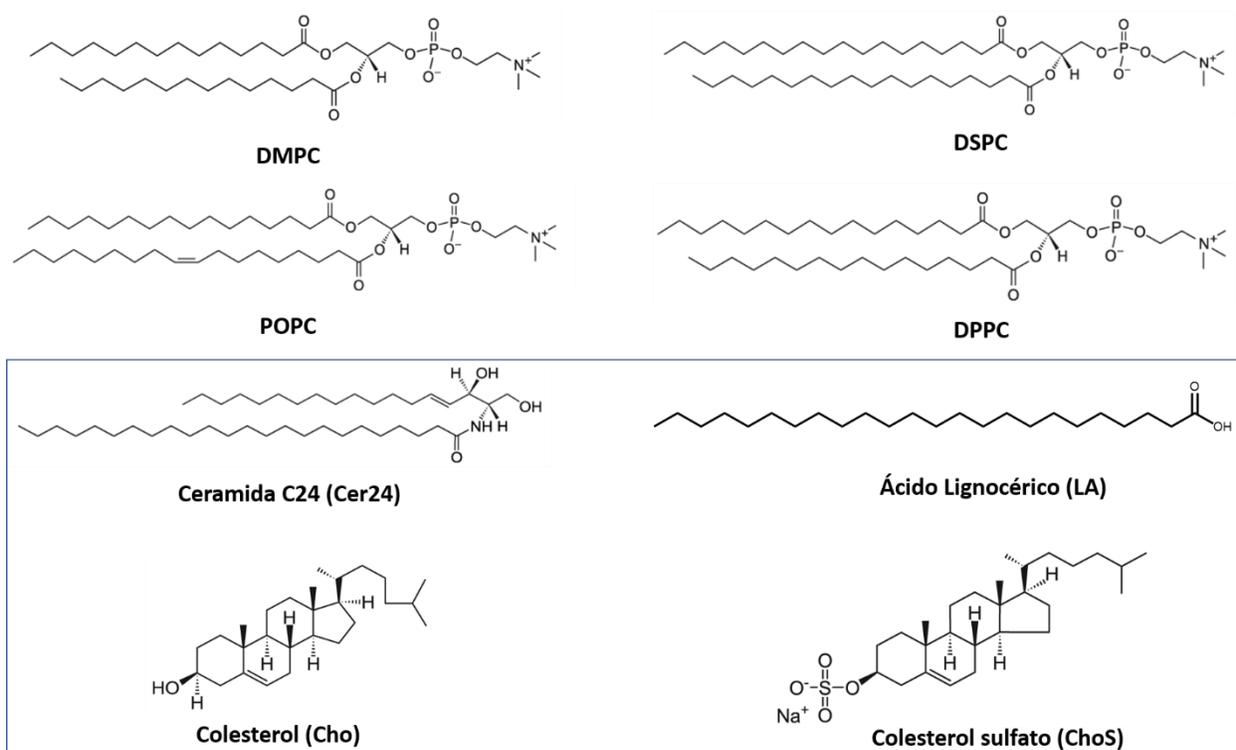
Con el objetivo de explorar como las AgNP-OA interactúan con modelos de biomembrana, y en qué medida se ven modificadas las propiedades de ambas entidades, se estudió cómo interaccionan con modelos de biomembranas de diferente composición y estado de fase. A excepción de la mezcla multicomponente que simula el estrato córneo (SCM), la totalidad de los lípidos utilizados para estos fines pertenecen a la familia de las fosfatidilcolinas (PCs), lípidos zwitteriónicos de gran abundancia en las membranas celulares.<sup>46</sup> La estructura química de estos compuestos se muestra en la **Figura III.4.11**. Las monocapas lipídicas evaluadas incluyeron:

#### Lípidos puros:

- 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DMPC)
- 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC)
- 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DSPC)
- 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPPC)

#### Mezclas lipídicas:

- DMPC/DSPC 50:50
- Estrato córneo (SCM)



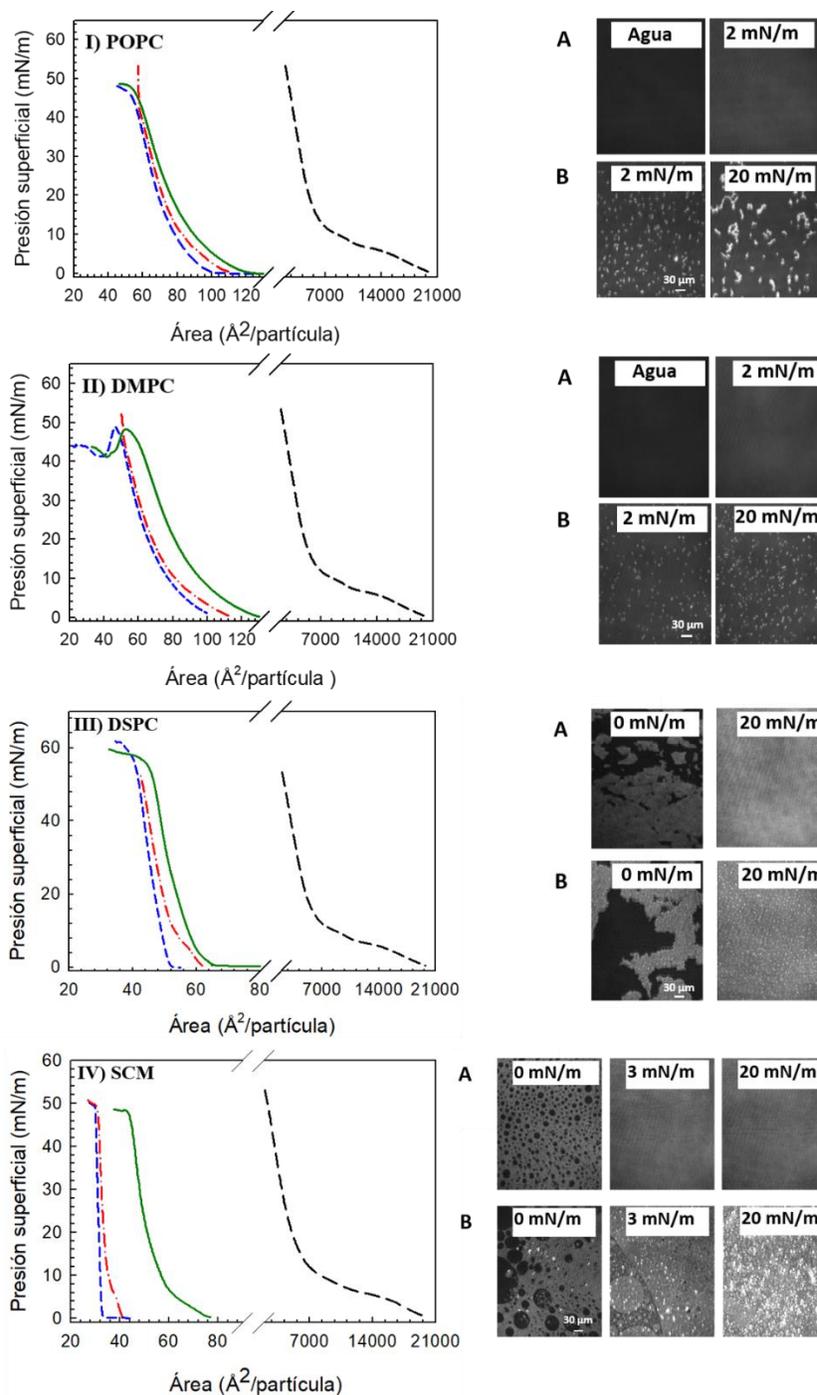
**Figura III.4.11.** Estructura química de los fosfolípidos empleados como modelos de biomembranas. En el recuadro azul, se muestran los compuestos que forman parte de la mezcla de estrato córneo (SCM) preparada según las proporciones Cer24/LA/Cho 1:1:1 y un 5% de ChoS.

Los fosfolípidos seleccionados para este estudio contienen cadenas acílicas de varias longitudes y grados de saturación, por lo cual son capaces de adoptar diferentes estados de fase en la interface aire/agua. Así, DMPC (fosfolípido saturado) y POPC (fosfolípido insaturado) adoptan una fase líquido-expandida (LE) a lo largo de toda la isoterma de compresión, mientras que DSPC (fosfolípido saturado), existe en una fase líquido condensada (LC). Por otro lado, la mezcla de SCM es una monocapa cuaternaria que ha sido previamente estudiada por isotermas de compresión y sus propiedades de difusión mostrando un comportamiento de tipo LC.<sup>40</sup> Adicionalmente se estudió la interacción de estas AgNP-OA frente a otros modelos de biomembranas tales como DPPC, fosfolípido saturado que presenta una transición de fases LC-LE; y una mezcla de los fosfolípidos DMPC/DSPC en proporción 50:50, cuya topografía presenta coexistencia de dominios discretos de fase condensada ordenada a largo alcance, disperso en una fase continua LE.<sup>47</sup> Las características de estos dos últimos modelos de biomembrana permiten efectuar un

análisis del comportamiento de las NPs con films que presentan coexistencia de fases y ofrecen bordes.

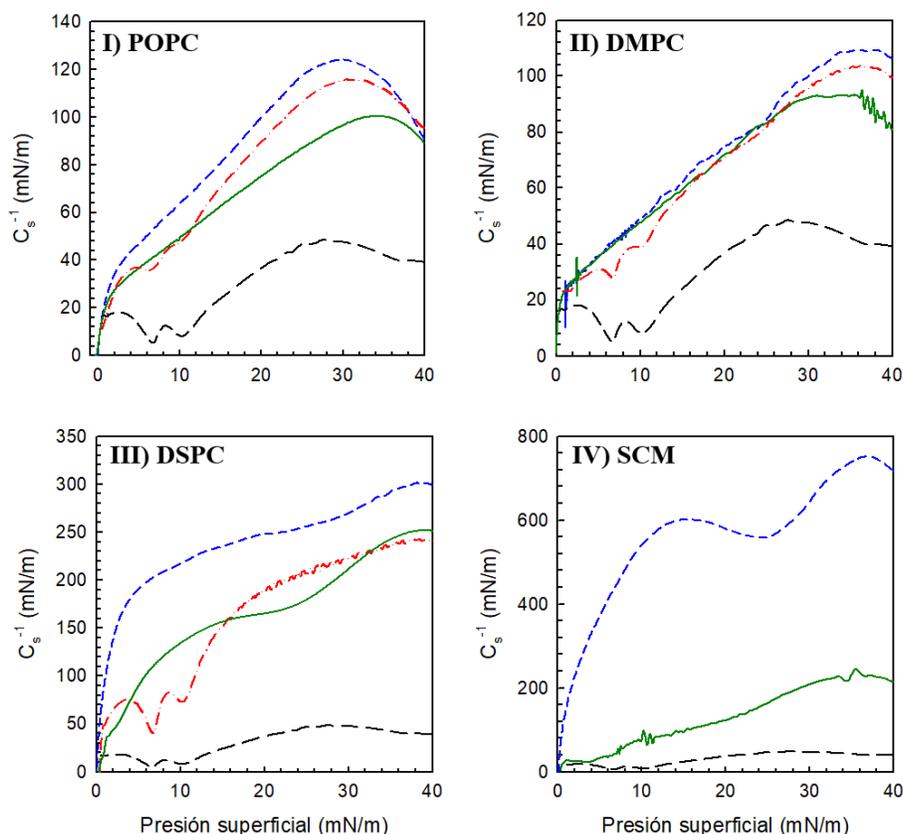
Se evaluaron las isothermas de las mezclas lípidos/AgNP-OA conteniendo una  $X^{\text{AgNP-OA}} = 0,0005$ . En las **Figuras III.4.12** y **III.4.15**, se muestran las isothermas de compresión del lípido puro (o mezcla de lípidos), de las AgNP-OA y de la mezcla de lípidos/AgNP-OA ideal y experimental.

Luego del análisis de las isothermas de presión superficial-área (**Figura III.4.12**) en la interface aire/agua, fue posible observar cómo las AgNP-OA hidrofóbicas inducen un desplazamiento en las isothermas lipídicas hacia áreas mayores en comparación con las isothermas esperadas para una mezcla ideal NP-lípido. Esto indica que las AgNP-OA son incorporadas dentro del film como una mezcla no-ideal. Comparando los diferentes lípidos, el mayor desplazamiento en áreas se obtuvo para SCM seguido por los fosfolípidos saturados DSPC y DMPC, y finalmente el fosfolípido insaturado POPC (**Figura III.4.12**).



**Figura III.4.12.** Isothermas de presión superficial versus área para (I) POPC, (II) DMPC, (III) DSPC, (IV) SCM en ausencia o en presencia de AgNP-OA. Lípido puro (azul, líneas discontinuas cortas), AgNP-OA pura (negro, líneas discontinuas largas), experimental (verde, línea continua) y monocapa de mezcla ideal con  $X^{\text{AgNP-OA}} = 0,0005$  (roja, línea punteada). Imágenes de BAM mostrando la topografía de los films en ausencia (paneles A) o en presencia (paneles B) de AgNP-OA a las presiones de superficie indicadas. Las imágenes se encuentran en escala 250 x 200  $\mu\text{m}$ .

Se evaluaron también los  $C_s^{-1}$  para las mezclas binarias AgNP-OA/lípido en función la presión superficial (**Figura III.4.13**). Los valores de  $C_s^{-1}$  proveen información esencial y una medida cuantitativa de la elasticidad en-plano de la monocapa. Muchos autores proponen que este parámetro es extrapolable a la fluidez observada en bicapas lipídicas.<sup>27</sup>



**Figura III.4.13.** Módulos de compresibilidad ( $C_s^{-1}$ ) vs. presión superficial para I) POPC, II) DMPC, III) DSPC y IV) SCM en mezcla con AgNP-OA en la interface aire/agua. Lípido puro (azul, líneas discontinuas cortas), AgNP-OA pura (negro, líneas discontinuas largas), monocapa experimental (verde, línea continua) y monocapa de mezcla ideal con  $X^{\text{AgNP-OA}} = 0,0005$  (roja, línea punteada). La curva del  $C_s^{-1}$  ideal para la mezcla AgNP-OA/SCM no fue incluida debido a que ello requiere considerar la contribución de cinco componentes puros. Para este sistema complejo es de esperar que exista una alta cooperatividad a nivel molecular que invalida las contribuciones individuales de cada componente, exhibiendo un comportamiento aditivo.

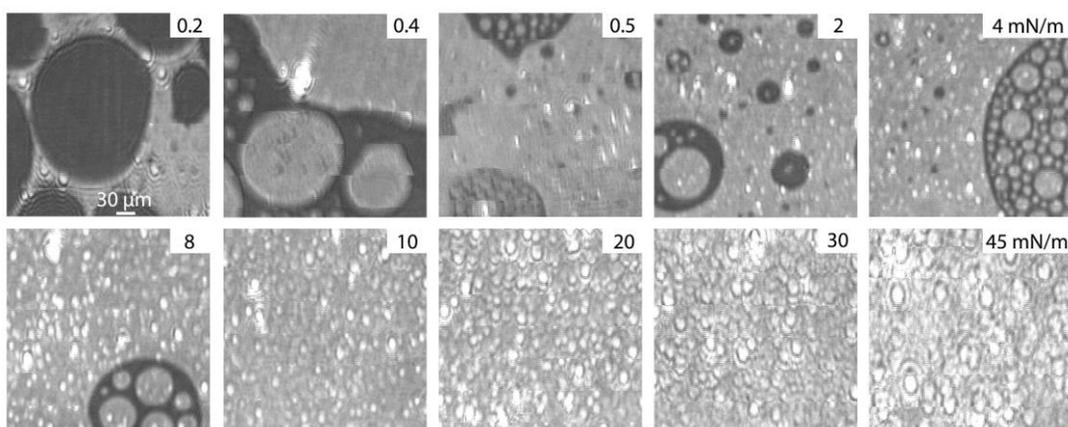
Al analizar los  $C_s^{-1}$  para las mezclas AgNP-OA/lípido, en función de la presión superficial y compararlos con los correspondientes a los lípidos puros, se observa una disminución del  $C_s^{-1}$  como tendencia general. Lípidos de fase LC, particularmente SCM, demostraron ser más susceptibles a la presencia de las partículas que aquellos de fase LE. Los films compuestos por AgNP-OA/DSPC o AgNP-OA/SCM (lípido y mezcla de fase LC) mostraron una marcada disminución en los valores de  $C_s^{-1}$  a bajas y altas presiones de superficie, indicando que los films se vuelven más compresibles y adquieren un carácter más expandido o fluido (menores valores de  $C_s^{-1}$ ) con respecto a los lípidos puros. Estos resultados indican que los lípidos con fase LC experimentan un mayor desorden a nivel de organización molecular, inducido por las AgNP-OA. En el caso del SCM, la disminución de los valores de  $C_s^{-1}$  ocasionado por la presencia de las AgNP-OA puede tener importantes implicancias en procesos transmembrana, permeabilidad de la piel, y la función barrera del estrato córneo.

Por medio de BAM, fue posible realizar el mapeo de la topografía de los films a diferentes presiones superficiales. Cuando se observaron los films de DMPC, POPC y DSPC sin AgNP-OA por medio de esta técnica, los mismos mostraron una topografía homogénea a lo largo de toda la isoterma, desde la fase gaseosa en adelante. Las imágenes de BAM para las diferentes mezclas con AgNP-OA adquiridas a diferentes presiones de superficie, mostraron la clara presencia de las AgNP-OA en forma de puntos brillantes o *clusters* en la interfase. Dependiendo del fosfolípido, en algunos casos se observan formaciones de tipo “hilo” sin la presencia de patrones estructurales de largo alcance.

Un resultado interesante deriva del análisis topográfico de la mezcla de AgNP-OA con SCM. La mezcla de lípidos SCM, en ausencia de NPs, presenta una coexistencia de fases hasta los 3 mN/m aproximadamente (**Figura III.4.12-IV**). La presencia de AgNP-OA en SCM hace que la coexistencia de fases se mantenga hasta los 8 mN/m, aproximadamente (**Figura III.4.14**), sugiriendo una segregación o demezclado de sus constituyentes. Este patrón topográfico es consistente con el gran desplazamiento en áreas observado para la isoterma de AgNP-OA/SCM, así como con el cambio significativo en los valores de  $C_s^{-1}$ , en comparación con aquellos obtenidos empleando SCM puro. Gupta et. al.<sup>16</sup> evaluaron el efecto de AuNPs hidrofóbicas en una bicapa de estrato córneo a través de dinámica molecular y postularon que el colesterol tiene una gran influencia en la estabilización de vacancias o espacios libres generados por las nanopartículas en las bicapas de SCM. Este mecanismo les otorga a las NPs, la energía suficiente como para

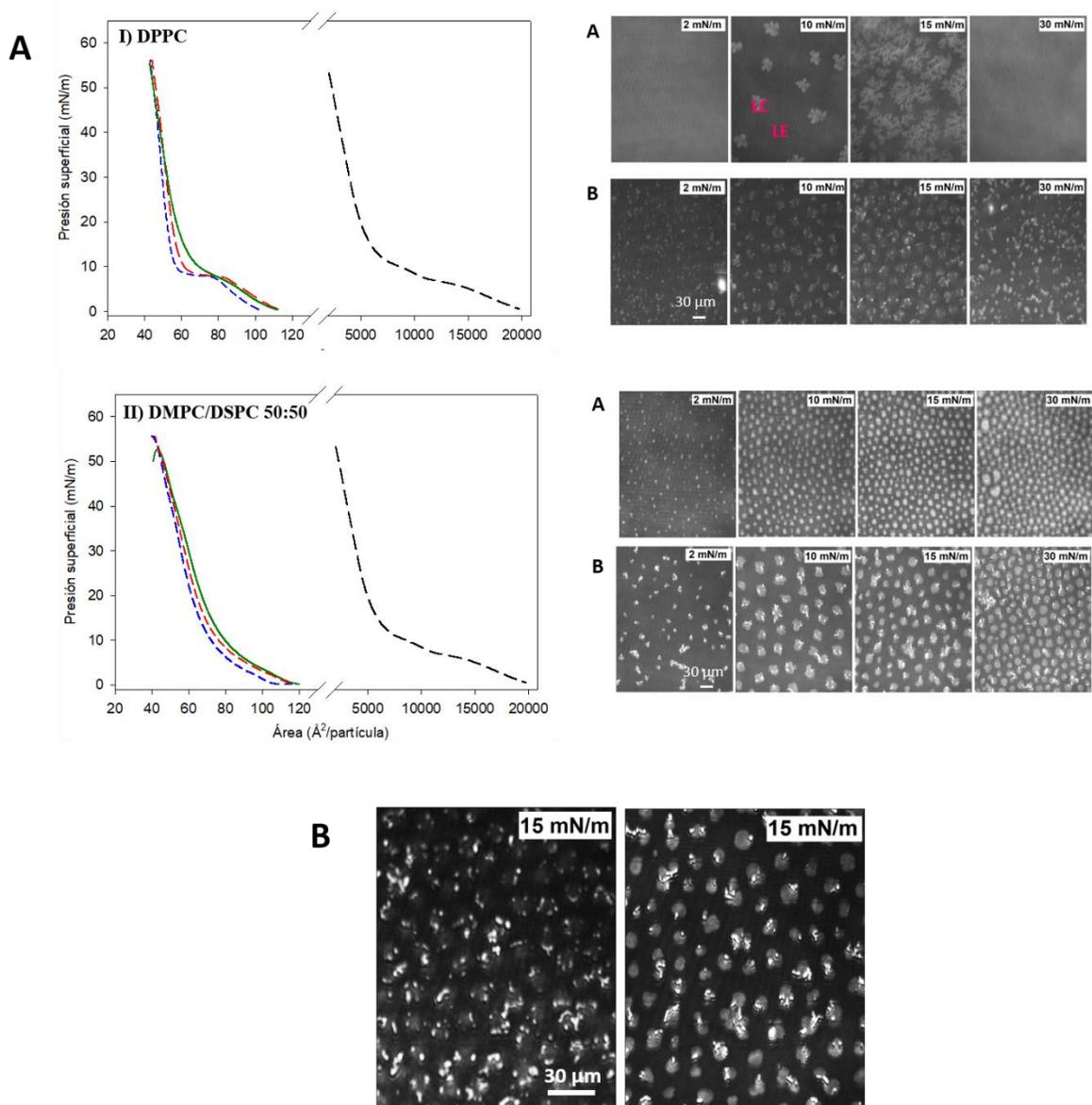
incorporarse de manera irreversible al interior de las membranas.<sup>16</sup> Gkeka et. al.<sup>48</sup> reportaron un comportamiento similar en simulaciones computacionales realizadas con nanopartículas aniónicas en bicapas mixtas compuestas por DPPC y diferentes porcentajes de Cho. En este último caso, los autores determinaron que el grado de permeabilidad de la bicapa hacia las NPs, se ve altamente influenciado por la concentración de Cho en la membrana, el cual experimenta diferentes rearrreglos en presencia de concentraciones variables de NPs. Esta reorganización estructural del Cho, da lugar a la formación de “parches” que ejercen un efecto cooperativo con las nanopartículas para el incremento de la permeabilidad de la bicapa.<sup>48</sup>

Considerando lo antes expuesto, es posible entonces, que los mayores cambios evidenciados para el SCM en presencia de las AgNP-OA sean debidos a la presencia de colesterol en la membrana. En la sección III.4.4, se analiza esta mezcla por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).



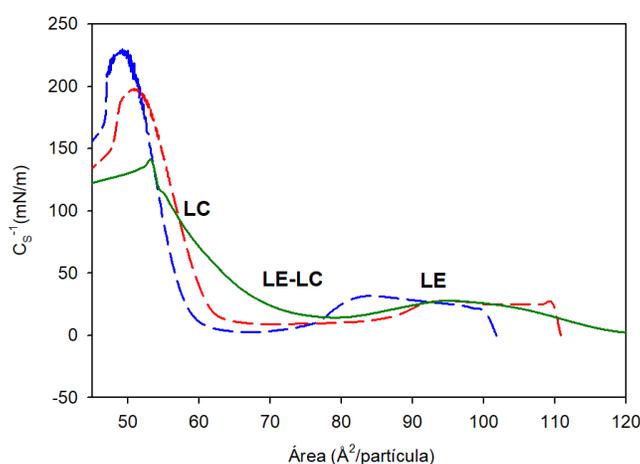
**Figura III.4.14.** Imágenes de BAM adquiridas a distintas presiones superficiales para la mezcla AgNP-OA/SCM en fracciones molares de  $X^{\text{SCM}} = 0,9995$  y  $X^{\text{AgNP-OA}} = 0,0005$  en la interface aire/agua. Barra de escala: 30  $\mu\text{m}$ .

El análisis de las observaciones realizadas en modelos de biomembrana que presentan coexistencia de fases, DPPC y mezcla de lípidos DMPC/DSPC 50:50, permitió dilucidar algunas diferencias en cuanto al comportamiento que presentan AgNPs-OA frente a estos films mixtos LE-LC, con respecto a lo descripto para films de fase única.



**Figura III.4.15.A.** Isothermas de presión superficial versus área para las mezclas de fases LE-LC; (I) DPPC, (II) DMPC/DSPC 50:50. Lípido puro (azul, líneas discontinuas cortas), AgNP-OA pura (negro, líneas discontinuas largas), experimental (verde, línea continua) y monocapa de mezcla ideal con  $X^{\text{AgNP-OA}} = 0,0005$  (roja, línea punteada). Paneles a la derecha: imágenes de BAM mostrando la topografía de los films en ausencia (paneles A) o en presencia (paneles B) de AgNP-OA a las presiones de superficie indicadas. Las imágenes se encuentran en escala 250 x 200  $\mu\text{m}$ . **B.** Imágenes de BAM ampliadas de mezcla AgNP-OA con DPPC y DMPC/DSPC 50:50 a 15 mN/m.

Como se visualiza en la **Figura III.4.15**, ambos films lipídicos presentaron comportamientos similares durante su interacción con las nanopartículas. En este sentido, los perfiles de las isothermas de Langmuir denotaron un comportamiento de expansión notoriamente disminuido con respecto a las observadas previamente para mezclas monofásicas. En la **Figura III.4.16** se comparan los módulos de compresión ideal y experimental calculados para la mezcla AgNPs-OA/DPPC. En este caso, se observa que las mayores diferencias están en la región de la transición de fases la cual se desdibuja debido a la presencia de las AgNP-OA. Esto indica un comportamiento de más cooperatividad para la mezcla, que en DPPC pura.<sup>24</sup>



**Figura III.4.16.** Módulos de compresibilidad ( $C_s^{-1}$ ) vs. área superficial para la mezcla DPPC-AgNP-OA en la interface agua-aire. Lípido puro (azul, líneas discontinuas cortas), monocapa de mezcla experimental (verde, línea continua) y monocapa de mezcla ideal con  $X^{\text{AgNP-OA}} = 0,0005$  (roja, línea punteada).

En concordancia con lo que se interpreta de la isoterma de la mezcla DPPC/AgNP-OA (**Figura III.4.15-A-I**), el comportamiento es próximo a ideal para áreas superficiales de  $\sim 90 \text{ \AA}^2/\text{partícula}$ , en el transcurso de la fase LE. Al alcanzar la región de transición LE-LC, el film experimenta una disminución en el valor del módulo de compresibilidad ( $C_s^{-1}$ ), y posteriormente un leve incremento a áreas de  $65 \text{ \AA}^2/\text{partícula}$  hasta alcanzar valores inferiores que los ideales (áreas más grandes), durante el transcurso y predominio de los dominios condensados (fase LC). Estas diferencias en cuanto a la magnitud del módulo de compresibilidad entre una fase y otra, reflejaron la tendencia

observada en los experimentos previos con mezclas lípido puro/NPs, en donde se corroboró que las AgNP-OA inducen una mayor fluidización de fases lipídicas con dominios condensados.

La topografía de los films con coexistencia de fases (LE-LC) en interacción con las AgNPs-OA obtenida mediante BAM, permitió acceder a información concomitante con los datos obtenidos por las isothermas de Langmuir. La **Figura III.4.15.A** muestra en los paneles **A** y **B**, los modelos de biomembrana en ausencia y presencia de AgNP-OA, respectivamente. En ambos casos fue posible determinar la segregación preferente de las AgNPs-OA en los bordes de los dominios condensados de los lípidos y su ausencia en la fase LE (**Figura III.4.15.B**). Como se visualiza en las imágenes, esta tendencia es aún más marcada a presiones desde las cuales tiene lugar la formación de los dominios floreados o “trisquelidos” en el caso de la DPPC y en los dominios condensados pertenecientes a la DSPC a lo largo de toda la compresión.

Adicionalmente, el sistema DMPC/DSPC, presenta otra configuración topográfica que resulta de interés. Al comparar la disposición de los dominios condensados a iguales presiones, entre el film compuesto únicamente por la mezcla binaria de lípidos y aquel en el cual se incorporan las AgNPs-OA, es posible notar una alteración en la proporción en la que se encuentran ambas fases a cada una de estas presiones. Interesantemente, se observa una mayor proporción de fase líquido-expandida (LE, región oscura) en films lipídicos que incorporaron AgNP-OA, a presiones en las cuales el film puro (en ausencia de nanopartículas) evidencia mayor área de fase condensada con dominios más pequeños y regulares en forma, localizados a una menor distancia unos de otros.

A través de la información que brindaron los parámetros calculados a partir de las isothermas de Langmuir y las observaciones topográficas obtenidas por microscopía de ángulo de Brewster (BAM), es posible definir que la incorporación de las AgNP-OA a los sistemas de membranas lipídicas traen como consecuencia una fluidización o el incremento en la elasticidad en el plano de las mismas. Considerando lo observado para la mezcla de estrato córneo y mezclas con coexistencia de fases LE-LC, la mayor estabilización termodinámica de la fase LE en las biomembranas modelo, podría otorgarles a las AgNPs-OA, potenciales aplicaciones tecnológicas en campos como el transporte de fármacos bioactivos o como permeadores de membrana.

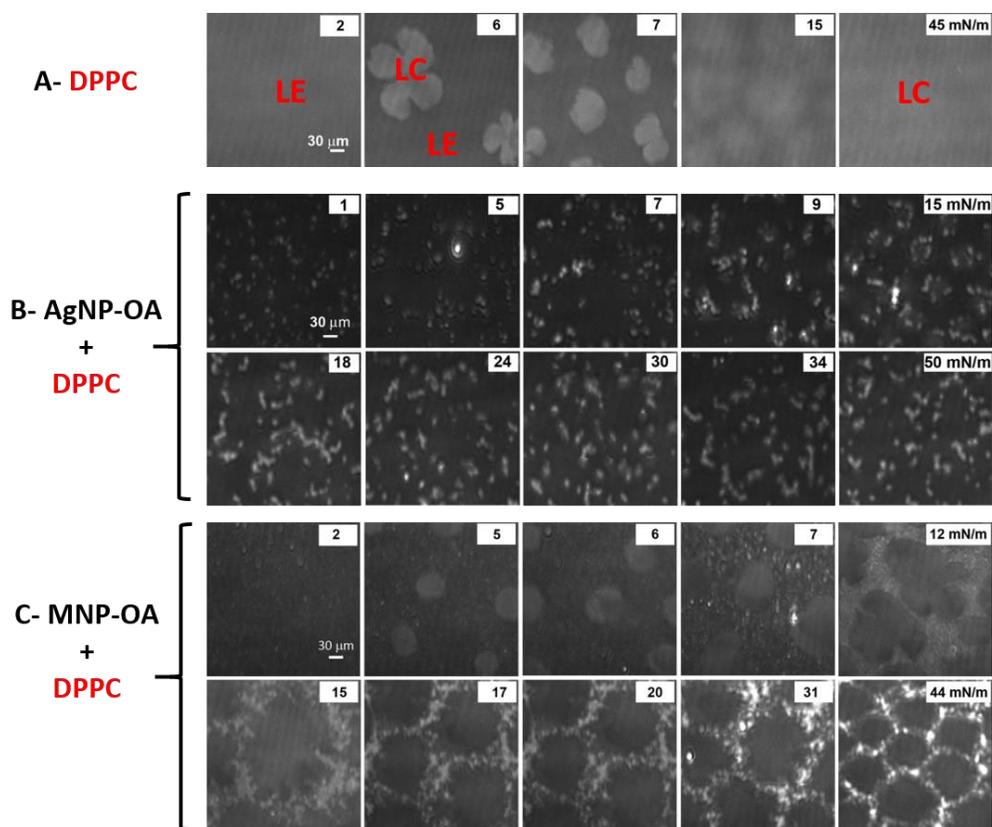
### III.4.3- Rol de la composición estructural del núcleo en la interacción entre nanopartículas hidrofóbicas y biomembranas modelo

Previamente, se destacó una diferencia fundamental basada en las características estructurales de las AgNP-OA bajo estudio, en contraposición con nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), estabilizadas con ácido oleico (MNP-OA). Estudios realizados previamente en el laboratorio, demostraron que las MNP-OA fueron capaces de formar monocapas estables en la interfase agua-aire, observándose además un elevado grado de histéresis que fue demostrado a partir de sucesivos ciclos de compresión-expansión de films de estas nanopartículas puras.<sup>20</sup> El gran valor negativo de  $\Delta G^{\text{hys}}$  (mayormente dado por contribuciones entálpicas favorables) que presentan las MNP-OA, es indicativo de su gran capacidad para almacenar energía en forma de organización estructural de superficie.<sup>20</sup> Contrariamente, las AgNP-OA estudiadas son capaces de devolver toda esta energía almacenada al sistema, sin necesidad de efectuar un trabajo adicional para retornar a su estado de organización inicial. Esta primera característica evidenció un comportamiento totalmente diferencial de ambos sistemas de nanopartículas, cuya diferencia más notoria, se relaciona fundamentalmente con la composición del núcleo. Teniendo en cuenta el comportamiento termodinámico que diferencia a ambos nanomateriales de tamaños similares e igual composición externa, sería entonces lógico pensar que la interacción frente a biomembranas modelos debería impactar en la organización de los arreglos moleculares, de manera diferente en cada caso. Es por ello que, la magnitud y la naturaleza de las interacciones que desarrollan las AgNP-OA y las MNP-OA frente a modelos de biomembrana similares, representaron uno de los interrogantes destinados a buscar respuesta en el marco de este trabajo de tesis doctoral. El conocimiento acerca del impacto que posee la composición de los nanomateriales en la interacción frente a modelos de membranas celulares, representa un tópico clave para el diseño racional y controlado de nuevas plataformas biotecnológicas.<sup>49,50</sup>

Por medio de los experimentos realizados en films lipídicos mixtos en presencia de AgNP-OA, y teniendo en cuenta los estudios previos relativos a la interacción de las MNP-OA frente a diferentes fosfolípidos modelos de biomembranas en monocapas de Langmuir, se obtuvieron datos comparativos con respecto al comportamiento que adopta cada sistema de NPs en la interfase agua-aire durante su interacción con las biomoléculas. Como resultado de estas indagaciones, se identificaron fenómenos de interacción radicalmente diferentes en la gran mayoría de los casos,

dependiendo del tipo de nanopartícula que se encuentre en interacción activa con los films lipídicos.

En ambos casos se ensayó la interacción de las NPs con films de Langmuir compuestos por fosfolípidos saturados (DMPC, DSPC), insaturados (POPC) y films con coexistencia de fase (DPPC, mezcla DMPC/DSPC 50:50). De manera general, las MNP-OA demostraron una interacción selectiva, altamente dependiente del grado de saturación del fosfolípido. Como fue reflejado por las isothermas (información no mostrada aquí) y la topografía de los films, la interacción de las MNP-OA con lípidos saturados causó una notable disminución del área molecular del film, indicando un comportamiento de condensación o rigidización del film NP-lípido. Por otra parte, la interacción con fosfolípidos insaturados evidenció una expansión de área con respecto a las isothermas de mezclado ideal y una topografía sin patrones preferentes visibles, indicando un mezclado efectivo de estas NPs en fases expandidas. Como se demostró a lo largo de los experimentos realizados, este comportamiento de fluidización de los films (incremento en la elasticidad media) observado para MNP-OA en interacción con lípidos insaturados, se observó para las AgNP-OA durante la interacción con casi la totalidad de los films lipídicos ensayados en monocapas de Langmuir.



**Figura III.4.17.** Micrografías de BAM adquiridas a diferentes presiones de superficie. **A-** DPPC con dominios LE y LC diferenciados (rojo). **B-** Film mixto de AgNP-OA/DPPC ( $X^{\text{AgNP-OA}}=0,0005$ ). **C-** Film mixto MNP-OA/DPPC ( $X^{\text{MNP-OA}}=0,0003$ ). Panel C extraído de Matshaya, T. J.; Lanterna, A. E.; Granados, A. M.; Krause, R. W. M.; Maggio, B.; Vico, R. V. Distinctive Interactions of Oleic Acid Covered Magnetic Nanoparticles with Saturated and Unsaturated Phospholipids in Langmuir Monolayers. *Langmuir* **2014**, *30* (20), 5888–5896.

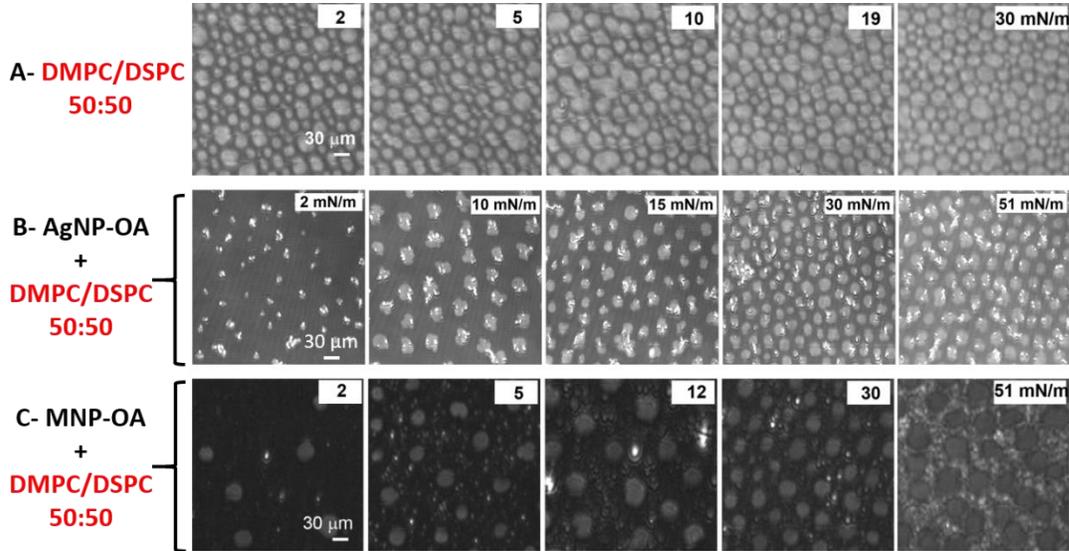
Una observación sumamente interesante surge del análisis de las interacciones entre las nanopartículas y fosfolípidos que presentan coexistencia de fases LE-LC, como la DPPC. En la **Figura III.4.17**, se señalan las principales diferencias topográficas obtenidas durante mediciones realizadas en BAM, para films mixtos DPPC-NPs. La interacción de las MNP-OA con el fosfolípido saturado DPPC, mostró un comportamiento de rigidización o condensación del film hacia áreas menores con respecto a la isoterma ideal.<sup>20</sup> La organización de los films MNP-OA/DPPC mostró en la mesoescala un patrón de segregación preferencial de las MNP-OA en la fase LE de la DPPC, que impide la coalescencia de los dominios condensados bajo el incremento

en la presión superficial. Este arreglo determinado por las MNP-OA desencadenó la pérdida de la tensión de línea de los dominios condensados o trisquelidos de la DPPC, y por ende la forma de los mismos. El patrón observado a presiones donde hay coexistencia de fase LE-LC, indicó un arreglo de red hexagonal de dominios condensados de DPPC, rodeados por una red de MNP-OA.

En contraste, y como se analizó en **III.4.2**, las AgNP-OA evidenciaron una segregación preferencial en los bordes de los dominios condensados de la DPPC a todas las presiones superficiales impuestas sin una alteración notoria de la tensión de línea de los dominios LC. Aunque esta segregación se mantuvo a lo largo de toda la compresión, se observó que las AgNP-OA fueron capaces de disminuir el grado de coalescencia o empaquetamiento de las estructuras condensadas de la DPPC, proporcionando un incremento de fase LE que es visualizado como un comportamiento de expansión del film molecular por la isoterma de Langmuir del film mixto. Sin embargo, las AgNP-OA no inducen una distribución topográfica tan marcada en red hexagonal como lo hacen las MNP-OA. Como se observa en la **Figura III.4.18**, El mismo tipo de interacciones fue observado para ambas nanopartículas de manera reproducible en films compuestos por DMPC/DSPC 50:50 (comparado con la interacción que presenta cada una de las NPs por separado, con DPPC).

En suma, las interacciones de las nanopartículas frente a modelos de biomembrana con presencia de coexistencia de fases LE-LC, permitieron una clara visualización de los comportamientos termodinámicamente favorables de ambos nanomateriales en la interfase agua-aire. Teniendo en cuenta estos resultados y otros informados en bibliografía,<sup>11,20</sup> se puede inferir que no solamente la molécula de funcionalización que se encuentra directamente expuesta al medio externo es capaz de dictar el tipo de interacción de las nanopartículas frente a biomoléculas, sino que también las características estructurales del núcleo poseen un gran impacto en la naturaleza de las mismas. En este caso en particular, se puede suponer que el comportamiento magnético del NM, dicta el comportamiento a largo alcance observado en los films NP-lípido. La composición y características fisicoquímicas del núcleo de las NPs intervienen activamente en su desempeño durante la interacción con biomoléculas como quedó demostrado desde el comportamiento observado en monocapas de nanopartícula pura, donde el grado de histéresis presentado por las MNP-OA y la ausencia de la misma en AgNP-OA representó desde el inicio, una diferencia clave en cuanto al tipo de interacción que son propensas a establecer. Con respecto a la energética involucrada en los procesos de interacción inter-partícula en el plano interfacial, se determinaron

diferencias en cuanto a posibles estructuraciones que pueden tener implicancias en la interacción frente a las biomembranas modelo.



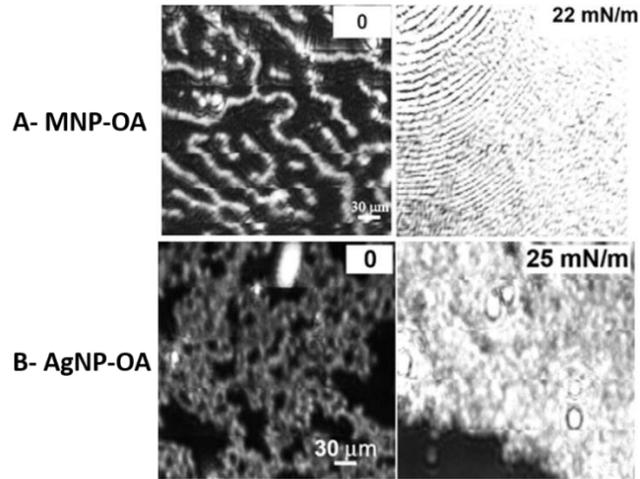
**Figura III.4.18.** Imágenes de BAM adquiridas a diferentes presiones de superficie. **A-** mezcla binaria DMPC/DSPC 50:50. **B-** Film mixto de AgNP-OA/ (DMPC/DSPC 50:50); ( $X^{\text{AgNP-OA}}=0,0005$ ). **C-** Film mixto MNP-OA/ (DMPC/DSPC 50:50); ( $X^{\text{MNP-OA}}=0,0003$ ).

Al comparar las áreas de colapso ( $A_C$ ) para ambos films de NPs puras con sus respectivas áreas límites extrapoladas a presión superficial cero ( $A_0$ , área que debería ser cubierta por las NPs a presión cero), se observa una clara disminución de las  $A_C$  ( $A_0$  y  $A_C$  se esquematizan en la **Figura III.1.2B**). Esto sugiere que, a las presiones de colapso correspondientes, pueden estar teniendo lugar una multiplicidad de arreglos inter-partícula, cuyo cambio en la dimensionalidad ha sido interpretado por la información topográfica obtenida por BAM (incremento en la densidad óptica de los films a presiones cercanas al colapso y las áreas medidas). Si bien resulta difícil diferenciar si el fenómeno organizacional corresponde a desplazamientos de estas entidades desde el plano interfacial o a un arreglo de partículas determinado en el plano de la interfase, el análisis de la relación entre las áreas límites ( $A_0$ ) y las áreas seccionales teóricas de ambas nanopartículas ( $A_s$ ), permite concluir algunas características interesantes. La **Tabla III.4.1**, muestra las áreas determinadas para cada parámetro descripto. Dado que en las inmediaciones de las presiones de colapso, es factible considerar erróneamente procesos de desorción dentro de la interpretación de

las interacciones predominantes, la relación entre las áreas seccionales teóricas calculadas según la información morfológica de las NPs (TEM) y las áreas limitantes obtenidas por extrapolación a presión cero de las isothermas experimentales, representa una comparación mucho más aproximada para la diferenciación de estos procesos de estructuración en la interfase. Así, para la relación  $A_S/A_0$  para las AgNP-OA, se determinó un valor próximo a  $\sim 0,9$ , mientras que dicha relación se aproximó a valores de  $\sim 1,5$  para las MNP-OA. Teniendo en cuenta estos cálculos, es posible que en el caso de las MNP-OA exista un cierto grado de desorción de las nanopartículas desde plano interfacial hacia la subfase. Sin embargo, este fenómeno fue descartado debido a que experimentos de compresión-expansión-compresión permitieron recuperar y alcanzar nuevamente la presión de colapso ( $\pi_c$ ) de la primera compresión con la misma área, indicando que no hay pérdidas de material de la interfase. Otra explicación a las diferencias en  $A_S$  y  $A_0$  observadas puede concebirse considerando fenómenos moleculares como la interdigitación entre las cadenas lipídicas de OA que recubren las NPs, y desplazamientos de las partículas respecto al plano interfacial.<sup>51</sup> Para las MNP-OA, la relación  $A_S/A_0$  adquiere una magnitud mayor con respecto a lo esperado para una contribución mayoritaria de interdigitación de OA en el plano. Por otra parte, las AgNP-OA se encontrarían principalmente interaccionando en el plano hasta presiones de  $\sim 12-15$  mN/m ( $A_S \sim 6000$ ) sin establecer fenómenos de intercalación de cadenas hidrocarbonadas de OA en el plano. Luego de estas presiones se comenzarían a producir fenómenos de intercalación o desplazamientos respecto al plano en las AgNP-OA, lo cual se puede deducir a partir de las áreas de la isoterma de Langmuir y sus respectivas imágenes de BAM (**Figura III.4.9A-B**).

Las características apreciables desde el foco que plantean las isothermas de nanopartículas puras, se traducen en la topografía observada como una interacción de largo alcance entre NPs (estructuras tipo “cable”) para las MNP-OA, y en una segregación aleatoria de NPs en la interfase aire/agua en el caso de las AgNP-OA (**Figura III.4.19**).

Con los resultados obtenidos, puede establecerse entonces que la capacidad organizacional de las nanopartículas en la interfase que resulta de las energías involucradas en los procesos de interacción NP-NP mencionados anteriormente, cumple un rol fundamental en los comportamientos de condensación/expansión observados en presencia de films lipídicos.



**Figura III.4.19.** Imágenes de BAM de nanopartículas puras a presión de 0 mN/m (topografía inicial) y ~20 mN/m.

**Tabla III.4.1.** Áreas parametrizadas para la comparación de interacciones inter-partícula. Las áreas calculadas se encuentran en  $\text{Å}^2/\text{partícula}$ . El superíndice **a**, indica que estas áreas se determinaron a partir de la caracterización estructural de las NPs.

NPs hidrofóbicas	Área de colapso* ( $A_c$ )	Área límite ( $A_o$ )	Área seccional teórica ( $A_s$ ) <sup>a</sup>
AgNP-OA	2212	6300	5945
MNP-OA	5147	9241	13260

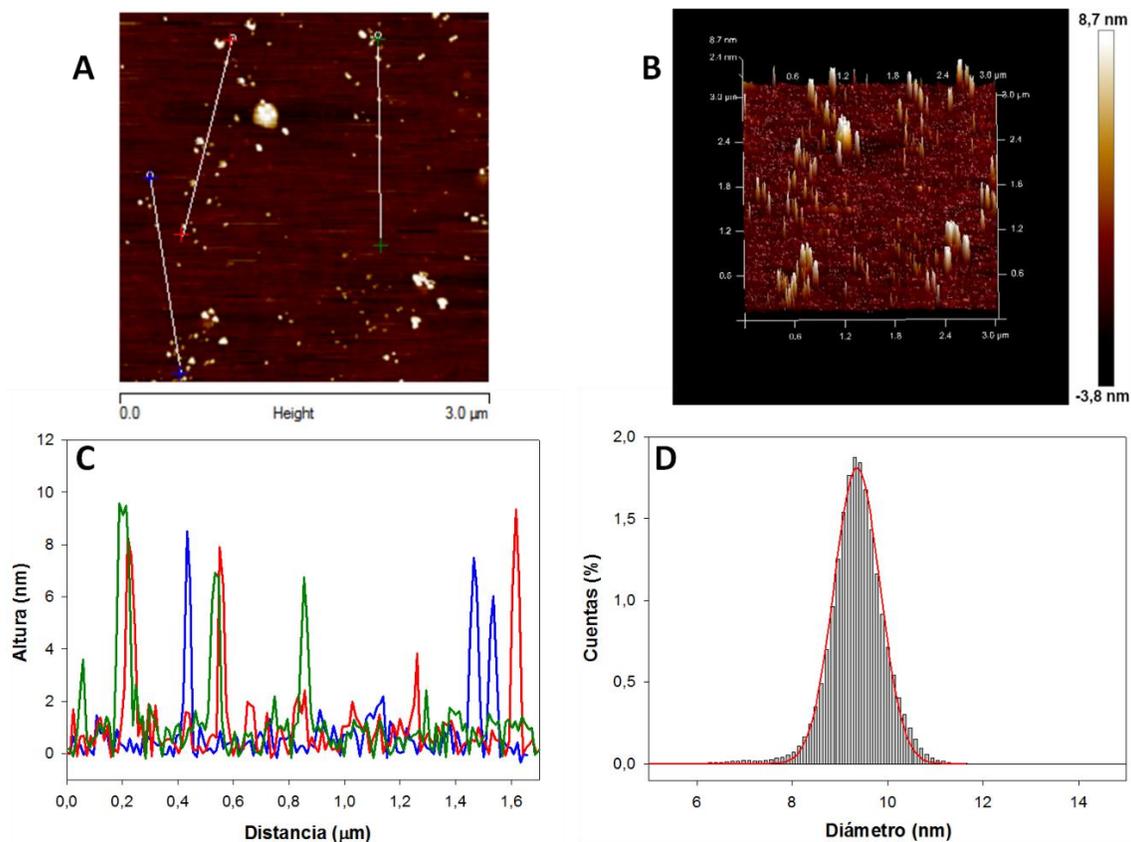
\*El error en área a la  $\pi_c$  no supera el 0,1% para ambas nanopartículas.

#### III.4.4- Films LB de AgNP-OA en interacción con las membranas modelo de estrato córneo

El efecto de las AgNP-OA sobre la organización y las propiedades nanomecánicas de films de estrato córneo (SCM), fue estudiado por microscopía de fuerza atómica (AFM) aplicada a films de Langmuir transferidos a un sustrato sólido (vidrio cubreobjetos), por medio de la técnica de Langmuir-Blodgett (LB).

En primer lugar, se obtuvieron imágenes de AFM de la topografía de las AgNP-OA con el fin de corroborar la estabilidad de las nanopartículas en films de LB y como medida adicional para la confirmación de los tamaños y la topografía del nanomaterial en cuestión. Con el objetivo de medir

de manera más precisa los diámetros individuales de cada nanopartícula y evadir posibles fenómenos de coalescencia o aglomeración, los films de AgNP-OA fueron transferidos a una presión de 5 mN/m. Como se muestra en la **Figura III.4.20**, las nanopartículas hidrofóbicas fueron efectivamente transferidas al sustrato de vidrio. Esto corrobora en primera instancia, su alta estabilidad en la interfase agua-aire, puesto que los tiempos requeridos para una deposición estable del film son por lo general más prolongados que los que se utilizan en un ciclo de compresión completo.



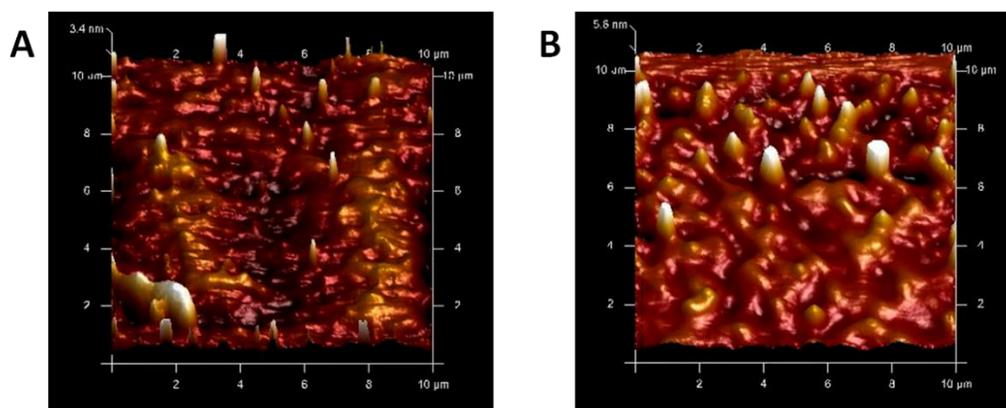
**Figura III.4.20.** Visualización de films LB de AgNP-OA transferidas a 5 mN/m, por microscopía de fuerza atómica (AFM). Líneas transversales fueron trazadas sobre el patrón en 2D de las NPs transferidas (A), obteniéndose la distribución de tamaños mostrada en C. La imagen 3D mostrada en B permite una mejor visualización de los perfiles obtenidos para las AgNP-OA. En D se muestra el histograma para el promedio de todos los tamaños obtenidos.

Adicionalmente, siendo las AgNP-OA de carácter hidrofóbico sería lógico esperar un bajo porcentaje de adsorción al sustrato hidrofílico o incluso una capacidad nula de adsorción sobre el

mismo. Por el contrario, su adsorción efectiva en altas proporciones ( $Tr \sim 1$ ), indica que estas nanopartículas son capaces de establecer interacciones en medio acuoso que les permiten mantener su estabilidad coloidal frente al proceso de transferencia hacia un film de polaridad opuesta. Este fenómeno podría tener explicación en la estructura del ligando OA que recubre a las nanopartículas. La presencia de insaturaciones les otorga la capacidad para ocluir moléculas de agua con mayor facilidad (esfera de hidratación) como parte de la estructura neta de la nanopartícula haciéndolas más propensas a experimentar este tipo de interacciones.<sup>52</sup> Por último, los perfiles generados por trazado de líneas transversales (**Fig. III.4.20 A, C**) revelan que las AgNP-OA se encuentran distribuidas en toda la superficie del vidrio cubreobjeto, con tamaños similares a los determinados por las técnicas de caracterización pertinentes en el **Capítulo II**. Los perfiles promediados para las AgNPs-OA depositadas en la superficie de mapeo mostrada, se resumen en un histograma cuya regresión Gaussiana permitió determinar un valor de  $(9,3 \pm 0,1)$  nm para las NPs transferidas por la técnica de Langmuir-Blodgett (**Fig. III.4.20 D**).

En la **Figura III.4.21**, se visualizan las imágenes de AFM obtenidas para films de SCM y SCM/AgNP-OA transferidos a 30 mN/m. La presión a la cual se realizaron las transferencias, fue seleccionada en base a su similitud con la presión lateral a la cual están sometidos los lípidos de bicapa en las membranas celulares.<sup>25</sup> La topografía de las monocapas soportadas mostró dominios separados en ambos casos. Tal como ha sido previamente reportado para mezclas de estrato córneo soportadas, los diferentes espesores distribuidos a lo largo de toda la superficie se relacionan con la composición molecular de los dominios presentes en la membrana modelo de SCM. Así, los dominios más altos están mayormente compuestos por la ceramida C24 (de cadena hidrofóbica larga) y ácido lignocérico, mientras que los dominios bajos pertenecen a fases ricas en colesterol y menores cantidades de ceramida.<sup>53</sup> Teniendo en cuenta el patrón de segregación de los dominios lipídicos en el film, la incorporación de las AgNP-OA produjo un efecto de disminución en el empaquetamiento de las moléculas que conforman la membrana de SCM. Este cambio en la estructuración molecular de la membrana se acompaña de un cambio notorio en la altura del film como resultado de la probable reestructuración de las moléculas de lípido en presencia de las AgNP-OA.<sup>48</sup> Convenientemente, esta información puede analizarse en términos de cambios en la rugosidad media o RMS (*“Root Mean Square roughness”*) de los films. Considerando diferentes regiones de la zona mapeada para cada film se determinó una RMS promedio de  $(1,8 \pm 0,4)$  nm para la monocapa soportada de SCM a 30 mN/m, mientras que este parámetro se ve modificado

hacia un valor promedio de  $(4,8 \pm 0,3)$  nm para el film de SCM/AgNP-OA. El aumento en la rugosidad media tras la incorporación de las AgNPs, se relaciona directamente con una mayor aleatoriedad de la distribución molecular del film y podría estar vinculado con el comportamiento de expansión (fluidización) incrementada observado en las isotermas de Langmuir correspondientes.<sup>54</sup>



**Figura III.4.21.** Imágenes de AFM para films transferidos por la técnica de Langmuir-Blodgett. (A) membrana modelo de estrato córneo (SCM). (B) Mezcla SCM/AgNP-OA en proporción 0,9995:0,0005.

### III.4.5- Adsorción de fosfolípidos en la superficie de las AgNP-OA

Al estudiar la interacción entre nanopartículas y biomoléculas es importante considerar el tipo de fenómenos de interfase que puede establecerse entre ambas entidades. Las biomoléculas pueden estar presentes en la superficie de las NPs tanto por interacción con los ligandos de superficie (fuerzas electrostáticas, van der Waals) o a por medio de un intercambio de ligando.<sup>11,55</sup> Existe amplia evidencia reportada acerca de la habilidad de las nanopartículas para adsorber proteínas en su superficie y formar la denominada corona proteica o “*protein-corona*” que tiene fundamental incidencia en el comportamiento que las nanopartículas presentarán a nivel biológico.<sup>56</sup> La formación de este complejo es un proceso dinámico y competitivo que depende de las fuerzas actuantes y su composición final se encuentra regida por diversos factores concernientes a la

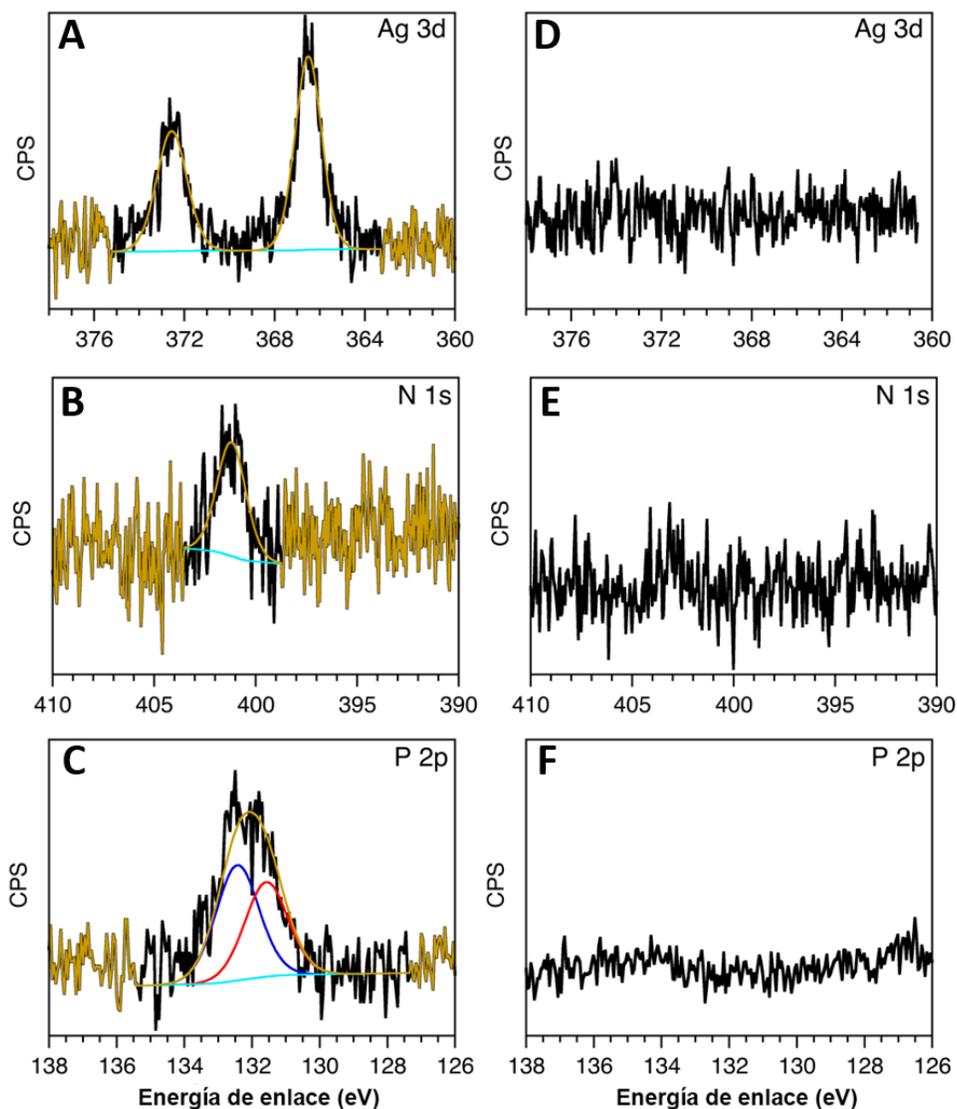
estructura y propiedades del nanomaterial, tales como: forma, tamaño, composición, grupos funcionales superficiales, etc.<sup>55,56</sup>

Sin embargo, existe muy poca información en la bibliografía en torno a la adsorción o intercambio de ligando entre lípidos y nanopartículas. Los lípidos en sí, representan componentes mayoritarios de las membranas biológicas y por ello el estudio de este tipo de interacciones resulta de gran interés, sobre todo si las nanopartículas son propuestas para uso tópico en aplicaciones como agentes antimicrobianos, o como parte de cosméticos o bloqueadores solares. Šegota et. al. estudiaron la interacción entre nanopartículas de Ag y Au hidrofóbicas, recubiertas por un ligando estearilamina, y bicapas lipídicas soportadas de DMPC como modelo de biomembrana. Los autores encontraron que la parte hidrofóbica de los ligandos estearilo, se ubica dentro de la parte hidrofóbica de la bicapa, fusionándose con las cadenas hidrocarbonadas del lípido. Este fenómeno da lugar a una reorganización de la bicapa que resulta en un incremento en las cantidades de lípido que rodean a las nanopartículas, y una disminución en la región que se localiza entre ellas.<sup>57</sup>

Con el fin de lograr un mejor entendimiento acerca de los factores que intervienen y regulan la interacción entre las AgNP-OA y los lípidos, se llevó a cabo un estudio por medio de XPS para determinar la existencia de fenómenos de adsorción/intercambio de ligandos en la superficie de las AgNP-OA empleando liposomas multilamelares (MLVs) de POPC como modelo de biomembrana. Para ello, las nanopartículas fueron mezcladas con los MLVs del lípido en medio acuoso por aproximadamente 96 h. Luego de ello, se realizaron sucesivos ciclos de lavado y centrifugado para remover la POPC libre y evaluar el *pellet* resultante, tal como fue detallado en la sección **III.3.3**. Los espectros de HR XPS para el pellet obtenido de la mezcla AgNP-OA/POPC son mostrados en la **Figura III.4.22 A-C**, y fueron comparados con aquellos obtenidos para el último ciclo de lavado con cloroformo efectuado para la extracción de lípido libre y nanopartícula libre (**Figura III.4.22 D-F**).

Como puede observarse en la muestra correspondiente al pellet, las señales de Ag 3d se encuentran presentes, lo que señala la presencia efectiva de las AgNP-OA. Además, fue posible detectar la presencia de las señales débiles de N 1s y P 2p correspondientes a las moléculas de POPC, cuya intensidad está próxima a la relación señal/ruido de las mediciones. Por otro lado, se confirmó la completa remoción de POPC por ausencia de sus señales de XPS características (P 2p, N1s) en la muestra de sobrenadante del último ciclo de lavado. Adicionalmente no se detectaron en este último caso, residuos correspondientes a las AgNP-OA. Estos resultados indican que cierta

cantidad de fosfolípido permanece adsorbido sobre la superficie de las nanopartículas, ya sea por fisisorción (favorecido por fuerzas de van der Waals entre la POPC y las cadenas hidrocarbonadas del ácido oleico) o por unión al núcleo de la superficie de plata a través de interacciones con el oxígeno del grupo fosfato de la POPC. El fenómeno de unión directa al núcleo de plata podría requerir tanto la presencia de espacios vacíos en la superficie de las NPs como la existencia de un proceso de intercambio OA-ligando. En un trabajo realizado por Bakshi et. al.<sup>58</sup> se encontró que los lípidos de tipo fosfocolina poseen una baja habilidad como agentes estabilizantes de nanopartículas de plata y oro. Teniendo en cuenta estos antecedentes, sería de esperar que la POPC en nuestro sistema, se encuentre débilmente adsorbida sobre la superficie de la plata interaccionando principalmente por interacciones de van der Waals con las cadenas hidrocarbonadas de OA, sin producir un desplazamiento significativo de los ligandos pertenecientes a las nanopartículas.



**Figura III.4.22.** Espectros de HR XPS mostrando las regiones Ag 3d, N 1s y P 2p para el pellet AgNP-OA/POPC (A-C) y el sobrenadante que resulta del último ciclo de lavado con cloroformo (D-F) en el cual se denota la ausencia de señales residuales de POPC y AgNP-OA.

#### III.4.6- Liberación de iones $\text{Ag}^+$ desde AgNP-OA hidrofóbicas

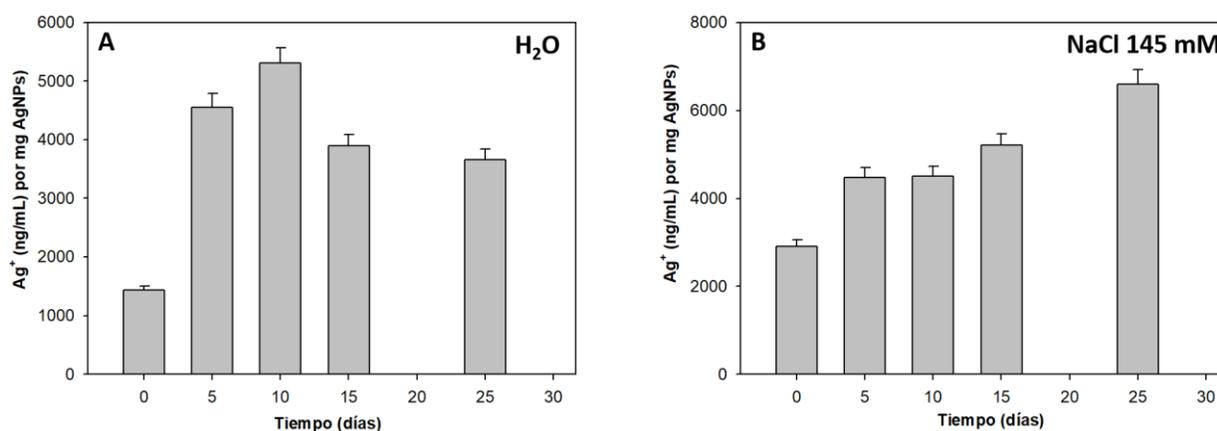
Una propiedad importante a evaluar para la aplicación biotecnológica de las AgNP es su habilidad para liberar iones  $\text{Ag}^+$  al medio que las rodea. Como se introdujo en III.1.1, es sabido que las AgNPs son capaces de llevar a cabo una liberación progresiva de iones plata desde su

núcleo cristalino.<sup>1,2</sup> Una vez liberados desde las NPs hacia el entorno o interior de las células, los iones  $\text{Ag}^+$  activan diversos mecanismos tales como la producción de ROS y peroxidación lipídica que tiene efectos letales en las bacterias.<sup>4</sup> Asimismo, la mayoría de la información disponible está principalmente relacionada a nanopartículas hidrofílicas, y refleja que la cantidad de iones  $\text{Ag}^+$  necesaria para conseguir la inhibición contra diferentes microorganismos depende de cada microorganismo (diferentes vías metabólicas) y de las características de las nanopartículas. En general las concentraciones requeridas para la inhibición en el crecimiento de los microorganismos se encuentran en el rango micro-molar.<sup>4</sup> Aunque se ha demostrado que las AgNPs hidrofílicas poseen buena eficiencia para muchas aplicaciones biomédicas, las nanopartículas hidrofóbicas pueden poseer una mejor compatibilidad con medios lipofílicos debido a su capacidad de alcanzar, permanecer y desestructurar estos ambientes, logrando probablemente una reducción en la dosis necesaria.

De esta manera, se procedió a realizar la medición de las concentraciones de  $\text{Ag}^+$  liberada desde las AgNP-OA en diferentes medios acuosos:  $\text{H}_2\text{O}$  Milli Q, solución isotónica de NaCl 145 mM y en presencia de vesículas multilamelares (MLVs constituidas por POPC o DMPC). En la **Tabla III.4.2** se resumen las concentraciones de iones  $\text{Ag}^+$  liberadas por cada muestra luego de 5 días. Los valores se mantuvieron constantes por al menos 15 días (**Figura III.4.23**).

**Tabla III.4.2.**  $\text{Ag}^+$  liberada desde las AgNP-OA hidrofóbicas en diferentes medios luego de 5 días de preparada la muestra, a 25°C.

Muestra	$\text{Ag}^+$ (ng/mL) por mg AgNP-OA
AgNP-OA (agua)	4560 ± 200
AgNP-OA (NaCl 145 mM)	4480 ± 200
AgNP-OA + DMPC (agua)	10047 ± 200
AgNP-OA + POPC (agua)	8160 ± 200



**Figura III.4.23.** Ag<sup>+</sup> liberada por 1 mg de AgNP-OA en **A)** agua y **B)** en presencia de NaCl 145 mM.

Ante la variación de medios de liberación, no se observó una diferencia significativa en la liberación de Ag<sup>+</sup> desde agua con respecto a la solución de NaCl, o entre suspensiones conteniendo POPC o DMPC. Sin embargo, se observó que, en presencia de fosfolípidos la cantidad de iones Ag<sup>+</sup> liberada dobló la cantidad liberada en medios acuosos (en ausencia de lípidos). Esta tendencia podría estar relacionada al hecho de que los fosfolípidos facilitan la dispersión de las nanopartículas hidrofóbicas en el medio acuoso, otorgándoles un medio de liberación más estable en el tiempo, el cual no está presente cuando las AgNP-OA se encuentran en agua o en solución electrolítica. La cantidad de iones Ag<sup>+</sup> liberada en 5 días desde 1 mg de AgNP-OA representa cerca del 0,5-1% de la masa inicial de AgNP-OA y alcanza el rango  $\mu\text{M}$  para las condiciones aquí exploradas. Si bien estas concentraciones de plata biocida parecen superar el margen requerido capaz de ejercer un efecto antimicrobiano eficiente, es importante tener en cuenta que dichas concentraciones dependerán del funcionamiento de la maquinaria metabólica de cada organismo en particular. Por ejemplo, el tratamiento para la inhibición en el crecimiento y la proliferación de un biofilm, precisará estrictamente tanto de la disponibilidad de altas concentraciones de Ag<sup>+</sup> en el medio, como de una liberación sostenida a lo largo del tiempo.<sup>12</sup> Los resultados aquí encontrados demostraron el potencial de estas nanopartículas hidrofóbicas de plata para actuar como agentes antimicrobianos compatibles con medios lipofílicos.

### III.5- CONCLUSIÓN

En el presente capítulo, se demostró que las nanopartículas de plata hidrofóbicas funcionalizadas con el ácido graso natural, ácido oleico, son capaces de interactuar fuertemente con biomembranas modelo. La presencia de las AgNP-OA en monocapas de fosfolípidos simples (DMPC, POPC, DSPC) o en una mezcla lipídica que simula la composición del estrato córneo (SCM) ocasiona cambios en las monocapas impartiendo un desplazamiento de las isothermas hacia áreas mayores que las esperadas para un film mixto ideal. La notoria disminución en los valores numéricos calculados para el módulo de compresibilidad ( $C_s^{-1}$ ) permitió corroborar el incremento en la elasticidad en el plano (fluidez) de las membranas como resultado de la incorporación de las AgNP-OA. Lípidos que poseen carácter LE y LC se mostraron afectados por la incorporación de las nanopartículas, pero aquellos de fase LC mostraron los mayores cambios, en especial, la mezcla SCM. Esto sugiere que los lípidos con fase LC experimentaron un mayor desorden a nivel de la organización molecular introducido por las NPs con el subsiguiente incremento en la elasticidad en el plano de los films. En el caso de la mezcla de SCM, esto podría tener implicancias importantes en lo que respecta a la dinámica de procesos de transmembrana, la permeabilidad de la piel y la función barrera que ejerce el estrato córneo. Los resultados observados en modelos de biomembranas con coexistencia de fases LE-LC (DPPC y mezcla DMPC/DSPC 50:50) demostraron que las AgNP-OA producen una menor expansión del film mixto, ubicándose preferentemente en los bordes de los dominios condensados.

La microscopía de ángulo de Brewster (BAM) permitió evidenciar un fenómeno de segregación de fases en el caso de SCM. Dicho comportamiento se vio reflejado a nivel topográfico donde se observó que la coexistencia de fases en la mezcla de SCM, está presente hasta presiones mayores en presencia de AgNP-OA. En este último caso, la incorporación de las AgNP-OA produjo un aumento notorio en la proporción de fase LE a presiones altas en contraste con lo observado a presiones análogas en films de lípidos en ausencia de nanopartículas.

De manera adicional, se establecieron comparaciones entorno a resultados obtenidos para nanopartículas magnéticas funcionalizadas con ácido oleico (MNP-OA) y las AgNP-OA en monocapas de Langmuir. La respuesta diferencial observada entre ambas nanopartículas al comparar topografías en la interfase fluida en condiciones similares, dio cuenta de que las interacciones inter-partícula y frente a los fosfolípidos usados como modelos de biomembrana no

son únicamente reguladas por el ligando que las recubre sino también por la naturaleza (química y física) del núcleo del cual están compuestas.

Monocapas de Langmuir fueron satisfactoriamente transferidas a sustratos sólidos por medio de la técnica de Langmuir-Blodgett (LB) para su posterior caracterización por microscopía de fuerza atómica (AFM). La topografía (distribución de diámetros) observada para las AgNP-OA transferidas permitió corroborar la robustez de este nanomaterial, cuya estabilidad permaneció inalterada tanto en interfases agua-aire como en aquellas de naturaleza vidrio-aire. Los cambios en la topografía observada para films LB de estrato córneo luego de la incorporación de las AgNP-OA denotaron fuertes similitudes con respecto a las observaciones realizadas en isotermas de Langmuir y BAM. Así, el incremento en la rugosidad de los films SCM/AgNP-OA fue indicativo de una disminución en el empaquetamiento de los dominios condensados del estrato córneo, y podría relacionarse con el comportamiento de aumento en la elasticidad (“fluidez”) y demezclado observado anteriormente.

También fue posible observar la adsorción de fosfolípido (POPC) sobre la superficie de las AgNP-OA en cantidades bajas. La complejidad de las interacciones entre los componentes de las monocapas fue analizada a nivel molecular y a nivel mesoescala. La presencia de interacciones favorables entre las cadenas hidrocarbonadas del ácido oleico y las cadenas pertenecientes a los fosfolípidos, principalmente a través de lo que podrían ser fuerzas cohesivas de van der Waals, fue demostrado por medio de ensayos en XPS. A nivel de la mesoescala, el sistema es capaz de adoptar una organización supramolecular en la interfase, no ideal, probablemente impuesta por efectos estéricos.

Finalmente pudimos determinar que las AgNP-OA son capaces de liberar iones  $\text{Ag}^+$  en ambientes acuosos y lipofílicos en rangos de concentraciones que han sido ampliamente reportadas como biocidas. Estos estudios permitieron corroborar que las AgNP-OA pueden ser empleadas como potenciales agentes antimicrobianos en ambientes lipofílicos, como aplicaciones tópicas. El conocimiento adquirido acerca de las interacciones que gobiernan los procesos AgNP-OA/biomembrana apunta a contribuir en el futuro al diseño controlado de estas nanopartículas para aplicaciones cosméticas y transdérmicas.

### III.6- REFERENCIAS

- (1) Liu, Jingyu; Wang, Zhongying; Liu, Frances D; Kane, Agnes B.; Hurt, R. H. Chemical Transformations of Nanosilver in Biological Enviroments. *ACS Nano* **2012**, 6 (11), 9887–9899.
- (2) Lansdown, A. B. G. A Pharmacological and Toxicological Profile of Silver as an Antimicrobial Agent in Medical Devices. *Adv. Pharmacol. Sci.* **2010**, 2010, 1–16.
- (3) Lansdown, A. B. G. Silver in Health Care: Antimicrobial Effects and Safety in Use. *Curr. Probl. Dermatol.* **2006**, 33, 17–34.
- (4) Long, Y. M.; Hu, L. G.; Yan, X. T.; Zhao, X. C.; Zhou, Q. F.; Cai, Y.; Jiang, G. Bin. Surface Ligand Controls Silver Ion Release of Nanosilver and Its Antibacterial Activity against Escherichia Coli. *Int. J. Nanomedicine* **2017**, 12, 3193–3206.
- (5) Baptista, P. V.; McCusker, M. P.; Carvalho, A.; Ferreira, D. A.; Mohan, N. M.; Martins, M.; Fernandes, A. R. Nano-Strategies to Fight Multidrug Resistant Bacteria-"A Battle of the Titans". *Front. Microbiol.* **2018**, 9, 1–26.
- (6) Marambio-Jones, C.; Hoek, E. M. V. A Review of the Antibacterial Effects of Silver Nanomaterials and Potential Implications for Human Health and the Environment. *J. Nanoparticle Res.* **2010**, 12 (5), 1531–1551.
- (7) Burduşel, A.; Gherasim, O.; Grumezescu, A. M.; Mogoantă, L.; Ficai, A.; Andronescu, E. Biomedical Applications of Silver Nanoparticles: An Up-to-Date Overview. *Nanomaterials* **2018**, 8 (681), 1–26.
- (8) Lopez-Esparza, J.; Francisco Espinosa-Cristobal, L.; Donohue-Cornejo, A.; Reyes-Lopez, S. Y. Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles in Polycaprolactone Nanofibers against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2016**, 55 (49), 12532–12538.
- (9) Hasan, A.; Waibhaw, G.; Saxena, V.; Pandey, L. M. Nano-Biocomposite Scaffolds of Chitosan, Carboxymethyl Cellulose and Silver Nanoparticle Modified Cellulose Nanowhiskers for Bone Tissue Engineering Applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, 111,

- 923–934.
- (10) Kennedy, D. C.; Orts-Gil, G.; Lai, C. H.; Müller, L.; Haase, A.; Luch, A.; Seeberger, P. H. Carbohydrate Functionalization of Silver Nanoparticles Modulates Cytotoxicity and Cellular Uptake. *J. Nanobiotechnology* **2014**, *12* (1), 1–8.
  - (11) Maya Girón, J. V.; Vico, R. V.; Maggio, B.; Zelaya, E.; Rubert, A.; Benítez, G.; Carro, P.; Salvatorezza, R. C.; Vela, M. E. Role of the Capping Agent in the Interaction of Hydrophilic Ag Nanoparticles with DMPC as a Model Biomembrane. *Environ. Sci. Nano* **2016**, *3* (2), 462–472.
  - (12) Banerjee, I.; Pangule, R. C.; Kane, R. S. Antifouling Coatings: Recent Developments in the Design of Surfaces That Prevent Fouling by Proteins, Bacteria, and Marine Organisms. *Adv. Mater.* **2011**, *23* (6), 690–718.
  - (13) Labouta, H. I.; El-Khordagui, L. K.; Kraus, T.; Schneider, M. Mechanism and Determinants of Nanoparticle Penetration through Human Skin. *Nanoscale* **2011**, *3* (12), 4989–4999.
  - (14) Larese Filon, F.; Mauro, M.; Adami, G.; Bovenzi, M.; Crosera, M. Nanoparticles Skin Absorption: New Aspects for a Safety Profile Evaluation. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2015**, *72* (2), 310–322.
  - (15) Soriano, G. B.; da Silva Oliveira, R.; Camilo, F. F.; Caseli, L. Interaction of Non-Aqueous Dispersions of Silver Nanoparticles with Cellular Membrane Models. *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, *496*, 111–117.
  - (16) Gupta, R.; Rai, B. Effect of Size and Surface Charge of Gold Nanoparticles on Their Skin Permeability: A Molecular Dynamics Study. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–13.
  - (17) Giner-Casares, J. J.; Brezesinski, G.; Möhwald, H. Langmuir Monolayers as Unique Physical Models. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2014**, *19* (3), 176–182.
  - (18) Brezesinski, G.; Möhwald, H. Langmuir Monolayers to Study Interactions at Model Membrane Surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2003**, *100–102*, 563–584.
  - (19) Caseli, L.; Nobre, T. M.; Ramos, A. P.; Monteiro, D. S.; Zaniquelli, M. E. D. The Role of Langmuir Monolayers to Understand Biological Events. *ACS Symp. Ser.* **2015**, *1215*, 65–

- 88.
- (20) Matshaya, T. J.; Lanterna, A. E.; Granados, A. M.; Krause, R. W. M.; Maggio, B.; Vico, R. V. Distinctive Interactions of Oleic Acid Covered Magnetic Nanoparticles with Saturated and Unsaturated Phospholipids in Langmuir Monolayers. *Langmuir* **2014**, *30* (20), 5888–5896.
- (21) Rascol, E., Devoisselle, J-M., Chopineau, J. The Relevance of Membrane Models to Understand Nanoparticles-cell Membrane Interactions. *Nanoscale* **2016**, *8* (23), 4780–4798.
- (22) Peetla, C.; Jin, S.; Weimer, J.; Elegbede, A.; Labhasetwar, V. Biomechanics and Thermodynamics of Nanoparticle Interactions with Plasma and Endosomal Membrane Lipids in Cellular Uptake and Endosomal Escape. *Langmuir* **2014**, *30*, 7522–7532.
- (23) Chiranjeevi, Peetla; Kavitha S. Rao; Vinod, L. Relevance of Biophysical Interactions of Nanoparticles with a Model Membrane in Predicting Cellular Uptake: Study with TAT Peptide-Conjugated Nanoparticles. *Mol. Pharm.* **2009**, *6* (5), 1311–1320.
- (24) Gaines, G. *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces*, 1st ed.; Interscience publishers: New York, USA., **1966**.
- (25) Marsh, D. Lateral Pressure in Membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **1996**, *1286* (3), 183–223.
- (26) Brown, R. E. & Brockman, H. L. Using Monomolecular Films to Characterize Lipid Lateral Interactions. *Methods Mol. Biol.* **2007**, *398*, 41–58.
- (27) Davies, J. T., Rideal, E. K. *Interfacial Phenomena*; Academic Press Inc.: London, England, **1961**.
- (28) Goto, T. E.; Caseli, L. Understanding the Collapse Mechanism in Langmuir Monolayers through Polarization Modulation-Infrared Reflection Absorption Spectroscopy. *Langmuir* **2013**, *29* (29), 9063–9071.
- (29) Pinzón Barrantes, J. J.; Maggio, B.; De Rossi, R. H.; Vico, R. V. Cavity Orientation Regulated by Mixture Composition and Clustering of Amphiphilic Cyclodextrins in

- Phospholipid Monolayers. *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121* (17), 4482–4491.
- (30) Vollhardt, D. Brewster Angle Microscopy: A Preferential Method for Mesoscopic Characterization of Monolayers at the Air/Water Interface. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2014**, *19* (3), 183–197.
- (31) Daear, W.; Mahadeo, M.; Prenner, E. J. Applications of Brewster Angle Microscopy from Biological Materials to Biological Systems. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2017**, *1859* (10), 1749–1766.
- (32) Hussain, S. A.; Dey, B.; Bhattacharjee, D.; Mehta, N. Unique Supramolecular Assembly through Langmuir – Blodgett (LB) Technique. *Heliyon* **2018**, *4* (12), e01038.
- (33) Hussain, S. A., Bhattacharjee, S. D., Bhattacharjee, D. Langmuir-Blodgett Technique a Unique Tool for Fabrication of Ultrathin Organic Films. *J. Env. Sci. Res.* **2005**, *4*, 25–33.
- (34) Birdi, K. S. *Lipid and Biopolimer Monolayers at Liquid Interfaces*; Plenum Press: New York, USA., **1989**.
- (35) El Kirat, K.; Morandat, S.; Dufrière, Y. F. Nanoscale Analysis of Supported Lipid Bilayers Using Atomic Force Microscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1798* (4), 750–765.
- (36) Morandat, S.; Azouzi, S.; Beauvais, E.; Mastouri, A.; El Kirat, K. Atomic Force Microscopy of Model Lipid Membranes. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405* (5), 1445–1461.
- (37) Kurniawan, J.; Ventrici De Souza, J. F.; Dang, A. T.; Liu, G. Y.; Kuhl, T. L. Preparation and Characterization of Solid-Supported Lipid Bilayers Formed by Langmuir-Blodgett Deposition: A Tutorial. *Langmuir* **2018**, *34* (51), 15622–15639.
- (38) Zhengjian, L., Banerjee, S., Zagorski, K., Lyubchenko, Y. Supported Lipid Bilayers for Atomic Force Microscopy Studies. *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1814*, 129–143.
- (39) Morris, V. J., Kirby, A. R., Gunning, A. P. *Atomic Force Microscopy for Biologists*, 2nd ed.; Imperial College Press: London, England, **2010**.
- (40) Zulueta Diaz, Y., Mottola, M.; Vico, R., Wilke, N., Fanani, M. L. The Rheological Properties of Lipid Monolayers Modulate the Incorporation of L-Ascorbic Acid Alkyl Esters. *Langmuir* **2016**, *32* (2), 587–595.

- (41) Díaz-López, R.; Tsapis, N.; Libong, D.; Chaminade, P.; Connan, C.; Chehimi, M. M.; Berti, R.; Taulier, N.; Urbach, W.; Nicolas, V.; et al. Phospholipid Decoration of Microcapsules Containing Perfluorooctyl Bromide Used as Ultrasound Contrast Agents. *Biomaterials* **2009**, *30* (8), 1462–1472.
- (42) Wilson, D.; Langell, M. A. XPS Analysis of Oleylamine/Oleic Acid Capped Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles as a Function of Temperature. *Appl. Surf. Sci.* **2014**, *303*, 6–13.
- (43) Kim, H. K.; Kim, K.; Byun, Y. Preparation of a Chemically Anchored Phospholipid Monolayer on an Acrylated Polymer Substrate. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3435–3444.
- (44) González-Fuenzalida, R.A., Moliner-Martínez, Y., González-Béjar, M., Molins-Legua, C., Verdú-Andres, J., Pérez-Prieto, J., Campins-Falcó, P. In Situ Colorimetric Quantification of Silver Cations in the Presence of Silver Nanoparticles. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 10013–10016.
- (45) You, S. S.; Rashkov, R.; Kanjanaboos, P.; Calderon, I.; Meron, M.; Jaeger, H. M.; Lin, B. Comparison of the Mechanical Properties of Self-Assembled Langmuir Monolayers of Nanoparticles and Phospholipids. *Langmuir* **2013**, *29* (37), 11751–11757.
- (46) Mottola, M.; Vico, R. V.; Villanueva, M. E.; Fanani, M. L. Alkyl Esters of L-Ascorbic Acid: Stability, Surface Behaviour and Interaction with Phospholipid Monolayers. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, *457*, 232–242.
- (47) Mangiarotti, A.; Wilke, N. Energetics of the Phase Transition in Free-Standing versus Supported Lipid Membranes. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119* (28), 8718–8724.
- (48) Gkeka, P.; Angelikopoulos, P.; Sarkisov, L.; Cournia, Z. Membrane Partitioning of Anionic, Ligand-Coated Nanoparticles Is Accompanied by Ligand Snorkeling, Local Disordering, and Cholesterol Depletion. *PLoS Comput. Biol.* **2014**, *10* (12), 1–10.
- (49) Jeevanandam, J.; Barhoum, A.; Chan, Y. S.; Dufresne, A.; Danquah, M. K. Review on Nanoparticles and Nanostructured Materials: History, Sources, Toxicity and Regulations. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2018**, *9* (1), 1050–1074.
- (50) Fukumori, Y.; Takeuchi, H.; Ando, Y. Structural Control of Nanoparticles. In *Nanoparticle Technology Handbook*; Hosokawa, M., Naito, M., Nogi, K. Yokoyama, T., Ed.; Elsevier:

- Osaka, Japan, **2018**; pp 49–107.
- (51) Ji, X.; Wang, C.; Xu, J.; Zheng, J.; Gattás-Asfura, K. M.; Leblanc, R. M. Surface Chemistry Studies of (CdSe)ZnS Quantum Dots at the Air-Water Interface. *Langmuir* **2005**, *21* (12), 5377–5382.
- (52) Boden, N.; Sixl, F. Forces between Phospholipid Bilayers. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **1986**, *81* (19159), 191–199.
- (53) Pullmannová, P.; Pavlíková, L.; Kováčik, A.; Sochorová, M.; Školová, B.; Slepíčka, P.; Maixner, J.; Zbytovská, J.; Vávrová, K. Permeability and Microstructure of Model Stratum Corneum Lipid Membranes Containing Ceramides with Long (C16) and Very Long (C24) Acyl Chains. *Biophys. Chem.* **2017**, *224*, 20–31.
- (54) Araújo, F. T. De; Caseli, L. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Rhodanese Incorporated in Langmuir and Langmuir – Blodgett Films of Dimyristoylphosphatidic Acid : Physical Chemical Properties and Improvement of the Enzyme Activity. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2016**, *141*, 59–64.
- (55) Kharazian, B.; Hadipour, N. L.; Ejtehadi, M. R. Understanding the Nanoparticle-Protein Corona Complexes Using Computational and Experimental Methods. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2016**, *75*, 162–174.
- (56) Lundqvist, M.; Augustsson, C.; Lilja, M.; Lundkvist, K.; Dahlbäck, B.; Linse, S.; Cedervall, T. The Nanoparticle Protein Corona Formed in Human Blood or Human Blood Fractions. *PLoS One* **2017**, *12* (4), 1–15.
- (57) Šegota, S.; Vojta, D.; Kendziora, D.; Ahmed, I.; Fruk, L.; Baranović, G. Ligand-Dependent Nanoparticle Clustering within Lipid Membranes Induced by Surrounding Medium. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119* (16), 5208–5219.
- (58) Bakshi, M. S.; Possmayer, F.; Petersen, N. O. Role of Different Phospholipids in the Synthesis of Pearl-Necklace-Type Gold-Silver Bimetallic Nanoparticles as Bioconjugate Materials. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111* (38), 14113–14124.



## CAPÍTULO IV

### **Actividad fusogénica de nanopartículas magnéticas hidrofóbicas en liposomas. Efectos en el proceso de fusión por aplicación de campos magnéticos.**

#### **RESUMEN**

El siguiente capítulo comprende un amplio estudio acerca del proceso de fusión de membranas lipídicas mediado por nanopartículas magnéticas funcionalizadas con ácido oleico (MNP-OA). Empleando vesículas unilamelares como modelos de membranas y a través de diversas metodologías, se realizaron ensayos para determinar la cinética y los cambios morfológicos producidos durante el proceso de fusión como resultado de la incorporación de estas nanopartículas. Adicionalmente, se evaluó el efecto de la aplicación de campos magnéticos de potencial variable con el objetivo de regular el proceso de fusión en velocidades y proporciones deseadas. Los resultados obtenidos permitieron conocer que tanto la velocidad como la extensión en la cual ocurre la fusión de vesículas puede ser modificada mediante la aplicación del estímulo externo en cuestión. Finalmente, fue posible proponer un mecanismo por el cual transcurre la acción fusogénica de las MNP-OA, así como también demostrar fehacientemente la capacidad de estas nanopartículas como potenciales plataformas con aplicaciones en el campo de fusión de membranas.

## IV.1- INTRODUCCIÓN

### IV.1.1- Mecanismo y regulación biológica de la fusión de membranas lipídicas

En su significado más estricto, la fusión de membranas es el proceso de mezclado o unión de células adyacentes, vesículas o liposomas para producir el mezclado de contenidos internos y formar una gran entidad fusionada.<sup>1</sup> Este es un proceso integral presente en una gran variedad de eventos biológicos como la formación de gametos por fertilización, infecciones virales de células huésped, secreción de hormonas endócrinas y señalización neuronal, entre otras. Biológicamente, todos estos eventos tienen su origen en el transporte vesicular selectivo, de vital importancia en la célula eucariota.<sup>1,2</sup> En ellos, vesículas transportadoras recubiertas por una capa superficial de proteínas (*clatrin*, *coatómeros* o *caveolas*), son formadas por medio de brotes o invaginaciones producidos en las membranas pertenecientes a diferentes compartimentos celulares. La formación, persistencia y fusión final de estas vesículas recubiertas o *endosomas* se encuentra regulada por diversos factores, cada uno de ellos necesario para la cumplimentación del proceso global. Sistemáticamente, diferentes proteínas intervienen de manera activa en el direccionamiento y reconocimiento de las vesículas durante el transporte de metabolitos. *Adaptinas*, son requeridas para el atrapamiento de proteínas receptoras de transmembrana. La familia de proteínas *GTPasas* actúan como “interruptores moleculares”, alternando entre estados conformacionales GTP/GDP (activo/inactivo) que permiten el anclaje estable entre las vesículas transportadoras y las membranas *target* o receptoras. Adicionalmente, las vesículas de transporte deben ser altamente selectivas hacia la membrana *target* con la cual se fusionarán. Esta selectividad se encuentra mediada por proteínas llamadas SNAREs, las cuales se encuentran en sets complementarios (v- y t-SNAREs) en las membranas entre las cuales transcurre la fusión (*vesicle/target*). La unión de los dominios SNARE complementarios situados en las membranas opuestas, permite el anclaje y la aproximación adecuada para llevar a cabo el proceso de unión de bicapas.<sup>3,4</sup>

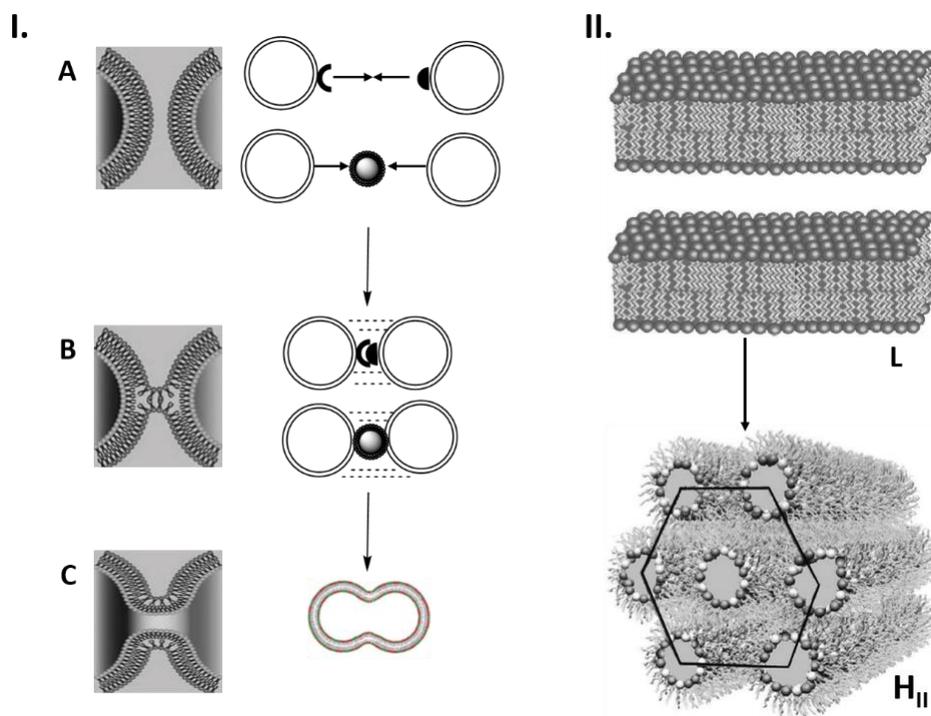
Sin embargo, anclaje y fusión son dos procesos diferentes. Una vez que la vesícula transportadora ha reconocido su membrana *target*, y se ha anclado a la misma, la fusión de membranas necesaria para descargar el contenido interno o *cargo*, debe ser gatillada por una señal extracelular. El proceso de anclaje requiere únicamente la aproximación suficiente de las

membranas como para que ambas bicapas interactúen y se adhieran entre sí. Por otro lado, la fusión necesita de una aproximación mucho más cercana tal que las bicapas se encuentren a una distancia de ~2 nm como para poder iniciar este evento. Para ello, se requiere la intervención de diferentes fuerzas conductoras que actúen en el espacio intermembrana promoviendo el acercamiento necesario. Esto es precedido por una disrupción local de la bicapa que resulta en la fusión de las capas externas de cada membrana formando el intermediario de hemifusión o “tallo”. En el arreglo lipídico final, un pequeño poro es formado desde este intermediario, el cual subsecuentemente se alarga hasta que ambos compartimentos lipídicos iniciales se vuelven uno. Los contenidos de ambos compartimentos se mezclan y el proceso de fusión se completa.<sup>1,4,5</sup>

Cada estado intermediario del proceso de fusión es caracterizado por un cambio de energía conformacional específica, las cuales constituyen la barrera de energía potencial necesaria de sobrepasar para llevar a cabo el proceso de fusión. Las entidades capaces de proveer la energía necesaria para atravesar estas barreras energéticas, se conocen como *fusógenos* o *agentes fusogénicos*. En las células, la mayoría de los procesos de fusión de membranas son catalizados por proteínas y péptidos especializados, capaces de promover las reorganizaciones estructurales de las moléculas lipídicas en las bicapas involucradas. Como se verá en la sección **IV.1.4**, se ha demostrado que gradientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y determinadas moléculas orgánicas y principios activos pueden participar en la inducción y regulación de estos procesos, y son calificados como fusógenos.<sup>6</sup>

Tal como es señalado por muchos autores, la etapa inicial del contacto vesicular es promovido fundamentalmente por interacciones atractivas de van der Waals, responsables del acercamiento de las membranas opuestas a la distancia mínima requerida.<sup>7</sup> Dado que dichas interacciones son contrarrestadas por fuerzas repulsivas de hidratación, electrostáticas y estéricas que impiden el contacto cercano de ambas bicapas, este es sin duda uno de los procesos energéticamente más demandante.<sup>8</sup> Si bien existen diferentes formas de iniciar esta aproximación, la disminución de la repulsión de hidratación intermembrana es uno de los procesos más importantes y diferentes mecanismos para alcanzar esta meta han sido descritos para fusógenos con estructura y propiedades variadas. Algunos de estos mecanismos se basan en la disminución de la densidad de carga superficial en las bicapas, otros en la disminución de la polaridad o incremento de la hidrofobicidad en la región hidrofílica intermembrana por deshidratación del ambiente intermedio tal como ha sido reportado por Lentz. et. al. para el caso del polietilenglicol.<sup>9</sup>

En la **Figura IV.1.1** se esquematizan las etapas de la fusión de bicapas y los arreglos moleculares establecidos durante este proceso.



**Figura IV.1.1. I-** Etapas básicas de la fusión de membranas, **A)** aproximación y contacto de membranas mediado por reconocimiento de dominios complementarios como en el caso de las proteínas SNARE o las lipoproteínas (esquema superior), o por entidades externas como nanopartículas, moléculas orgánicas o iones  $\text{Ca}^{2+}$  (esquema inferior). **B)** mezclado de los lípidos ubicados en la capa externa para formar el intermediario de hemi-fusión o “tallo”. **C)** mezclado de los lípidos de capa interna con la formación del poro y subsecuente mezclado de contenidos internos. **II-** Fases lipídicas entre las cuales ocurre la transición durante la fusión; fase “L” o lamelar (arriba) y fase “H<sub>II</sub>” o hexagonal invertida (abajo). Esquema adaptado de Mondal Roy, S.; Sarkar, M. Membrane Fusion Induced by Small Molecules and Ions. *J. Lipids* **2011**, 2011, 1–14.

Luego del contacto cercano de las membranas opuestas, su unión final requiere de un desorden temporal de los lípidos de las bicapas. Iniciando desde la *zona de contacto*, los lípidos de las bicapas experimentan una transición de fase de bicapa lamelar (L) a una fase hexagonal invertida (H<sub>II</sub>). Esta reestructuración conduce en cierta forma a una relocalización de los lípidos de las

bicapas permitiendo la exposición de las regiones hidrofóbicas necesarias para concretar la fusión. La principal fuerza motora para la inducción de esta reorganización es la acumulación de defectos de membrana y es, por ende, la segunda barrera energética de mayor importancia a lo largo del proceso. Estos defectos pueden ser introducidos por los agentes fusogénicos externos o alteraciones en parámetros físicos. La temperatura del medio, la curvatura de la membrana y la tensión superficial, entre otros, son capaces de incorporar estrés y tensión en las membranas, introduciendo defectos en dichos sistemas.<sup>5,10-12</sup>

Fundamentalmente debido a su gran implicancia en los procesos vitales, la fusión de membranas constituye un campo de estudio extremadamente importante. El control de estos procesos en muchos métodos bioquímicos *in vitro* e *in vivo*, y en procesos biotecnológicos es de gran utilidad. Sumado a esto, hoy en día la posibilidad de controlarlo representa una herramienta alternativa e innovadora en el área de la química supramolecular y de la nanotecnología. Además, el desarrollo y entendimiento de nuevos mecanismos involucrados en este evento y su regulación guiada por nanomateriales permitirá a futuro el diseño de aplicaciones en diversas áreas desde la biología molecular y la nanobiotecnología hasta la síntesis de nuevos materiales.

#### IV.1.2- Liposomas como base de modelos de fusión

Como fue descrito en el **Capítulo I**, las vesículas unilamelares o *liposomas*, representan una parte integral en la investigación y aplicaciones clínicas en el campo de la nanomedicina.<sup>13-18</sup> Debido a la estructura de los liposomas que cuenta con la presencia de un núcleo acuoso limitado por una bicapa lipídica, además de ser utilizadas como modelos de biomembranas con fines de investigación biofísica son actualmente estudiadas como sistemas de transporte y liberación de moléculas bioactivas, tanto hidrofílicas como hidrofóbicas. Dentro de este campo, el empleo de liposomas como sistemas modelo para el estudio de fusión de membranas ha permitido grandes avances en torno al desarrollo de terapias médicas como el transporte de genes.<sup>16,19</sup> Debido a la baja difusión del material genético desde el sitio de administración o las dificultades para atravesar barreras endoteliales, los agentes terapéuticos empleados en estas terapias (ADN plasmídico, oligonucleótidos, siARN), son vectorizados en liposomas que actúan como *carriers* sintéticos. Es sabido que proteínas de fusión viral de cepas como *HIV* e *influenza*, son responsables de catalizar

la fusión de las membranas virales con las endosómicas, permitiendo el ingreso del ADN viral al citosol donde es replicado.<sup>2</sup> Imitando un mecanismo análogo, muchas investigaciones se han avocado a la carga de agentes genéticos en liposomas de composición lipídica variada y junto al empleo de proteínas virales se induce su fusión a membranas celulares. De esta manera se intenta tratar enfermedades de diversa índole cambiando la expresión de un gen, reemplazando genes dañados o introduciendo genes faltantes.<sup>20</sup>

Otro aspecto sumamente importante en el uso de liposomas como modelos de fusión, es que la composición, tamaño y carga superficial, ente otras propiedades, pueden ser fácilmente controladas para alcanzar los requerimientos de un experimento en particular. Sin embargo, la alta sensibilidad del sistema hacia cualquiera de estas variables puede dificultar la identificación del origen de la fusión obtenida. Este es el caso de liposomas unilamelares pequeños (SUVs), en los cuales su tamaño reducido les confiere una alta curvatura espontánea. El estrés y tensión mecánica producidos por esta curvatura, les provee a las membranas la perturbación y energía necesarias para fusionarse por sí solas. Otro ejemplo en el cual se demuestra que la capacidad fusogénica de las bicapas lipídicas es fuertemente dependiente de la composición de lípidos, es cuando se incorporan en los liposomas, lisofosfolípidos. Los mismos, con su única cadena acilo, proveen una curvatura positiva (dada la estructura de cono invertido que poseen) y ha sido demostrada su capacidad de inhibir fusión. Por el contrario, lípidos con una curvatura altamente negativa (estructura de cono) como 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) o el ácido fosfatídico, incrementan la velocidad de fusión dada su propensión estérica a inducir la formación del intermediario de hemi-fusión.<sup>3</sup>

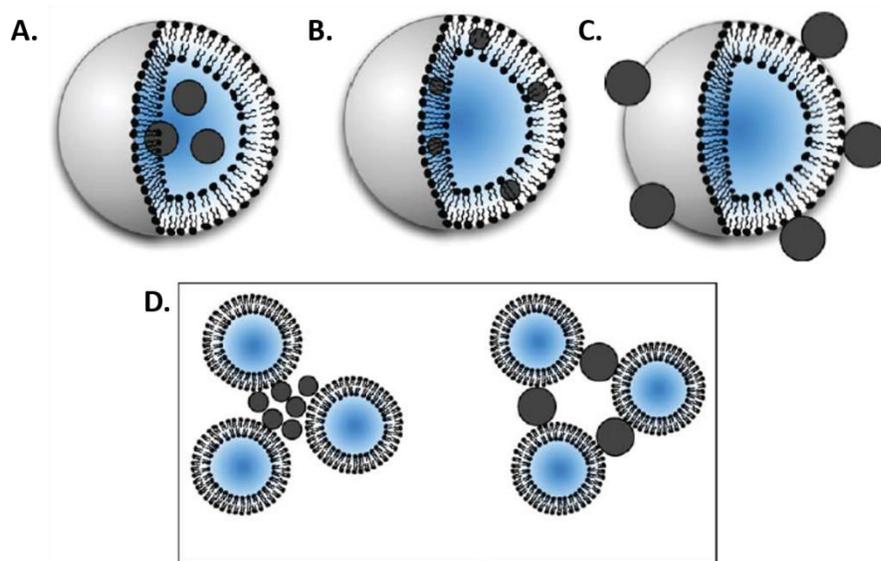
Los liposomas pueden también ser funcionalizados con ligandos para gatillar o introducir una interacción específica con su ambiente o con otros liposomas, en cuyo caso, las propiedades específicas de los lípidos como carga, largo de cadena, nivel de insaturación y porcentaje de colesterol, por ejemplo, pueden modificar las proporciones y velocidades con las cuales tiene lugar el proceso de fusión. Si los lípidos de la bicapa son capaces de exponer cargas superficiales, agentes fusogénicos con cargas opuestas, probablemente sean capaces de incrementar la efectividad del proceso de fusión mediado por fuerzas electrostáticas.<sup>21</sup>

En resumen, variaciones en las propiedades de los lípidos pueden tener una influencia significativa en la cinética y mecanismo de fusión de liposomas como sistemas modelo, en particular si las estructuras poseen altas curvaturas como en el caso de las SUVs. Por ello, modelos

de liposomas de diámetros en un intervalo de entre 80-200 nm (Vesículas Unilamelares Grandes o LUVs) representan sistemas más eficientes en un compromiso estabilidad/carga y son, por ende, las más empleados como membranas modelo en el estudio de los procesos de fusión.<sup>22</sup> Las LUVs constituyen el modelo más empleado de liposomas dentro de la gran variedad de aplicaciones biofísicas, farmacológicas y nanotecnológica. Ello encuentra justificación en la gran versatilidad sintética que poseen por medio de diversos métodos (extrusión, sonicación, fusión, etc.) y además por la variabilidad en cuanto a composiciones lipídicas y funcionalización. Son también, las estructuras más robustas para ser empleadas en técnicas espectroscópicas como ensayos de fluorescencia, espectroscopía de absorción, dicroísmo circular, FT-IR, e incluso, en técnicas de microscopía como TEM, SEM y AFM, entre otras. El modelo de vesículas unilamelares gigantes (GUVs), cuyo rango de tamaños contempla estructuras de alrededor de 1  $\mu\text{m}$  y superiores, poseen también la practicidad de un fácil manejo y observación por medio de microscopías ópticas.<sup>23</sup> Estas vesículas, usualmente preparadas por el método de electroformación, han sido ampliamente utilizadas en microscopía confocal de fluorescencia para la determinación de alteraciones morfológicas y cambios estructurales en bicapas lipídicas, como resultado de la introducción de distintos estímulos y agentes externos.

Una de las plataformas más interesantes de introducir hasta aquí, y que podría afirmarse como uno de los nanomateriales más explorados en las últimas décadas para el transporte de fármacos controlado por estímulos externos, son los *magnetoliposomas*.<sup>13,24-27</sup> Como se describió en capítulos anteriores, las nanopartículas superparamagnéticas de óxidos de hierro (SPIONs) poseen antecedentes importantes en lo que respecta a su empleo en el desarrollo de nanomateriales para terapias biomédicas y teragnósticas. La capacidad de estas nanopartículas para responder a una amplia gama de estímulos externos (campos magnéticos, temperatura, luz infrarroja, etc), las posicionan como los candidatos ideales para la liberación controlada espacial y temporal de agentes con acción terapéutica. Pese las características ventajosas en torno a su fácil manipulación y características fisicoquímicas favorables, las MNPs pueden tener asociadas problemas de estabilidad y baja capacidad de carga o pérdida (*leakage*) del fármaco a lo largo de su recorrido por los diferentes compartimentos fisiológicos, en particular, las vías sanguíneas una vez administradas. Así, los magnetoliposomas surgen como una vía que mejora el desempeño del sistema transportador alcanzando mayores cargas del fármaco vectorizado, biodisponibilidad y una mejor regulación en el transporte y liberación en sitios específicos.

Las técnicas más comunes para el diseño de estos *carriers*, están basadas en la incorporación de las MNPs dentro del lumen (interior acuoso) de las vesículas o dentro de la bicapa lipídica (espacio hidrofóbico). Sin embargo, aplicaciones relacionadas con separación magnética mediada por campos alternos han investigado también el uso de las MNPs para crear agregados o complejos de manera controlada en la superficie de las vesículas.<sup>28</sup> Las estrategias de diseño del material dependerán de la aplicación final que se desee conferirles, pero lógicamente estarán también supeditadas a la estructura y propiedades de superficie de las NPs. La **Figura IV.1.2** detalla algunas de las localizaciones posibles de las nanopartículas en su interacción con las vesículas lipídicas.



**Figura IV.1.2.** Representación esquemática de las posibles localizaciones de nanopartículas en el diseño de compósitos NP-Liposoma. **A)** Incorporación en lumen o interior acuoso. **B)** Internalización en bicapa lipídica. **C)** Decoración superficial. **D)** Modos posibles de interacción superficial con la bicapa lipídica. Formación controlada de agregados o complejos vesiculares. Adaptado de Preiss, M. R.; Bothun, G. D. Stimuli-Responsive Liposome-Nanoparticle Assemblies. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2011**, 8 (8), 1025–1040.

Aplicaciones en resonancia magnética de imagen (MRI) hacen un mayor uso de la internalización de las MNPs en el entorno acuoso<sup>29,30</sup> mientras que estudios para la liberación controlada de principios activos, han planteado un mayor enfoque en la inclusión de MNPs dentro

de la bicapa lipídica con el fin de adquirir control sobre las propiedades estructurales de la membrana (fase, permeabilidad, etc).<sup>31,32</sup> Pese a que se han reportado interesantes estudios para terapias de *Drug Delivery* y MRI que hacen uso de MNPs internalizadas en vesículas lipídicas y su control por estímulos externos,<sup>33,34</sup> no existen al día de hoy plataformas de magnetoliposomas o nanopartículas magnéticas, reportados como potenciales actores en la promoción y el control de fenómenos de fusión de membranas. La investigación en este campo resulta entonces, en tierra fértil para el diseño de nuevas aplicaciones en fusión, que permitan no solo el diseño de nuevos dispositivos de interés en terapias biomédicas (ej.: terapia génica) sino en la catálisis controlada y confinada de un sinnúmero de reacciones químicas.

#### IV.1.3- Técnicas para el estudio de fusión en membranas

Además de las técnicas de imagen, como SEM, TEM, cryo-TEM, microscopía confocal y microscopía de fluorescencia con las cuales es posible realizar un monitoreo directo de la fusión en vesículas grandes o células, existen ensayos de fluorescencia (FL) que permiten monitorear la fusión de las vesículas con diámetros tan pequeños como ~20 nm.

Los ensayos de FL son utilizados tanto para monitorear la etapa inicial de fusión, esto es, el mezclado de los lípidos de las bicapas, como la etapa final del proceso, es decir, el mezclado de los contenidos internos de las vesículas. La pérdida o fuga de contenido interno de las vesículas a través de la membrana (*leakage*), es un proceso que ocurre de manera espontánea y continua durante ambas etapas del proceso de fusión.<sup>35</sup> Por ello, la medición de las proporciones en las que se producen estas pérdidas, son necesarias para obtener ideas cuantitativas sobre la efectividad del mezclado de contenidos internos y el mezclado de lípidos (unión de membranas). Los ensayos de FL más utilizados pueden subdividirse en: ensayos que estudian el mezclado de lípidos, y ensayos de mezclado de contenidos internos.<sup>3,36</sup>

El mezclado de los lípidos de las bicapas es el paso preliminar de la fusión, donde luego del contacto inicial, las moléculas lipídicas de ambas capas de las membranas, se mezclan. Esto da lugar a la formación del intermediario de hemifusión que luego inicia la formación del poro y su apertura, conduciendo (idealmente) a la fusión completa. Uno de los ensayos más comunes que se utilizan para estudiar el mezclado de lípidos asociado a la fusión, se basa en la transferencia de

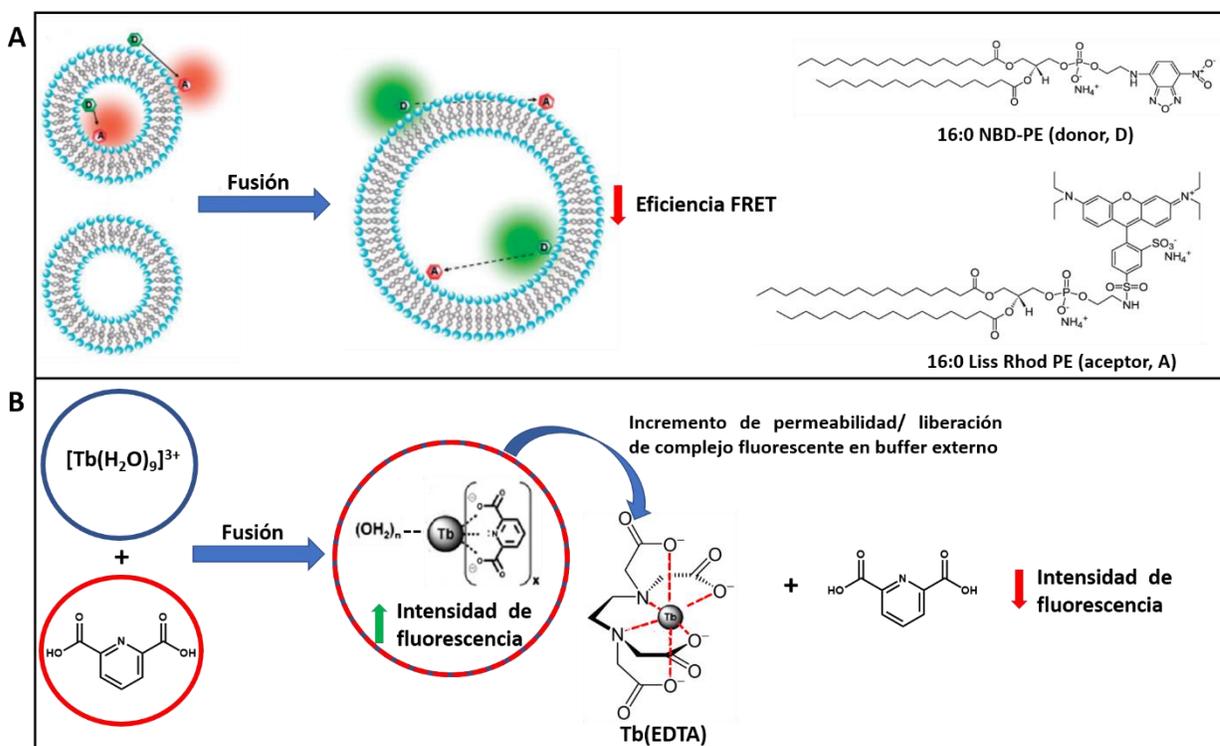
energía por resonancia de fluorescencia (FRET).<sup>37</sup> En estos experimentos, un set de vesículas es marcado con un fluoróforo donador (ej.: 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-*N*-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il), denotada también como 16:0 NBD-PE) y un fluoróforo aceptor (ej.: 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-*N*-(lisamina Rodamina B sulfonilo, o 16:1 Liss Rhod PE) a una concentración tal que quedan a una distancia donde tiene lugar una FRET eficiente. Esta población de vesículas es luego mezclada con otra población de vesículas sin marcar (sin sondas fluorescentes). Luego de la fusión de ambos sets de vesículas, la distancia mínima entre los pares donor/aceptor se incrementa, resultando en una disminución de la transferencia de energía (disminución de eficiencia FRET) y un incremento en la fluorescencia del donador. Los incrementos en la fluorescencia del donador o la disminución de la fluorescencia del aceptor, son monitoreados para calcular el porcentaje de mezclado lipídico en función del tiempo (**Figura IV.1.3 A**).<sup>37</sup>

Muchos informes señalan que la fusión de liposomas puede detenerse en el estado de hemifusión, es decir, donde solo los lípidos de la capa más externa resultan mezclados. Si bien existen metodologías para corregir los experimentos de FRET con el objetivo de corregir las señales de fusión falsa (Ej.: eliminación de sondas en capas externas con ditionito de sodio), los ensayos de mezclado de contenido interno permiten una determinación más precisa de la fusión efectiva. Para estas determinaciones, el ensayo utilizado más frecuentemente se basa en la formación del complejo fluorescente Tb<sup>3+</sup>/ácido dipicolínico (DPA).<sup>35,37</sup> En este ensayo, poblaciones separadas de vesículas son cargadas con TbCl<sub>3</sub> o DPA. Luego de la fusión de las vesículas, el complejo Tb<sup>3+</sup>/DPA es formado, y su intensidad de fluorescencia es ~10000 veces mayor que la del Tb<sup>3+</sup>. El incremento en la señal fluorescente es entonces utilizado para calcular los porcentajes de mezclado de contenido en función del tiempo. Para evadir fluorescencia proveniente del complejo ubicado fuera de las vesículas (debido a *leakage* o sonda no encapsulada desde el inicio), un ligando fuertemente quelante como EDTA, es añadido al buffer externo usualmente durante el proceso de purificación de las vesículas preparadas. EDTA impide la formación del complejo Tb<sup>3+</sup>/DPA, formando el complejo no fluorescente Tb<sup>3+</sup>/EDTA (**Figura IV.1.3 B**).

Tal como se especificó anteriormente, el proceso de fusión de bicapas, puede traer aparejado un porcentaje de pérdida de contenido interno inherente al mecanismo de reorganización lipídica. Es posible además que los agentes fusogénicos introducidos al medio externo, o los estímulos a los que sean sometidas las vesículas, tengan consecuencias en la estructura y propiedades de las membranas lipídicas, afectando sus estados de fase o permeabilidad. Por ello, asociado a los

estudios de fusión, es conveniente llevar a cabo controles de los cambios en la permeabilidad de las vesículas, los cuales se realizan generalmente midiendo la liberación de una molécula fluorescente desde el interior al exterior de los liposomas (Ej.: ensayo de carboxifluoresceína, calceína).<sup>35</sup> La maleabilidad que presenta el ensayo de formación de complejo Tb/DPA, le permite a este sistema ser también utilizado en la determinación de la liberación del contenido interno desde las vesículas lipídicas. En este caso, el complejo Tb/DPA es co-encapsulado en vesículas lipídicas en el mismo buffer con presencia de EDTA que el empleado en la preparación de vesículas con Tb y DPA de manera separada. Esto significa, que inicialmente una intensidad de fluorescencia neta (mayor a cero), es observada. Ante el aumento en la permeabilidad de las membranas, el complejo Tb/DPA es liberado y un decaimiento en la intensidad de fluorescencia, es observado como consecuencia del *quenching* del Tb<sup>3+</sup> por el EDTA en el medio externo.<sup>38</sup>

Por último, y si bien constituyen ensayos un carácter más cualitativo, es válido mencionar la existencia de una serie de pruebas anexas como lo son los ensayos de incremento de tamaño. Dado que los eventos de fusión de liposomas resultan en el mezclado de membranas lipídicas y contenidos internos, las estructuras vesiculares también experimentarán un incremento en los radios hidrodinámicos promedio. Estos cambios pueden medirse por medio de técnicas como dispersión dinámica de luz (DLS) o turbidimetría (densidad óptica). Sin embargo, estas técnicas no permiten distinguir entre fusión o simple agregación, de manera que representan metodologías que pueden ser utilizadas para acompañar información obtenida por medio de técnicas de fluorescencia, como las mencionadas anteriormente. Otra limitación que presentan estas técnicas es que sólo es posible obtener medidas precisas para partículas con tamaños no superiores a ~1 µm. TEM y cryo-TEM, pueden ser utilizadas también para observar cambios en los tamaños de los liposomas y las morfologías intermedias durante los eventos de fusión.<sup>39</sup>



**Figura IV.1.3.** Representación esquemática de ensayos para la detección de procesos de fusión. **A-** ensayo de FRET para la medición del mezclado total de las bicapas lipídicas. La separación espacial promedio de las sondas fluorescentes donora (D, 16:0 NBD-PE) y aceptora (A, 16:0 Liss Rhod PE), incrementa luego de la fusión de las membranas marcadas con las membranas no marcadas. Esto resulta en una disminución de la eficiencia FRET, dependiente de la proximidad de ambas sondas. **B-** ensayo de mezclado de contenidos internos por formación del complejo fluorescente Tb/DPA. Luego de la fusión de las bicapas, la intensidad de fluorescencia ( $I_f$ ) aumenta por el acomplejamiento de los iones  $Tb^{3+}$  con las moléculas de DPA en diferentes grados de coordinación ( $x= 1-3$ ). La liberación del complejo desde el interior de las vesículas hacia el buffer externo con presencia de EDTA, da lugar a la formación del complejo entre el Tb y el ligando hexadentado y, en consecuencia, el decaimiento de la  $I_f$ .

#### IV.1.4- Fusión inducida por diferentes agentes fusogénicos

La fusión de membranas requiere en la mayoría de los casos, la participación directa o indirecta de diferentes agentes externos o fusógenos para ser llevada a cabo. Existen diferentes formas en las que un fusógeno puede inducir fusión y, como fue descrito en la sección **VI.1.1**, un balance estructura-energía es requerido para cada intermediario presente en el proceso. La falta de disponibilidad de estas moléculas catalizadoras del proceso, puede conducir fácilmente a una detención o a una reversión de la fusión. El empleo de proteínas o péptidos en la promoción de estos eventos, ha sido ampliamente estudiado debido a su reconocida implicancia en los fenómenos biológicos vitales (Ej.: SNAREs).<sup>40,41</sup> El potencial de estas biomoléculas para permitir sobrepasar las barreras energéticas de las etapas intermediarias de fusión por mecanismos de reorganización estructural como fuerza conductora, ha sentado las bases para el desarrollo de numerosos modelos de fusión artificial de membranas.<sup>42,43</sup> Algunos diseños supramoleculares, han involucrado el acoplamiento de péptidos con estructuras complementarias a vesículas lipídicas.<sup>44,45</sup> Los péptidos funcionalizados con dominios hidrofóbicos pueden ser fácilmente anclados a bicapas de liposomas de diferente composición, y las secuencias peptídicas son responsables de guiar el reconocimiento y cambios estructurales necesarios para la fusión, de manera análoga a las arquitecturas de autoensamblaje encontradas en la naturaleza.<sup>44</sup>

Aparte de péptidos y proteínas, una buena diversidad de moléculas pequeñas y iones han sido descritas como agentes fusogénicos. Dentro de ellas, los cationes metálicos, en particular  $\text{Ca}^{2+}$  fue uno de los primeros en ser identificado como potencial promotor de los procesos de fusión.<sup>35,46</sup> Este catión es capaz de inducir fusión de vesículas aniónicas de fosfatidilserina (PS) o vesículas compuestas por una mezcla de fosfatidilserina: fosfatidilcolina (PS: PC). La fuerza motora tiene su origen en la interacción entre cargas opuestas. Las cargas negativas de las vesículas previenen la aproximación de vesículas de PS puras. Cuando las cargas positivas de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  ubicadas en la superficie de las vesículas y la fuerza iónica del buffer intermedio, se encuentran dentro de determinadas concentraciones umbrales, se promueve la agregación de vesículas. Muchos estudios han determinado que la aproximación cercana de las membranas opuestas en estos casos, depende directamente de la desestabilización de las membranas, que es directamente proporcional al número de iones  $\text{Ca}^{2+}$  unidos a la superficie de la membrana. La presencia de iones  $\text{Na}^+$  en el buffer, compite con el  $\text{Ca}^{2+}$  por los sitios de unión a la membrana, por lo que a mayores

concentraciones del primer ión, menor es la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  disponible por molécula de PS y la fusión queda, por ende, inhibida. A través de estudios teóricos y ensayos de mezclado de contenido (formación de complejo Tb/DPA) se determinaron concentraciones umbrales de  $\text{Ca}^{2+}$  de  $\sim 1$  mM para la fusión de vesículas de PS pura en presencia de iones  $\text{Na}^+$  en concentración 100 mM. En el caso de vesículas mezcla PS: PC, dado que PC es de naturaleza zwitteriónica la densidad de carga superficial de las vesículas es menor que en el primer caso, por lo que la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  que puede asociarse a las vesículas a través de las moléculas de PS, se ve drásticamente disminuida. Así, para una relación molar PS/PC 4:1, una concentración mínima de  $\text{Ca}^{2+}$  de  $\sim 2$  mM será necesaria para gatillar el proceso de agregación, requiriéndose concentraciones aún mayores conforme la composición de las vesículas en PC con respecto a PS, se incrementa.<sup>46</sup> El contacto cercano de las vesículas opuestas inducido por  $\text{Ca}^{2+}$  transcurre a través de la formación de un complejo anhidro interbicapa (complejo trans), concomitante con la transición de fase  $L \rightarrow H_{II}$ , para dar lugar posteriormente a la fusión inmediata de las dos membranas y el mezclado de los volúmenes internos.<sup>35</sup> La formación de este complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -fosfolípido, ha sido estudiada por muchos autores para sistemas conformados por vesículas de PS en presencia de este catión. Estos estudios demostraron que la estructuración del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -PS, que ahora presenta un nuevo parámetro crítico, transcurre con una reorganización de las cadenas acilo del fosfolípido que genera una desestabilización transitoria de membranas posicionadas a una distancia muy próxima. Se ha informado que hay un cambio de fase hacia una estructura hexagonal que es más ordenada que la estructura hexagonal clásica.

En las células, se ha determinado que los gradientes de iones  $\text{Ca}^{2+}$  intervienen activamente en la regulación de procesos de fusión, este es el caso de membranas celulares de eritrocitos. En todos los casos donde el  $\text{Ca}^{2+}$  induce fusión de vesículas conteniendo composiciones lipídicas complejas, otros fusógenos adicionales son requeridos para catalizar la fusión efectiva. Estos coadyuvantes adicionales pueden ser fusógenos hidrofóbicos como ácidos grasos (oleoilglicerol, dioleoilglicerol, etc.) o hidrofílicos como polietilenglicol (PEG), dimetilsulfóxido (DMSO), etc., los cuales tienen como función principal, incrementar la permeabilidad de las membranas.<sup>47</sup> El incremento en la permeabilidad de las membranas, facilita la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula, y esta partición incrementada de  $\text{Ca}^{2+}$  mejora el proceso de fusión.<sup>48</sup>

Una gran cantidad de lípidos de distinto grado de saturación y largo de cadena han sido ampliamente estudiados como agentes fusogénicos frente a membranas de eritrocitos

humanos.<sup>49,50</sup> Características estructurales como la presencia de una única insaturación o una cadena hidrofóbica de bajo punto de fusión son considerados requisitos necesarios para que el lípido posea habilidad fusogénica.<sup>49</sup> Este es el caso de lípidos como el ácido oleico, del cual se ha estudiado ampliamente su capacidad para promover cambios conformacionales desde fases lamelares a hexagonal ( $H_{II}$ ), en las membranas de eritrocitos.<sup>50,51</sup>

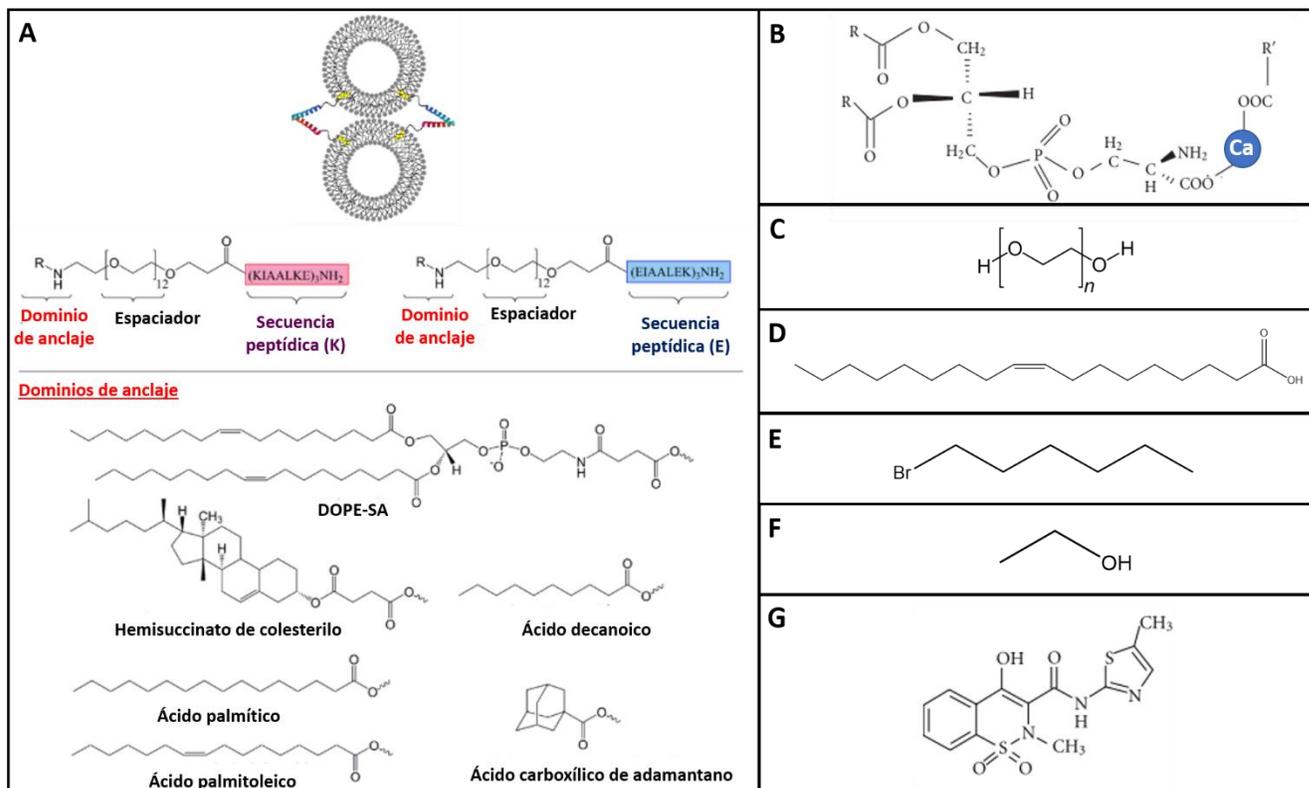
En relación a su mecanismo de acción, estudios en monocapas de Langmuir han permitido identificar diferencias relevantes en cuanto al comportamiento termodinámico de ácidos grasos fusogénicos y no fusogénicos con fosfolípidos en films monomoleculares. De manera general, ácidos grasos capaces de inducir fusión, exhiben desviaciones de la idealidad cuando son mezclados con fosfolípidos conteniendo grupos polares colina mientras que estas desviaciones no son observadas para ácidos grasos no-fusógenos.<sup>47</sup> Una observación interesante que surge de estos experimentos, es que factores como la distribución asimétrica y el grado de empaquetamiento de los lípidos de bicapa son cruciales en la promoción del proceso de fusión, y la efectividad del mismo no recae unilateralmente en las propiedades y características estructurales de los fusógenos. La capa externa de la bicapa de las membranas celulares, puede entonces ser preferentemente expandida por lípidos fusogénicos, y su arreglo molecular modificado en favor de una organización más fluida.<sup>6</sup> Estos cambios son los que pueden dar lugar a alteraciones en la permeabilidad y la estructura de las membranas, conllevando al proceso de fusión subsiguiente. Mecanismos de alteración en la fluidez de las membranas han sido también descritos como prerrequisito para la fusión inducida por moléculas orgánicas como bromuros de *n*-alquilo, con cadenas de 6 a 10 átomos de carbono.<sup>52</sup>

En resumen, el mecanismo de acción de fusógenos de cadena hidrocarbonada larga, insaturados o con presencia de grupos cargados, recae fundamentalmente en la interdigitación o localización de estas moléculas en la superficie de las bicapas opuestas, durante la etapa inicial de anclaje vesicular. El posterior incremento de la hidrofobicidad intermembrana o disminución de la densidad superficial de cargas culmina luego con la transición de fases  $L \rightarrow H_{II}$  característico del proceso de fusión convencional. Adicionalmente, se ha demostrado que alcoholes de cadena corta como etanol, también son capaces de promover fenómenos de fusión por diferentes vías. En estos casos, la completitud del proceso de fusión no viene dado por la formación de la fase  $H_{II}$ , sino por la desestabilización de la monocapa externa que estos alcoholes pueden producir. Las moléculas en cuestión disrumpen la capa externa de manera local por fenómenos de interdigitación, formando

el intermediario de hemifusión. Durante la formación del intermediario, se crean vacíos hidrofóbicos en el espacio interbicapa, lo cual afecta el empaquetamiento de las cadenas lipídicas. Este estado de interdigitación, deja expuestos los dominios hidrofóbicos acilo terminales, incrementando la interacción hidrofóbica entre las bicapas opuestas. La alta inestabilidad de los agregados lipídicos da lugar al mezclado de lípidos y, finalmente, al mezclado de contenidos internos.<sup>39</sup>

Por último, se ha encontrado que determinadas familias de fármacos pequeños también son capaces de inducir fusión. Este es el caso de la serie de la familia de antiinflamatorios no esteroideos del grupo oxicam (NSAIDs). Originalmente desarrolladas como supresoras de dolor o “*painkillers*”, tres de estos fármacos, meloxicam, piroxicam, y tenoxicam, han demostrado poseer una alta habilidad fusogénica en bajas concentraciones (50  $\mu\text{M}$ ), por medio de mecanismos de inducción de defectos de membrana. La interacción hidrofóbica, guía la localización de los principios activos en las bicapas. Así, las drogas más hidrofóbicas logran una mayor penetración dando lugar a una mayor permeabilización de las vesículas, lo que se traduce en una mayor efectividad del proceso de fusión.<sup>38</sup> Algunas de las estructuras de actividad fusogénica informada, se detallan en la **Figura IV.1.4**.

En resumen, un gran potencial reside en la aplicación de diferentes moléculas como inductores de fusión de membranas. El entendimiento de los detalles mecánicos de gran variedad de fusógenos como los aquí ejemplificados, contribuye al uso racional de estas estructuras para la fusión de membranas de manera controlada y su implementación en la fabricación de nuevas estructuras y procesos bioquímicos y biotecnológicos.



**Figura IV.1.4.** Estructura de agentes fusogénicos conocidos. **A-** anclaje de péptidos con estructuras complementarias (en este caso, K y E) a las vesículas lipídicas, por medio de diferentes moléculas con grupos carboxilato y dominios hidrofóbicos grandes. Muchas de estas moléculas anfifílicas utilizadas para el anclaje, también poseen carácter fusogénico por sí solas (ej.: ácido palmítoleico) o participan activamente en procesos de fusión espontánea cuando se encuentran formando parte de la composición de las vesículas lipídicas (DOPE-SA). **B-** unión de Ca<sup>2+</sup> con los grupos polares de fosfatidilserinas opuestas para promover el proceso de fusión. **C-** polietilenglicol (PEG). **D-** ácido oleico (OA). **E-** 1-bromohexano. **F-** etanol. **G-** fármaco antiinflamatorio meloxicam.

## IV.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

El desarrollo de nanopartículas con aplicaciones en el campo de fusión de membranas, representa un paradigma emergente en las biociencias, donde no existen al día de hoy, plataformas de esta naturaleza que permitan la inducción y el control de estos procesos. En función de los

antecedentes existentes y la gran variedad de áreas que podrían aprovechar el potencial de estos materiales, se planteó en el marco de esta tesis, la implementación de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con ácido oleico (MNP-OA) para la promoción de fenómenos de fusión de membranas y su regulación. Con este objetivo, y como fue introducido en el **Capítulo II**, se sintetizaron nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), cuya estructura y propiedades fueron confirmadas a través de diferentes técnicas de caracterización. Las características superparamagnéticas que presentan estas NPs, junto con la biocompatibilidad inherente al material de magnetita que ha sido corroborada por estudios recientes, convierten a las MNPs-OA en un nanomaterial ideal para el desarrollo de aplicaciones de fusión *in vitro* e *in vivo* controladas por medio de estímulos externos. Además, el ácido oleico empleado como ligando de funcionalización de estas nanopartículas, es también una biomolécula con propiedades fusogénicas estudiadas, por lo que este lípido no cumple una única función de estabilización sino también un rol como principal agente intermediario del proceso de fusión de membranas. En este trabajo de tesis se propuso evaluar la capacidad de las MNP-OA para inducir la fusión de bicapas a través de diversas metodologías, empleando vesículas unilamelares como sistema modelo.

A fin de conocer si las MNP-OA conducen a una fusión completa, se procedió a evaluar el mezclado de los contenidos internos mediante el ensayo de formación del complejo fluorescente  $\text{Tb}^{3+}/\text{DPA}$ , en el transcurso del tiempo. Se realizaron de este modo, mediciones cuantitativas acerca de los porcentajes en los cuales se produce el mezclado de contenidos internos debido a la fusión completa de las vesículas. Para corroborar la existencia o magnitud de los cambios en la permeabilidad de las bicapas, se llevaron a cabo ensayos empleando el fluoróforo carboxifluoresceína (CF) y mediciones sucesivas de la emisión fluorescente del complejo  $\text{Tb}^{3+}/\text{DPA}$  co-encapsulado en liposomas.

Con el objetivo de obtener información acerca de la cinética de agregación y fusión de vesículas mediada por las MNP-OA, se emplearon técnicas de turbidimetría y DLS. Adicionalmente, se realizaron estudios sobre los cambios morfológicos inducidos en las membranas y la distribución o partición de las nanopartículas en las mismas, a través de microscopía de transmisión electrónica (TEM) y microscopía de fluorescencia confocal.

Por último, se llevaron a cabo estudios con el objetivo de regular o modificar la velocidad o extensión con la que ocurre el proceso de fusión por medio de la aplicación de campos magnéticos de potencial variable. Para ello, un electroimán conectado a una fuente de potencial variable, fue

incorporado al *set-up* de medición de fluorescencia por formación del complejo  $Tb^{3+}/DPA$ . El diseño experimental permitió implementar el ensayo de mezclado de contenidos internos para estudiar el efecto de los campos variables en la fusión inducida por las MNP-OA, y caracterizar la respuesta del sistema ante la aplicación del estímulo magnético en cuestión.

### IV.3- MATERIALES Y MÉTODOS

#### IV.3.1- Cuantificación de iones $Fe^{3+}$

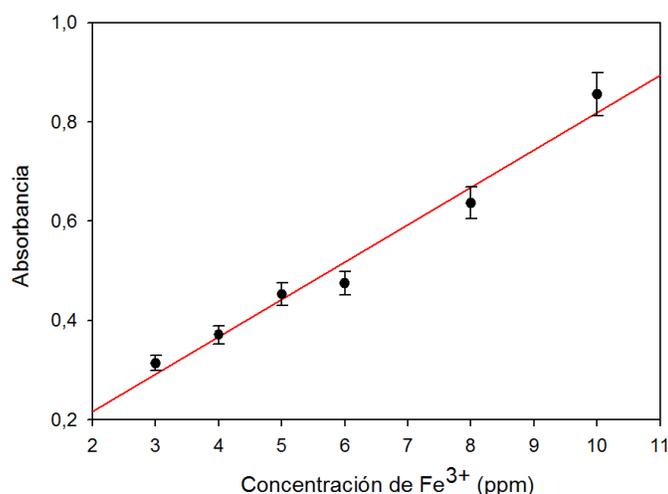
En el **capítulo II**, se presentó cómo fue determinada la estructura y masa molar (751 KDa) de las MNP-OA. Para utilizar estas MNP-OA como fusógeno es necesario conocer la cantidad utilizada de manera precisa. Por ello, y a los fines de contar con un método de cuantificación adicional a la masa pesada de MNP-OA, se procedió a cuantificar hierro. La cuantificación se realizó a través de la medición de Fe total ( $Fe^{3+}$ ) empleando espectrofotometría de absorción y siguiendo la metodología informada por Frascione et, al.<sup>53</sup>

Brevemente, se preparó una solución stock **A** de  $Fe^{3+}$  0,5 mg/mL empleando  $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$  disuelto en HCl 37% (0,225 mL) y una solución de buffer HEPES 20 mM/ NaCl 150 mM en proporción 1:1 en volúmenes (pH 7,4). Seguidamente a partir de esta solución stock **A** se prepararon diluciones con concentraciones de  $Fe^{3+}$  de entre 3 y 10 ppm agregando el volumen correspondiente de la solución **A** a 250  $\mu$ L de una solución acuosa de KSCN 40 mM y compensando el volumen final con agua MilliQ.

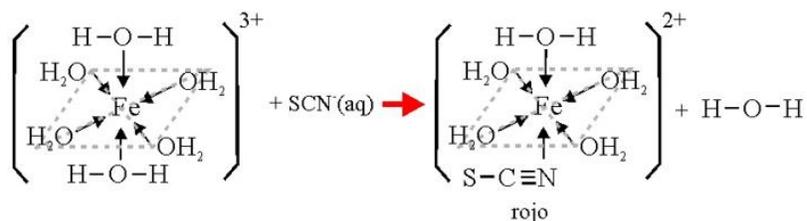
La curva de calibración (**Figura IV.3.5**) fue obtenida por medición de la absorbancia de cada solución a 460 nm (espectrofotómetro HP Multispect 1501), la cual corresponde a la  $\lambda_{m\acute{a}x, abs}$  del complejo de coloración rojiza (**Esquema IV.3.1**) que se forma como resultado de la reacción entre los aniones  $SCN^-$  y cationes  $Fe^{3+}$  (pentaagua(tiocianato-N) Fe (III),  $[Fe(SCN)(H_2O)_5]^{2+}$ ).

Para cuantificar el contenido de hierro total en una dada masa de MNP-OA, se procedió a agregar HCl 37% a fines de oxidar el  $Fe^{2+}$  presente en la  $Fe_3O_4$  a  $Fe^{3+}$ . Las muestras fueron tratadas de igual manera que la solución standard agregando buffer HEPES e igual volumen de la solución de KSCN 40 mM. Esta metodología permitió corroborar que la masa pesada de MNP-OA para la preparación de dispersiones stock es confiable, encontrándose una buena coincidencia dentro del

error experimental (~0,3 mg/mL). La desviación estándar de las dispersiones de MNP-OA empleadas en todos los ensayos de fusión (sección IV.3.4.1) se informa en función de las cuantificaciones colorimétricas realizadas.



**Figura IV.3.5.** Curva de calibración para la cuantificación de Fe<sup>3+</sup> empleando el método de formación del complejo coloreado con KSCN.



**Esquema IV.3.1.** Reacción de formación de complejo de coordinación entre aniones SCN<sup>-</sup> y cationes Fe<sup>3+</sup>.

### IV.3.2- Preparación de LUVs (*Large Unilamellar Vesicles*)

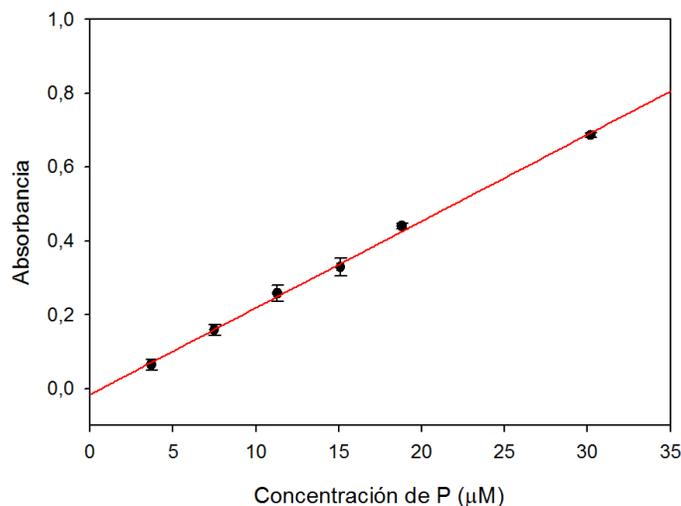
Las vesículas unilamelares largas empleadas como modelo de membrana para los ensayos de fusión fueron preparadas por el método de extrusión.<sup>54</sup> Primeramente, se generó un film lipídico uniforme en las paredes de un vial de vidrio, por evaporación de un volumen de solución clorofórmica de 1-palmitoil-2-oleoil-glicero-3-fosfolina (POPC) bajo corriente de N<sub>2</sub>. Las trazas

finales del solvente fueron removidas del film, por incubación en cámara de alto vacío durante 2 h. Posteriormente, se hidrató la película de lípidos anteriormente generada haciendo uso de una solución buffer conteniendo ácido 2- [[1,3-dihidroxi-2- (hidroximetil) propan-2-il]amino] etanosulfónico (TES) 2 mM y citrato de sodio ( $\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$ ) 100 mM (pH~7,5), aplicando agitación vórtex para dispersar todo el contenido; la solución fue luego trasvasada cualitativamente a un vial criogénico y sometida a cinco ciclos de frío-calor ( $-195^\circ\text{C}$  y  $60^\circ\text{C}$ , respectivamente), formando así vesículas multilamelares grandes o MLVs. LUVs con un diámetro promedio de  $(108,7 \pm 0,3)$  nm fueron obtenidos por extrusión (20 veces) de las MLVs compuestas por POPC a través de filtros de policarbonato con tamaños de poro de 100 nm, a temperatura ambiente empleando un extrusor (Mini-Extruder, Avanti Polar Lipids, Inc.).

Leves cambios a este protocolo general fueron aplicados para los liposomas empleados en ensayos de fluorescencia (FL). La concentración de lípidos en los experimentos con y sin carga de moléculas prueba o sondas tales como  $\text{Tb}^{3+}$ , DPA y carboxifluoresceína (CF), se mantuvo en  $\sim 44$   $\mu\text{M}$  para todos los experimentos; y dicha concentración fue conocida aplicando el método de Bartlett para la cuantificación de fósforo.<sup>55</sup>

### IV.3.3- Cuantificación de fosfato

Acorde al protocolo establecido por Bartlett et. al.<sup>55</sup> una muestra conteniendo 0,4 mL de LUVs, fue digerida con 0,4 mL de ácido perclórico e incubada a  $180^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. Luego de alcanzar temperatura ambiente, se agregaron 4 mL de reactivo de molibdato (que consiste en una solución de molibdato de amonio  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  en concentración 1,8 mM disuelto en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,3 M) y 0,5 mL de solución de ácido ascórbico al 10%. La solución final fue agitada vigorosamente y llevada a incubación en baño de agua a  $100^\circ\text{C}$  durante 10 minutos. Luego de enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente, se registró la absorbancia a 820 nm en un espectrofotómetro Shimadzu 1800. La curva de calibración correspondiente se obtuvo llevando a cabo el mismo tratamiento empleando soluciones estándar de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en diferentes concentraciones (**Figura IV.3.6**). Como se especificó en la sección **IV.3.2**, la concentración promedio de lípido en las dispersiones de LUVs utilizadas, se determinó en  $(44,0 \pm 0,7)$   $\mu\text{M}$  teniendo en cuenta las absorbancias medidas y las diluciones realizadas durante el tratamiento de cada muestra.



**Figura IV.3.6.** Curva de calibración para la cuantificación de fósforo por el método de Bartlett,  $R^2 = 0,998$ .

#### IV.3.4- Detección de fusión en LUVs inducida por MNP-OA

##### IV.3.4.1- Condiciones experimentales generales

Para evaluar si las MNP-OA pueden actuar como agentes fusogénicos e inducir la fusión de liposomas, se trabajó de la siguiente manera general. A un dado volumen de dispersión conteniendo LUVs (ej. 250 µL) se le añadió un volumen de una dispersión de MNP-OA en THF (ej. 5 µL) de concentración conocida. La ocurrencia de fusión en las LUVs inducida por las MNP-OA se estudió en función del tiempo y se monitoreó a través de diversas metodologías experimentales, las cuales permitieron obtener diferente tipo de información acerca del proceso de fusión. Las metodologías empleadas fueron: 1) ensayo de mezclado de contenidos internos de dos poblaciones de liposomas a través del empleo del complejo  $Tb^{3+}/DPA$ , 2) DLS, 3) turbidimetría.

También se evaluó el efecto de las MNP-OA sobre la permeabilidad de las LUVs a través de la medición de la liberación de CF en el tiempo o monitoreando la fluorescencia emitida por el complejo  $Tb/DPA$ .

Todos los experimentos se realizaron manteniendo constante la cantidad de liposomas (concentración lipídica total) y se evaluó el efecto de agregar diferentes cantidades de MNP-OA.

A los fines de facilitar la interpretación de los datos, se informa la fracción molar de MNP-OA empleada respecto a aquella de los lípidos que constituyen a las vesículas modelo, en este caso POPC.

Como se mencionó anteriormente, los ensayos que requirieron incorporar una molécula de prueba o sonda debieron ser sometidos a un proceso de purificación empleando una columna de Sephadex G-25, lo que conduce a una dilución de las LUVs. Con el objetivo de utilizar iguales concentraciones finales de LUVs en todos los ensayos (excepto que se especifique otra condición), se realizó la misma dilución que aquella producida por la elución en la columna a las dispersiones de liposomas que no requerían estrictamente ser purificados (ej. DLS, potencial Z).

En general, se utilizó una dispersión de MNPs-OA en concentración ( $2,0 \pm 0,3$ ) mg/mL ( $3 \mu\text{M}$ ) en tetrahidrofurano (THF), o diluciones de la misma para experimentos que precisaron de menores concentraciones de nanopartículas. Entre los diferentes solventes orgánicos ensayados, THF demostró el mejor desempeño para mantener dispersiones estables de nanopartículas hidrofóbicas y para el mezclado homogéneo de pequeños volúmenes de sus dispersiones con el buffer conteniendo las vesículas lipídicas. Controles realizados con THF puro hasta  $10 \mu\text{L}$  de volumen añadido (máximo volumen evaluado), mostraron que el solvente orgánico carece de actividad hacia la promoción de la fusión de membranas, disrupción o cambios en la permeabilidad de la bicapa. Otro control realizado incluyó el agregado de una solución de ácido oleico en THF, en la concentración que aporta una dispersión de  $2 \text{ mg/mL}$  de MNP-OA ( $0,3 \text{ mg/mL}$  de ácido oleico). La adición de hasta  $10 \mu\text{L}$  de esta solución (máximo volumen evaluado) a los  $250 \mu\text{L}$  de dispersión de LUVs, no mostró actividad fusogénica alguna. Estos controles fueron realizados con las diferentes técnicas empleadas en los ensayos de fusión (DLS y ensayo de mezclado de contenidos Tb/DPA) con el objetivo de descartar efectos ocasionados por el solvente y el ácido oleico.

#### **IV.3.4.2- Dispersión dinámica de luz (DLS)**

El efecto sobre la distribución de tamaño en las LUVs de POPC luego de la adición de las MNP-OA se evaluó en función del tiempo mediante dispersión dinámica de luz (DLS; Submicron

Particle Sizer, Nicomp™ 380, Santa Bárbara, California, EE. UU.). Los resultados se muestran con la ponderación de porcentaje en volumen dado por el equipo.

Adicionalmente se realizaron mediciones de potencial zeta ( $\zeta$ , mV) de las LUVs incubadas con concentraciones crecientes de MNP-OA, a diferentes tiempos. Las mediciones fueron obtenidas por duplicado para las muestras ensayadas, realizando un total de 10 escaneos para cada una de ellas. Para ello, se utilizó un equipo Horiba SZ-100 nanopartica operando con el software Next Spec versión 1.90.

#### **IV.3.4.3- Ensayos cinéticos de turbidimetría**

Los experimentos de turbidimetría se realizaron con un espectrofotómetro HP Multispect 1501 agregando volúmenes fijos de dispersiones de MNP-OA en concentraciones que variaron entre 0,5 y 2 mg/mL, a una cubeta de cuarzo conteniendo un volumen fijo de vesículas. Se obtuvieron los parámetros de velocidad inicial ( $v_0$ ) y variación en la densidad óptica ( $\Delta OD$ ) a 400 nm de las muestras mencionadas anteriormente.  $\Delta OD$  se obtuvo por sustracción de la densidad óptica inicial dada por las LUVs de POPC a la densidad óptica final alcanzada luego de la adición de las MNPs-OA, una vez que el sistema alcanzó una OD constante (*plateau*). La velocidad inicial del proceso de fusión se calculó teniendo en cuenta la pendiente de la región lineal del gráfico de OD en función del tiempo. Se utilizó el parámetro de velocidad inicial del proceso de fusión, con el fin de evitar complicaciones asociadas con la respuesta no-lineal que deriva de la formación de agregados de tamaños grandes. Los experimentos se realizaron por duplicado o triplicado.

#### **IV.3.4.4 Parámetros empleados en las mediciones de fluorescencia (FL)**

Todas las mediciones de fluorescencia fueron realizadas en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55, de arreglo óptico con formato en L. El voltaje de la lámpara se fijó en 650 V, y tanto la rendija (*slit*) de excitación como la de emisión se fijaron en 3 nm. Cada experimento se repitió al menos tres veces. También se realizaron controles mediante el empleo de una solución de Rodamina B base previo a cada ensayo con el objetivo de normalizar las cuentas ( $I_f$ ) obtenidas ante posibles variaciones en la potencia de la lámpara.

#### IV.3.4.5- Ensayos de mezclado de contenidos

El ensayo de mezclado de contenidos Tb/DPA se realizó según lo descrito por Wilschut et. al.<sup>35</sup> Aquí, dos films lipídicos (generados como fue descrito en la sección **IV.3.2**), se rehidrataron con buffer TES 2 mM, citrato de sodio 100 mM (pH 7,5), conteniendo las contrapartes correspondientes del complejo fluorescente: **A)** TbCl<sub>3</sub> 7,5 mM (99,99 % Sigma-Aldrich) o **B)** DPA (ácido piridina-2,6-dicarboxílico 99%, Sigma-Aldrich) 75 mM según corresponda. Luego de la extrusión, las especies no encapsuladas en las vesículas fueron removidas del buffer externo empleando columnas de Sephadex G-25 (GE- Healthcare), y una solución de TES 2 mM, citrato de sodio 75 mM, y NaCl 112,5 mM (pH 7,5) como buffer de elusión en equilibrio osmótico con el interior de las vesículas. Con el objetivo de prevenir la unión de Tb<sup>3+</sup> a moléculas de DPA libres en el exterior de las vesículas (falso incremento en la intensidad de FL), se incluyó EDTA (agente quelante del Tb<sup>3+</sup>) en una concentración de 3 mM en el buffer de elusión utilizado para las vesículas conteniendo Tb<sup>3+</sup>. Controles realizados por DLS luego de la primera elusión de ambas poblaciones, permitieron determinar las fracciones con mayor concentración de LUVs purificados. El volumen obtenido de estas fracciones más concentradas en LUVs, fue sometido a una segunda etapa de purificación por filtración en gel, empleando el buffer de elusión sin EDTA en ambos casos. Este procedimiento se utilizó para disminuir la concentración de agente quelante, a las requeridas para el atrapamiento de Tb<sup>3+</sup> fuera de las vesículas (~0,5 mM) evitando interferencias en la medición de la señal fluorescente del complejo Tb/DPA. El proceso de elusión adicional realizado para las LUVs conteniendo DPA, permitió igualar las concentraciones finales de ambas poblaciones de vesículas con las que se trabajó.

El diámetro final de cada población de vesículas fue determinado por medio de un segundo control con DLS, obteniéndose un valor promedio de (107,5 ± 0,3) nm para la población de vesículas con Tb<sup>3+</sup> y (108,4 ± 0,3) nm para la población de vesículas con DPA. Las longitudes de onda de excitación ( $\lambda_{exc}$ ) y emisión ( $\lambda_{em}$ ) utilizadas para medir el complejo Tb/DPA, fueron 276 y 545 nm, respectivamente. El paso óptico de la celda de fluorescencia empleada fue de 3 nm.

Con el fin de evaluar el mezclado de contenidos internos de LUVs inducido por las nanopartículas, se agregó un volumen de 5 $\mu$ L de una dispersión de MNP-OA a una mezcla de vesículas conteniendo Tb<sup>3+</sup> y DPA, en proporción 1:1 (volumen final: 250  $\mu$ L) y se midió el

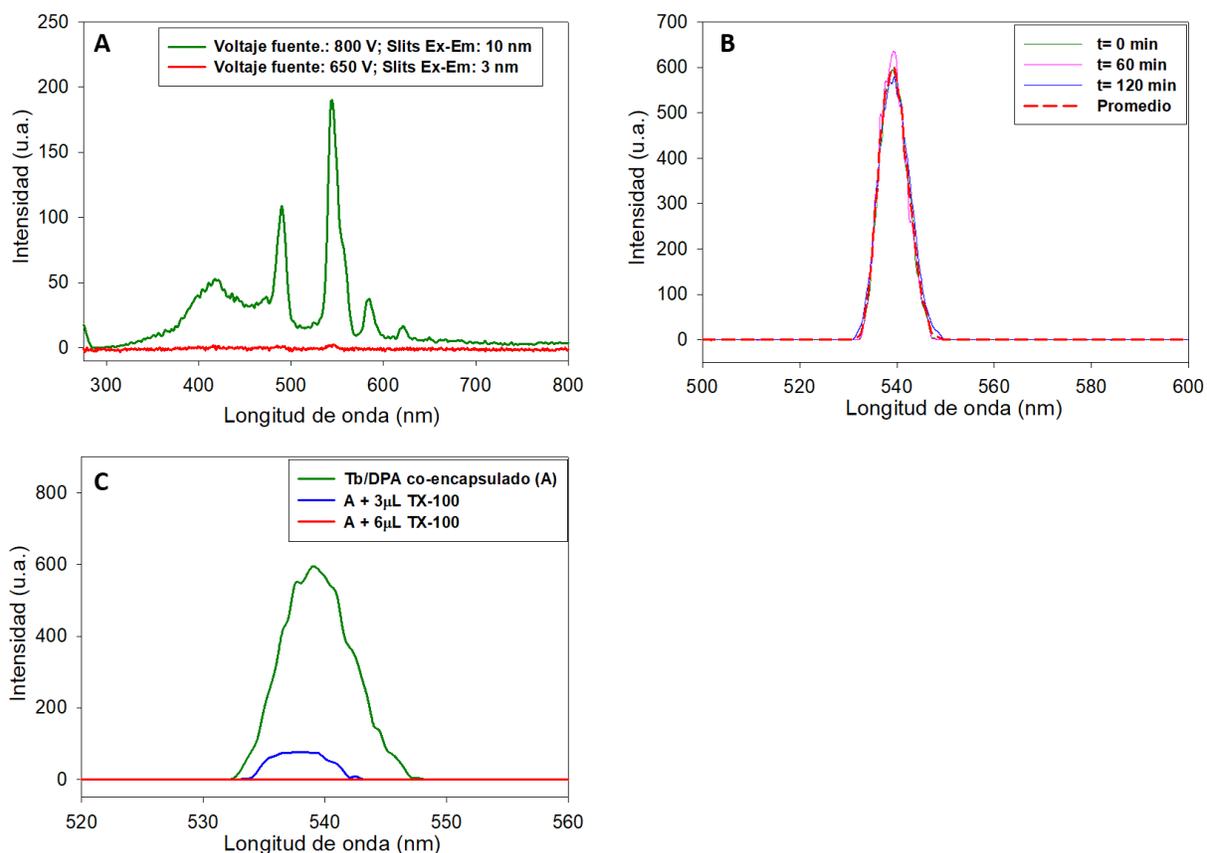
aumento en la intensidad de fluorescencia ( $I_f$ ) debida a la formación del complejo Tb/DPA en el tiempo.

Para propósitos de calibración de la escala de fluorescencia (mezcla de contenido del 100%), se prepararon vesículas conteniendo el complejo de Tb/DPA co-encapsulado, utilizando las mismas cantidades de cada sonda que las que se emplearon en el ensayo de fusión, en buffer TES 2 mM (citrato de sodio 100 mM, pH 7.5). Las vesículas se eluyeron dos veces en una columna Sephadex G-50, empleando el buffer de elusión que incorpora EDTA 3 mM (pH 7,5) en una primera instancia y en ausencia del quelante durante la segunda elusión cromatográfica. Posteriormente se adquirió el espectro de fluorescencia ( $\lambda_{exc}$  276 nm) de las vesículas conteniendo Tb/DPA co-encapsulado inmediatamente luego de haber concluido la última elución de las vesículas, a la hora, y luego de dos horas, con el objetivo de evaluar la estabilidad y reproducibilidad en las mediciones. Estos espectros se muestran en la **Figura IV.3.7A**.

A fin de caracterizar el sistema se realizaron diversos controles. Se preparó una solución conteniendo  $Tb^{3+}$  y DPA en concentraciones 3,75 y 37,5 mM, respectivamente en buffer TES 2 mM, citrato de sodio 100 mM y se adquirió el espectro de emisión de fluorescencia empleando la misma potencia de lámpara (650 V) y ancho de rendija (3 nm) que el usado para medir las vesículas con el complejo co-encapsulado. Como se muestra en la **Figura IV.3.7B**, con esta configuración experimental no es posible observar el espectro de fluorescencia del complejo en bulk en las concentraciones utilizadas. Para visualizar el espectro, se debió incrementar la potencia de la lámpara a 850 V y el ancho de rendijas a 10 nm. Este sencillo control nos indica la importancia de tener confinado el complejo Tb/DPA en las vesículas para su detección por FL con los parámetros utilizados en los experimentos.

También, con el objetivo de confirmar que la fluorescencia observada en la muestra conteniendo vesículas con el complejo co-encapsulado se debe al complejo confinado dentro de las vesículas, se procedió a lisar las mismas mediante el empleo de Tritón X-100. La adición de este surfactante produce la lisis de las vesículas y la liberación del complejo Tb/DPA al seno de la solución. En la **Figura IV.3.7C** se compara el espectro de las LUVs conteniendo Tb/DPA y los obtenidos frente al agregado de diferentes cantidades de Tritón X-100 (0,1 mM). En la figura puede observarse que el agregado del detergente ocasiona una disminución de la emisión de fluorescencia hasta llegar a la ausencia de la misma. Esto se atribuye a la dilución sufrida por el complejo Tb/DPA. En este

caso, se debe contemplar que probablemente el surfactante puede participar produciendo quenching en la fluorescencia del complejo.



**Figura IV.3.7.** Espectros de fluorescencia realizados como control. **A)** Espectro de emisión del complejo Tb/DPA en solución empleando las mismas concentraciones que las usadas en los ensayos de fusión ( $Tb^{3+} = 3,75 \text{ mM}$ ;  $DPA = 37,5 \text{ mM}$ ). La curva roja (adquirida con el arreglo experimental empleado en los experimentos de mezclado de contenido) muestra prácticamente una ausencia de emisión de fluorescencia dada por el complejo  $Tb^{3+}/DPA$  en las concentraciones usadas. La adecuada adquisición del espectro de fluorescencia pudo lograrse incrementando el voltaje de trabajo y el ancho de banda (espectro verde). **B)** Espectro de emisión del complejo Tb/DPA adquirida con las LUVs conteniendo Tb/DPA co-encapsulado, por triplicado. El valor promedio obtenido de  $I_f$ , utilizado para el cálculo posterior de los porcentajes de fusión, se estimó en  $(6,0 \pm 0,3) \times 10^2 \text{ u.a.}$  **C)** Decaimiento en la emisión fluorescente del complejo Tb/DPA por adición de diferentes volúmenes de una solución de Tritón X-100 0,1% p/v. A mayor volumen de surfactante añadido, menor intensidad fluorescente al máximo de emisión, debido a la dilución y disociación de la sonda en el bulk acuoso por ruptura de las vesículas lipídicas.

Estos controles permitieron confirmar que la intensidad de fluorescencia observada con las condiciones experimentales empleadas, es dependiente de lograr una alta concentración local de complejo confinado en las vesículas. También fue posible determinar que la intensidad de fluorescencia ( $I_f$ ) observada es extremadamente sensible a la cantidad de complejo atrapado o confinado. Teniendo en cuenta las constantes de asociación reportadas para el complejo Tb/DPA con distinto grado de coordinación,<sup>56</sup> los volúmenes internos acuosos que aportan el total de LUVs con el cual se trabaja, el volumen acuoso total trabajado en los ensayos y las concentraciones de Tb y DPA disponibles en cada población de vesículas; la dilución que experimenta el complejo luego de la lisis de las vesículas (o en ausencia de confinamiento en las LUVs), es de ~15900 veces (**ver apéndice IIA**). La magnitud de esta dilución, indica que el complejo es prácticamente indetectable o que probablemente se disocie en el buffer externo (conteniendo EDTA) justificando la ausencia de señal o *quenching* observado.

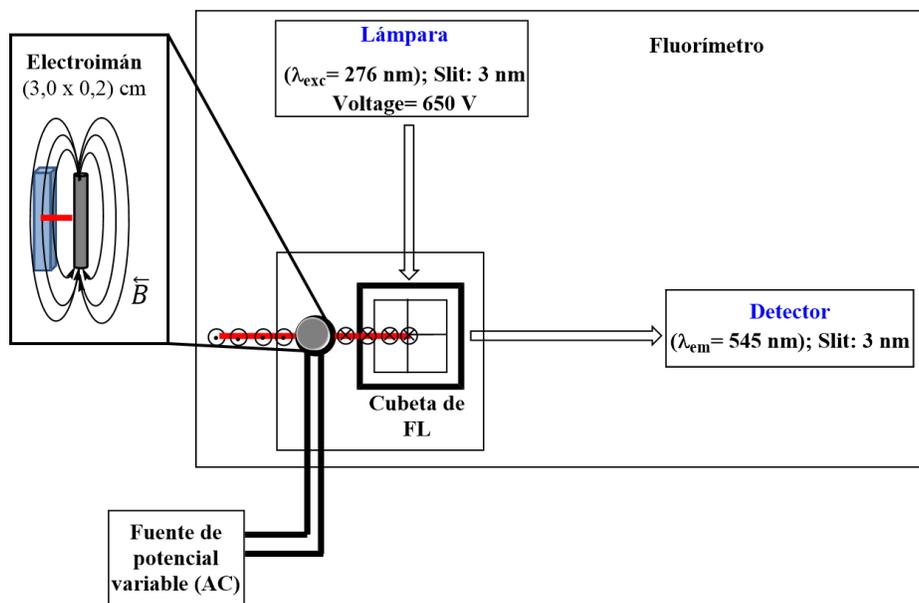
Considerando los controles correspondientes para todas las mediciones de intensidad de fluorescencia adquiridas por los métodos de co-encapsulamiento y medición de  $I_f$  en el tiempo, el porcentaje de mezclado de contenido luego de la adición de las MNP-OA (fusógeno) se calculó según la **Ecuación IV.3.1**, de la siguiente manera:

$$\% \text{ Mezclado de contenido} = \frac{(F - F_0)}{(F^{ce} - F_0^{ce})} \times 100 \quad \text{(IV.3.1)}$$

Donde  $F$  y  $F_0$  son las intensidades de fluorescencia del complejo Tb/DPA en presencia de MNPs-OA a tiempo  $t$  y, a  $t = 0$  antes de la adición de las nanopartículas. La  $I_f$  inicial ( $t=0$ ) debida a la dispersión de luz causada por los liposomas, fue tomada en cuenta para los cálculos realizados ( $F_0$ ), sin embargo, todas las curvas de fluorescencia en el tiempo fueron normalizadas a cero a fines comparativos. Por otro lado,  $F^{ce}$  representa la intensidad de fluorescencia al 100% del mezclado de contenido que, como se especificó anteriormente, se dedujo a partir de las cuentas obtenidas de la emisión fluorescente del complejo Tb/DPA co-encapsulado en las vesículas de POPC. Dado que la configuración de los espectros de barrido muestra sólo la intensidad de fluorescencia atribuida a la emisión del complejo Tb/DPA sin dispersión de luz a descontar, el término  $F_0^{ce}$  (intensidad de fluorescencia de las vesículas co-encapsuladas a  $t = 0$ ), puede aproximarse a cero.

**IV.3.4.6- Ensayo de modulación de la fusión por campos magnéticos de potencial variable**

Con el fin de estudiar la posibilidad de modular el proceso de fusión por medio de la aplicación de campos magnéticos, se llevaron a cabo mediciones de mezclado de contenido (FL) a través del tiempo, implementando el set-up experimental mostrado en el **Esquema IV.3.2**. Adicionalmente, se evaluó cómo la presencia de campos magnéticos afecta la permeabilidad de la bicapa lipídica en ausencia de MNP-OA y luego del agregado de las mismas. El arreglo experimental consistió en un electroimán casero (3,0 x 0,2 cm) que se situó paralelo al compartimento de la celda de fluorescencia sin causar ninguna interferencia al arreglo óptico del equipo. El electroimán se conectó posteriormente a una fuente de potencial variable, de manera tal que permitió aplicar un programa de potenciales a lo largo del tiempo, variando así la magnitud del campo magnético generado y modificando, por lo tanto, la perturbación causada por dicho estímulo externo. Los valores registrados en forma de corrientes y potenciales, se tradujeron a unidades de campo magnético (Tesla) por medio de un teslámetro F.W. Bell Mod. 5070 situando el sensor de medición en el centro de la cubeta de fluorescencia. El programa de potenciales aplicados permitió generar con el electroimán, campos de entre 0,08 y 0,45 mT. Dado que la sonda  $Tb^{3+}$  posee carácter paramagnético, se realizaron controles por medio de la aplicación de campos magnéticos a las LUVs (cargadas con Tb y DPA) en ausencia de las MNP-OA. Esto asegura que las fluctuaciones en intensidad de fluorescencia son debidas únicamente a cambios en porcentajes de vesículas fusionadas.

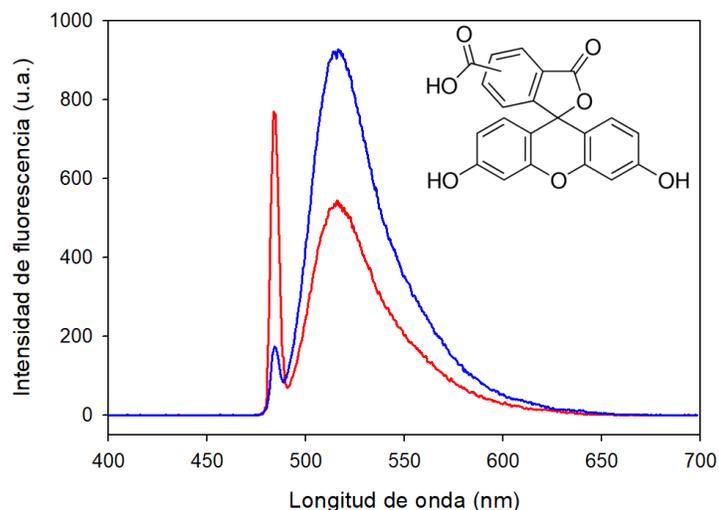


**Esquema IV.3.2.** Diseño experimental empleado para los ensayos de modulación de la fusión por acción de campos magnéticos de intensidad variable. En el esquema general (vista superior del instrumento de FL), las líneas de campo recorren las distancias señaladas a lo largo de las líneas rojas entrando y saliendo del plano. El zoom ubicado en el recuadro (izquierda) corresponde a la vista en paralelo del arreglo electroimán-cubeta separados por una distancia aproximada de 1,5 cm. Se señala también el recorrido de las líneas de campo en el plano transversal.

#### IV.3.4.7- Ensayos de *leakage* o liberación de contenido interno

Estos estudios fueron realizados con el fin de evaluar el efecto de las MNP-OA en la permeabilidad de la bicapa de las vesículas de POPC. Como estudio principal para la determinación de alteraciones en la permeabilidad de las bicapas, se implementó el ensayo de liberación de la sonda carboxifluoresceína (CF) desde el interior, hacia el exterior de las vesículas. En este caso se incorpora carboxifluoresceína (5(6)-carboxifluoresceína) en el interior de las vesículas en una alta concentración en la cual el fluoróforo experimenta un *auto-quenching* de la fluorescencia. En el caso de que la permeabilidad de la bicapa se incremente y permita la salida de CF al exterior de las vesículas, la dilución de la sonda fluorescente en la solución conduce a un incremento en la fluorescencia.

La preparación de las vesículas unilamelares grandes (LUVs) se llevó a cabo siguiendo la metodología informada en Düzgünes et. al.<sup>36,57</sup> Para ello se utilizó el método de extrusión descrito en **3.2**, generando en este caso, la suspensión de MLVs en una solución de CF 20 mM (TES 2 mM, citrato de sodio 100 mM, pH 7,4) previamente preparada y almacenada en film de aluminio para su protección de la luz. Luego de la extrusión por filtro de policarbonato con tamaño de poro de 100 nm, las vesículas fueron purificadas por filtración en gel mediante una columna de Sephadex G-25 utilizando el buffer de ensayo, al cual se le adicionó NaCl en concentración 10 mM con el fin de mantener la osmolaridad. El tamaño promedio de las LUVs-CF se midió por DLS, obteniéndose una distribución de diámetros promedio de 100 nm. Con el fin de confirmar la presencia de CF en el interior de las LUVs, se adquirieron espectros de fluorescencia de las fracciones eluidas de vesícula lipídica, antes y después del agregado de un volumen de Tritón X-100 (10  $\mu$ L en concentración 0,1 mM). La emisión de fluorescencia de la CF, fue medida a 517 nm con una excitación fijada a 492 nm. El surfactante, al romper las vesículas produce la liberación de CF. La  $I_f$  de las vesículas sin TX-100 fue normalizada como intensidad inicial en todos los experimentos (**Figura IV.3.8**).



**Figura IV.3.8.** Espectro de emisión de CF en vesículas lipídicas conteniendo CF 20 mM (rojo) y luego del agregado del surfactante TX-100 (azul). La estructura de la sonda fluorescente (5(6)-carboxifluoresceína) se muestra en el margen superior derecho.

De manera subsiguiente, se colocó un volumen de 250  $\mu\text{L}$  LUVs conteniendo CF en una cubeta de fluorescencia y se registraron los cambios en función del tiempo, en la  $I_f$  al máximo de emisión de la sonda como resultado de la incorporación de 5  $\mu\text{L}$  de MNP-OA en concentración 2 mg/mL a las vesículas. Las mediciones de permeabilidad fueron realizadas como control en condiciones de ausencia y presencia de campo magnético.

Adicionalmente, haciendo uso de la metodología experimental detallada en la sección **IV.3.4.5**, se realizaron estudios para la determinación de cambios en la permeabilidad de las bicapas, por medio de la medición de la  $I_f$  proveniente del complejo Tb/DPA co-encapsulado en las LUVs. Una disminución de la  $I_f$  en presencia de las MNP-OA, es atribuida a la salida del complejo Tb/DPA desde el interior hacia el exterior de los liposomas.<sup>36,38</sup> Para ello, un volumen de 5  $\mu\text{L}$  de MNP-OA en concentración 2 mg/mL fue añadido a un volumen de 250  $\mu\text{L}$  de LUVs conteniendo el complejo Tb/DPA co-encapsulado. Posteriormente, los cambios en la  $I_f$  al máximo de emisión del complejo Tb/DPA ( $\lambda_{em} = 545 \text{ nm}$ ), fueron registrados a lo largo de un tiempo total de  $\sim 50$  minutos, luego del cual se agregó un volumen de 10  $\mu\text{L}$  de Tritón X-100. En este caso, el surfactante lisa las vesículas lipídicas produciendo el decaimiento en la  $I_f$  dado por la dilución del complejo Tb/DPA en el bulk, como fue indicado previamente.

#### **IV.3.4.8- Microscopía de transmisión electrónica (TEM) de LUVs/MNP-OA**

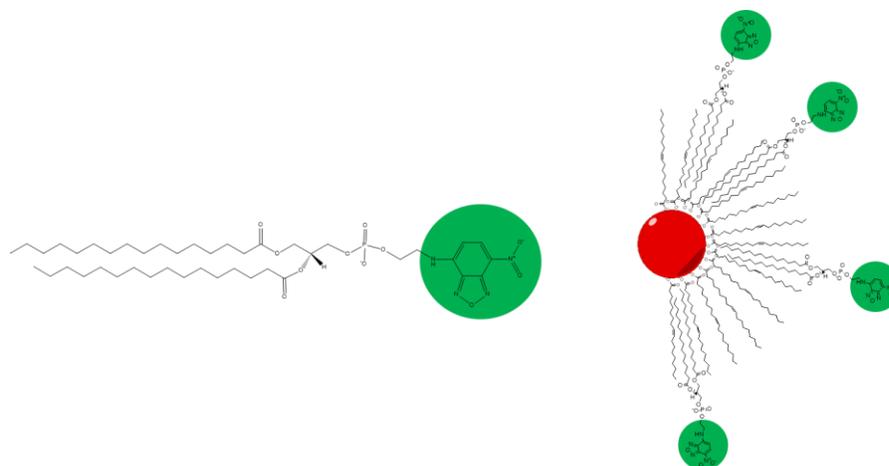
Las mediciones de TEM se realizaron empleando un microscopio Jeol 1200 EX II operado a un voltaje de aceleración de 80 kV. Una muestra que consistió en 250  $\mu\text{L}$  de LUV se incubó junto con 5  $\mu\text{L}$  de MNP-OA (2 mg/mL;  $X_{\text{MNP-OA}} = 0,0014$ ), a diferentes tiempos, y se sembraron volúmenes de 10  $\mu\text{L}$  sobre grillas de cobre recubiertas con carbono (Electron Microscopy 400 mesh). Posteriormente, las muestras se tiñeron negativamente con una solución de acetato de uranilo al 1% para mejorar el contraste. Con el objetivo de obtener un perfil cinético de las morfologías promedio a través del proceso de fusión, se graficaron una serie de histogramas que incluyeron el conteo de al menos tres imágenes obtenidas en cada período de tiempo. El índice de polidispersidad (PDI) se calculó a partir de los datos de TEM por medio de la **Ecuación II.1.11**, definida en el **capítulo II**. La determinación estadística de este parámetro se realizó considerando

los valores medios promediados a partir de tres imágenes en cada tiempo. El procesamiento de la imagen se realizó utilizando el software Image J V.8.

#### **IV.3.4.9- Marcado de las MNP-OA con la sonda fluorescente 16:0 NBD-PE**

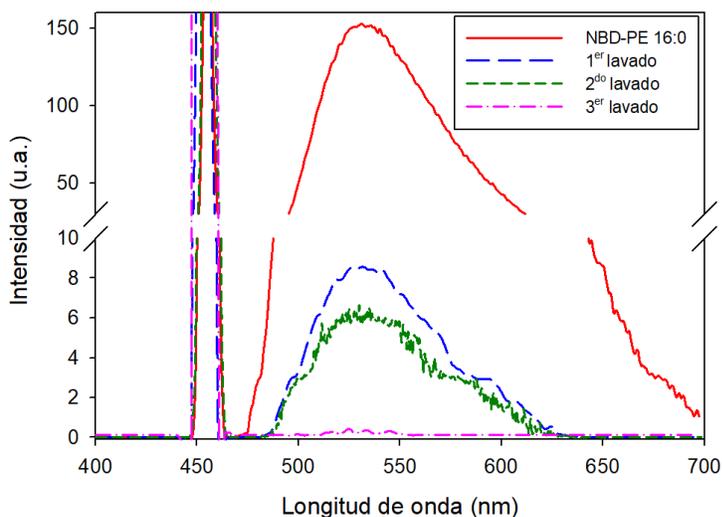
Los ensayos que involucraron la observación y estudio de GUVs por microscopio confocal en presencia de MNP-OA requirieron para la observación de las nanopartículas, su marcación con una sonda fluorescente a fines de poder co-localizarlas en la bicapa lipídica. La metodología seleccionada para la marcación de las nanopartículas se basó en el auto-ensamblado de la sonda fluorescente.

Resumidamente, 200  $\mu$ L de una dispersión de MNPs-OA en concentración 2 mg/mL en THF fue centrifugada (12000 g) y luego sometida a la acción de un imán convencional (decantación magnética), a modo de lograr la precipitación completa del coloide en el fondo de la solución. Las nanopartículas fueron posteriormente suspendidas en etanol aplicando un ciclo de sonicación de 10 minutos, luego de lo cual 10  $\mu$ L de la sonda fluorescente 16: 0 NBD-PE (> 99%, Avanti Polar Lipids) en una concentración de 0,02 mg/mL (cloroformo: metanol 2:1 v / v) fueron agregados a la dispersión etanólica. La mezcla se incubó durante 1 h con agitación constante y, posteriormente, las MNPs se precipitaron magnéticamente una vez más para extraer el sobrenadante etanólico. La unión de la sonda fluorescente a la nanopartícula magnética tiene lugar durante este tiempo de incubación, a través de interacciones no covalentes entre las cadenas hidrocarbonadas del ácido oleico y las de la sonda fluorescente (**Esquema IV.3.3**).



**Esquema IV.3.3.** 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-*N*-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il) (16:0 NBD-PE). La región fluorescente se encuentra marcada en verde (**Izquierda**). MNP-OA marcada fluorescentemente con la sonda 16:0 NBD-PE por medio de interacciones no covalentes (**Derecha**).

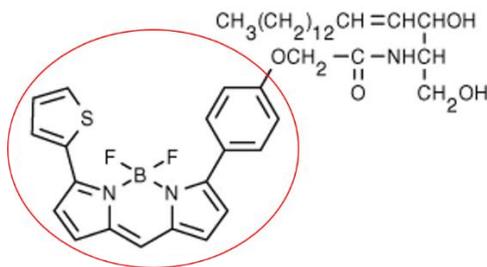
La sonda no unida a las nanopartículas se eliminó por medio de tres ciclos de suspensión-extracción en etanol, y se verificó su eliminación completa en la tercera fracción etanólica, por medio de espectros de fluorescencia. Las longitudes de onda de excitación y emisión de la sonda NBD-PE 16:0 en etanol, se fijaron en 460 y 535 nm respectivamente, y los espectros de emisión de fluorescencia fueron adquiridos en un rango de 400 a 700 nm (**Figura IV.3.9**). El pellet final de MNP-OA/NBD-PE, fue suspendido en 200  $\mu$ L de THF para su posterior empleo en la incubación con las GUVs.



**Figura IV.3.9.** Espectros de emisión de la sonda fluorescente NBD-PE 16:0 utilizada para el marcado de las MNP-OA. La línea roja corresponde al espectro de la sonda en solución etanólica en una concentración 0,02 mg/mL (concentración utilizada para el tratamiento de las MNP-OA). Las curvas restantes (leyenda en gráfico) corresponden a los espectros de emisión de la sonda luego de cada uno de los lavados con etanol para la eliminación de fluoróforo libre.

#### IV.3.4.10- Microscopía confocal

Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs) de POPC se prepararon mediante la técnica de electroformación clásica descrita por Angelova et. al.<sup>58,59</sup> Resumidamente, 10  $\mu$ l de solución madre de POPC (0,5 mg/ml en cloroformo: metanol 2:1 v/v) con 0,5% mol de la sonda fluorescente Bodipy-TR-Ceramida (Life Technologies, **Esquema IV.3.4**), fueron dispersados en dos láminas de vidrio recubiertas con ITO. Los electrodos se sometieron a vacío para eliminar cualquier resto de solvente orgánico. La formación de las GUVs se realizó en una solución de sacarosa iso-osmótica con respecto a un buffer TES 2 mM, citrato de sodio 100 mM, pH (7,5) con 1,6% v/v de THF (según la concentración final de THF en los ensayos de incorporación de MNPs-OA a las LUVs). La osmolaridad del buffer y de la solución de sacarosa fue corroborada por medio de un osmómetro (Löser™ TYP6). Posteriormente las GUVs se formaron aplicando un potencial sinusoidal de 1 V y 10 Hz durante 40 minutos, a temperatura ambiente.



**Esquema IV.3.4.** Sonda fluorescente de marcación de la membrana en GUVs, 2-[4-(2,2-difluoro-12-tiofen-2-il-1-aza-3-azonia-2-boranuidatriciclo [7.3.0.03,7]dodeca-3,5,7,9,11-pentaen-4-il)fenoxi]-N-(1,3-dihidroxiocetadec-4-en-2-il)acetamida (Bodipy TR Ceramida). La región fluorescente se señala en rojo.

Alícuotas de la suspensión de GUVs se transfirieron a una cámara de observación de 8 pocillos (Lab-Tek, Thermo Fisher Scientific, Inc. NYSE: TMO). Antes de la adición de las GUVs en los pocillos, el vidrio de la cámara de observación se trató con una solución de  $\beta$ -caseína 10 mg/ml, para evitar la ruptura de las GUVs en los portaobjetos. El remanente de  $\beta$ -caseína fue eliminado por enjuague con agua. Una vez listos los pocillos de observación se agregó a cada uno 200  $\mu$ L del buffer iso-osmótico TES 2 mM, citrato de sodio 100 mM (pH 7,5), 5  $\mu$ L de la suspensión de GUVs y 5  $\mu$ L de la muestra correspondiente a analizar (por ejemplo, MNPs-OA marcadas con sonda fluorescente). Todas las muestras y los controles realizados se dejaron equilibrar 20 minutos en la cámara de observación de 8 pocillos antes de la observación en el microscopio confocal. Los liposomas gigantes se observaron directamente con un microscopio confocal de fluorescencia (Olympus FV1200, Tokio, Japón).

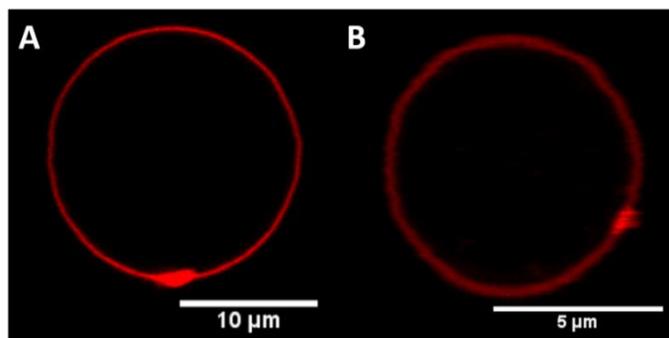
Los cambios en la intensidad de la fluorescencia en la membrana de las GUVs y el contraste dentro del liposoma se cuantificaron posteriormente con el software ImageJ 1.43u (NIH, USA), llevando a cabo un procedimiento de co-localización de las sondas fluorescentes con canales diferenciados. Para ello, se parametrizó la intensidad fluorescente en la membrana empleando un factor de normalización  $N$ , definido según la **ecuación IV.3.2**, como:

$$N = \frac{I_{verde}}{I_{rojo}} \quad (\text{IV.3.2})$$

Donde  $I_{verde}$  es la intensidad de fluorescencia dada por las nanopartículas marcadas (NBD-PE 16:0) e  $I_{rojo}$ , la intensidad de fluorescencia de la sonda que marca la membrana (Bodipy TR-Ceramida). Con el fin de obtener valores contrastables entre las muestras estudiadas, la

cuantificación a lo largo de la membrana se realizó por medio del trazado de una línea transversal a la misma. Tanto la longitud como la posición de este corte transversal se mantuvo constante en todos los casos. Después de la corrección de la línea de base correspondiente, se realizó la lectura de los valores máximos de intensidad de fluorescencia ( $I_f$ ) de las curvas gaussianas obtenidas en cada corte transversal, al punto donde el canal rojo tiene su máximo en  $I_f$ . Dado que puede asumirse que el marcador de membrana se encuentra en igual concentración en todas las vesículas obtenidas, su  $I_f$  se asume constante, y esto permite la cuantificación relativa de la sonda de nanopartícula (variable según la cantidad de MNP-OA que se ubique en la membrana) por el factor de normalización calculado.

Adicionalmente, se realizaron controles para detectar posibles cambios estructurales en las membranas lipídicas. Estos controles incluyeron la adición de THF puro en la misma cantidad que la empleada con los agregados de las suspensiones de MNP-OA y la adición de MNP-OA sin marcar ( $5\mu\text{L}$  de MNP-OA en concentración  $2\text{ mg/mL}$ ), **Figura IV.3.8**.



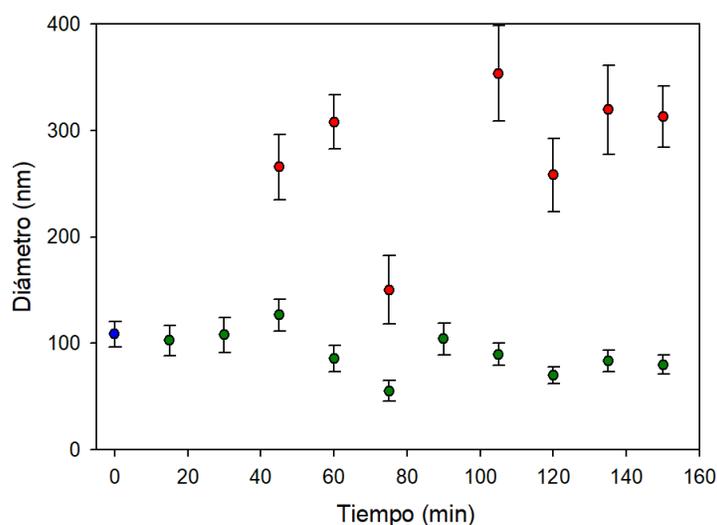
**Figura IV.3.10.** Controles de estabilidad de GUVs marcadas con Bodipy TR-Ceramida (canal rojo). **A)** agregado de MNPs-OA sin marcado con sonda fluorescente NBD-PE 16:0. **B)** agregado de solvente orgánico (THF) en el que se dispersan las MNPs-OA. En ambos casos la morfología de las bicapas permanece inalterada ante el agregado de los componentes puros.

## IV.4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV.4.1- Cinética de crecimiento de las vesículas inducido por la adición de MNP-OA

En una primera instancia, se obtuvo información relevante acerca de la cinética de crecimiento y/o aglomeración de las vesículas lipídicas (LUVs), luego de la incorporación del fusógeno de prueba, las MNPs-OA. Por medio de la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS), se midieron los tamaños de las vesículas de POPC y se detectaron cambios inducidos por la presencia de MNP-OA a lo largo de un transcurso de tiempo aproximado de 2,5 horas.

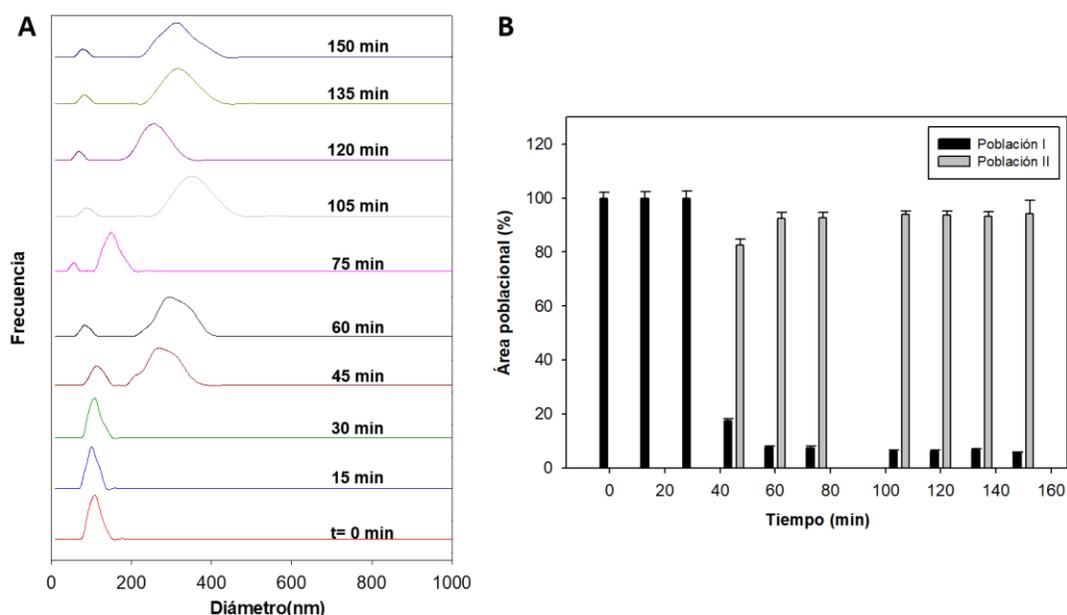
Como se observa en la **Figura IV.4.11**, las LUVs mostraron inicialmente una distribución del diámetro hidrodinámico con una media de  $(108,7 \pm 0,3)$  nm. Tras la adición de las MNPs-OA, y luego de 45 minutos de incubación, se observó la aparición de una segunda población de vesículas con un diámetro promedio de  $(265,6 \pm 0,5)$  nm. Exceptuando fluctuaciones dentro del error experimental, ambas distribuciones poblacionales se mantuvieron relativamente constantes durante el transcurso del experimento, obteniéndose tamaños promedio de  $(90,4 \pm 0,7)$  y  $(303,1 \pm 0,8)$  nm para la primera y segunda población de vesículas respectivamente.



**Figura IV.4.11.** Distribuciones de tamaño observadas por DLS a lo largo del tiempo. Población inicial de LUVs (**azul**); y tamaños promedio obtenidos luego de la adición de las MNPs-OA, población 1 (**verde**) y población 2 (**roja**). Las barras de error obtenidas a partir del promedio de tres mediciones realizadas para cada muestra, señalan un aumento en la polidispersidad de la población 2 correspondiente a los reordenamientos de vesículas de mayor tamaño.

Al analizar los datos de las distribuciones gaussianas, teniendo en cuenta la ponderación en volumen de las estructuras observadas a cada tiempo (**Figura IV.4.12A**), y al calcular el área bajo la curva de cada señal, se aprecia un incremento en el área de pico correspondiente a la población de mayor tamaño con respecto a la población inicial o de menor diámetro promedio. Esta tendencia fue racionalizada en el gráfico de la **Figura IV.4.12B** donde se calcularon los porcentajes relativos a cada área bajo la curva, teniendo en cuenta la sumatoria de las áreas de cada pico (para cada uno de los tiempos medidos) como área total (100%). Este gráfico permite visualizar claramente que la aparición de la segunda población vesículas (30-45 minutos de incubación de LUVs en presencia de MNPs-OA) marca el inicio de un rápido proceso de reestructuración lipídica, donde tiene lugar el crecimiento de nuevas vesículas “hijas” a partir de sus precursores de menor tamaño (LUVs de ~100 nm). Ambas poblaciones de vesículas se estabilizan en los valores finales antes mencionados, prácticamente luego de 1 hora de incubación en el medio acuoso. Adicionalmente, cuando a las vesículas de POPC se les agregó THF en volúmenes de 5 a 10  $\mu\text{L}$  (empleados en dispersiones de nanopartículas ensayadas) no se evidenciaron variaciones en el tamaño de las estructuras lipídicas. Este control permitió corroborar que el fenómeno de reestructuración de las estructuras lipídicas observadas, se debe únicamente a la presencia de las MNPs-OA en interacción activa con las LUVs.

Si bien es válido definir que existen procesos de reestructuración en el tiempo que dan lugar al crecimiento de una segunda población de vesículas a expensas de la primera, no es posible definir si este fenómeno en donde se generan vesículas de mayor tamaño es un proceso de agregación, o se encuentra relacionado a procesos de reestructuración de bicapas para dar un intermediario de hemifusión o fusión de membranas en su totalidad. Sin embargo, la reestructuración aquí promovida por las MNP-OA puede comenzar a entenderse dentro del marco de la gran cantidad de mecanismos que los sistemas vesiculares atraviesan para promover el proceso de fusión y que muchos autores han definido en instancias similares.<sup>10,12</sup>



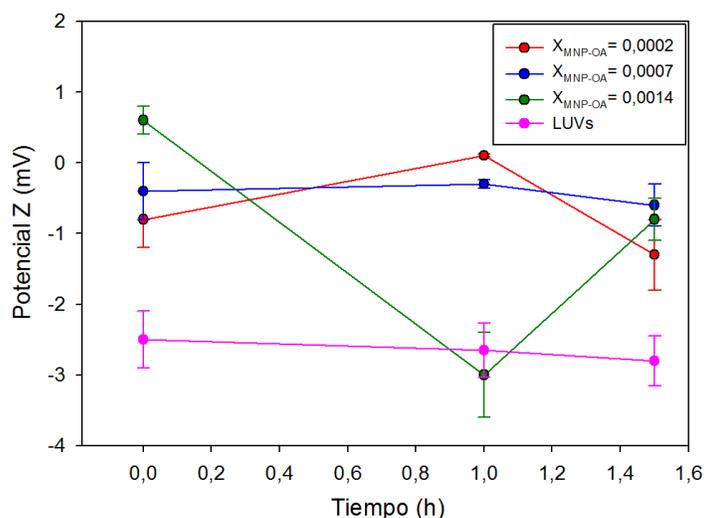
**Figura IV.4.12.** **A-** Perfil de distribución de tamaños de LUVs en presencia de MNPs-OA a lo largo del tiempo. **B-** Gráfico áreas poblacionales porcentuales calculadas para las poblaciones 1 (negra) y 2 (gris). Los valores graficados, se obtuvieron del promedio de experimentos por triplicado.

Acorde a las observaciones realizadas por Luisi et. al.<sup>60,61</sup> y otros<sup>62</sup>, los procesos de reestructuración y reorganización lipídica para la síntesis de nuevas vesículas hijas a partir de vesículas precursoras, son considerados dentro del escenario del origen de la vida. La auto-reproducción de micelas y vesículas, es considerado un modelo realista de la proliferación de células primitivas dentro del cual se han llevado a cabo numerosos estudios para la elucidación de los mecanismos predominantes. En ellos, se determinó que la incorporación externa de precursores monoméricos como ácido oleico, o autoensamblados micelares de este ácido graso, a vesículas de POPC preexistentes, es capaz de catalizar una cascada de procesos de rearrreglo y fragmentación de las bicapas liposomales para dar lugar al crecimiento y división de vesículas hijas.<sup>60</sup> El costo energético de la división de vesículas, se suple con el incremento de la relación superficie/volumen de los liposomas hijos más pequeños que se forman. Haciendo una analogía con las MNP-OA actuando como precursores del proceso, y sabiendo que en la reproducción vesicular resulta termodinámicamente favorable la *génesis* de una nueva población de vesículas a partir de vesículas

precursoras y con un diámetro promedio final similar al que presentan inicialmente, es que en los resultados obtenidos por DLS sería correcto discutir o al menos contemplar la posibilidad de que la población señalada como **1**, podría corresponder o bien a vesículas que han permanecido inalteradas o a estructuras que han atravesado por un proceso de fusión y han originado nuevas vesículas hijas.

Potencial zeta representa una propiedad física importante de las partículas en suspensión y permite predecir no solo cuestiones relativas a la estabilidad coloidal del sistema en el medio acuoso, sino también dar cuenta del tipo de interacciones que pueden estarse llevando a cabo, tales como interacciones transitorias, permanentes y asociación o disociación de especies en solución.<sup>54</sup> Al mismo tiempo, la medición del potencial zeta ha sido planteada por organismos de regulación en la producción de nuevos nanobiomateriales para el área de la salud (FDA, NCL), como uno de los parámetros relevantes en la determinación de la biocompatibilidad *in vivo* e *in vitro* de plataformas con futura implicancia en la salud humana.<sup>63</sup>

En paralelo a las adquisiciones de diámetros promedio por DLS, se procedió a realizar mediciones de potencial zeta ( $\zeta$ ) de mezclas de LUVs en presencia de las MNP-OA a distintas fracciones molares de nanopartícula (**Figura IV.4.13**). Las adquisiciones fueron efectuadas una vez mezclados los volúmenes de ambos componentes, y luego de 1 y 1,5 h de incubación. El potencial zeta de las vesículas de POPC puras fluctuó dentro de valores levemente negativos, cercanos a  $(-2,6 \pm 0,3)$  mV, a lo largo del tiempo. Este valor es consecuencia directa del potencial de dipolo inducido por el buffer de ensayo a lo largo de la región polar de la bicapa. Adicionalmente, controles realizados con el solvente orgánico usado en la dispersión de las nanopartículas (THF) no mostraron cambios en el potencial de membrana a lo largo del tiempo.



**Figura IV.4.13.** Potencial Z medido para LUVs de POPC y mezclas MNP-OA/LUVs a distintas fracciones molares de nanopartículas ( $X_{MNP-OA}$ ). Adquisiciones realizadas una vez incorporadas las MNP-OA al sistema de vesículas ( $t=0$ ), y luego de 1 y 1,5 h de incubación.

Dada la naturaleza zwitteriónica de las moléculas de POPC que componen las vesículas lipídicas y la ausencia de carga neta en las MNP-OA, las variaciones obtenidas en los valores de potencial zeta resultan leves y dificultan, por lo tanto, el establecimiento de tendencias marcadas. Sin embargo, la obtención de  $\zeta$  similares a través de sucesivas repeticiones de este experimento con muestras diferentes a intervalos de tiempo regulares, evidenciaron un comportamiento reproducible a partir del cual es posible realizar algunas aseveraciones de manera general.

Del análisis de la fracción molar  $X_{MNP-OA}=0,0014$ , se observa que la incorporación inmediata de las nanopartículas a las LUVs, producen un incremento inmediato del potencial de membrana (inicialmente en  $-2,6$  mV) a valores cercanos a  $(0,6 \pm 0,3)$  mV. Luego de 1 h de incubación, el potencial  $\zeta$  se reestablece en valores próximos a los iniciales (LUVs puras),  $(-3,0 \pm 0,6)$  mV; y se estabiliza posteriormente en valores promedio de  $(-0,8 \pm 0,3)$  mV.

El comportamiento observado puede entenderse en términos del mecanismo de unión de las MNP-OA a la bicapa de las vesículas lipídicas. La incorporación de las MNP-OA a las vesículas producen una reestructuración instantánea de la capa difusa dada por el buffer que interacciona con las LUVs. Si bien las nanopartículas hidrofóbicas no aportan cargas al sistema, el potencial de

membrana de las LUVs aumenta a valores cercanos a cero debido a la oclusión de las cargas dispuestas por los grupos colina polares en la superficie de las bicapas. Transcurrida 1 h de incubación, las nanopartículas posiblemente han cursado el proceso de internalización en la bicapa lipídica hacia el espacio hidrofóbico intermembrana, a través de un mecanismo de interdigitación mediado por las cadenas hidrocarbonadas de OA. Las deformaciones como consecuencia de este proceso de internalización o cambios y arreglos estructurales establecidos en las membranas lipídicas luego de 1,5 h de incubación, resultan en la estabilización final en los valores de potencial zeta observados. Segota et. al.<sup>64</sup> han reportado cambios de igual magnitud en los valores de potencial zeta de membranas lipídicas de un fosfolípido zwitteriónico, tras la internalización de nanopartículas hidrofóbicas mediante mecanismos similares. Los autores establecieron que los procesos de interdigitación entre los lípidos de bicapa y las cadenas hidrofóbicas de las NPs (ligandos de superficie), acompañadas por deformaciones en la estructura de la membrana, representan los mecanismos energéticamente más viables para el posicionamiento estable de las nanopartículas en el interior de la bicapa. Sin embargo, tanto en este último caso como en la gran mayoría de estudios relacionados a la internalización de NMs a las bicapas lipídicas, la evaluación de estos procesos ha sido avocada al uso de nanopartículas con diámetros menores (~2-4 nm) que el espesor medio de las membranas (~4-5 nm).<sup>65,66</sup> En nuestro caso, y debido al mayor diámetro de las MNP-OA empleadas (10,7 nm) no es posible concebir, en principio, una internalización completa en la bicapa sino más bien una adsorción o internalización que debería dejar defectos o protuberancias de manera similar a lo propuesto por Rai et. al.<sup>67</sup> en modelos simulados de biomembranas y nanopartículas hidrofóbicas. A través de las simulaciones realizadas en modelos de estrato córneo, los autores reportaron que NPs hidrofóbicas de tamaños de hasta 5 nm son capaces de penetrar en el interior de la bicapa lipídica, mientras que NPs aniónicas y catiónicas permanecen adsorbidas en la superficie de las membranas. Además, la baja barrera energética requerida para que las nanopartículas hidrofóbicas neutras sean capaces de atravesar la membrana, disminuye conforme el tamaño de las NPs es cada vez menor.<sup>67</sup> Li et. al.<sup>68</sup> presentaron un modelo empleando nanopartículas hidrofóbicas de tamaños similares (~10 nm) a los utilizados durante este trabajo de tesis. Los autores propusieron que en casos donde el diámetro de las NPs es mayor que el de la bicapa, tiene lugar un proceso de desajuste o “*mismatching*” hidrofóbico positivo. En este proceso, los lípidos de membrana adyacentes al plano de inserción de las NPs experimentan desarreglos configuracionales diversos donde la fluctuación en el movimiento de las moléculas

lipídicas de bicapa tiene un impacto casi nulo en la posición de final de las nanoestructuras en membrana. Por el contrario, las nanopartículas resultan estabilizadas en el plano intermedio de la membrana, que modifica sus propiedades mecánicas en determinadas proporciones, en pos de mantener una inclusión estable de las nanopartículas en el poro de la bicapa lipídica.<sup>68</sup> Pese a que muchos de los mecanismos acerca de la inclusión de nanopartículas hidrofóbicas con diámetros mayores que el espesor de la bicapa continúan siendo objeto de investigación, estudios de penetración *in vitro* utilizando piel humana como membrana modelo, han permitido demostrar que NPs hidrofóbicas neutras con tamaños hasta 15 nm son capaces de atravesar eficazmente, la barrera del estrato córneo en buenas proporciones.<sup>69,70</sup> Si bien el tamaño resulta un factor limitante para la permeación efectiva en bicapas lipídicas por parte de las nanopartículas, se ha constatado que el grado de hidrofobicidad de estas últimas es un factor fundamental y determinante en la capacidad de penetración en membranas para su uso en diversas aplicaciones.<sup>67-69</sup>

Como se mencionó anteriormente, los valores de potencial zeta obtenidos para los experimentos con diferentes fracciones molares de MNP-OA incorporada a las LUVs, presentan una tendencia reproducible dentro de sus leves variaciones a lo largo de repetidas mediciones con experimentos diferentes. Sin embargo, en el caso de los  $\zeta$  que se observan para las fracciones molares más bajas de nanopartícula ( $X_{\text{MNP-OA}}=0,0007$  y  $0,0002$ ), las fluctuaciones en los valores de potencial son sustancialmente menores y prácticamente constantes a lo largo del tiempo. Esto nos permitió hipotetizar en cierta forma, que la medida en que las MNP-OA son capaces de interactuar con las LUVs, guarda una estrecha dependencia con las cantidades de nanopartícula añadida al sistema de vesículas lipídicas. Dichas dependencias podrían ser capaces de dictar el comportamiento de las MNP-OA durante el proceso de fusión, tanto en la cinética como en las proporciones en las que este sucede.

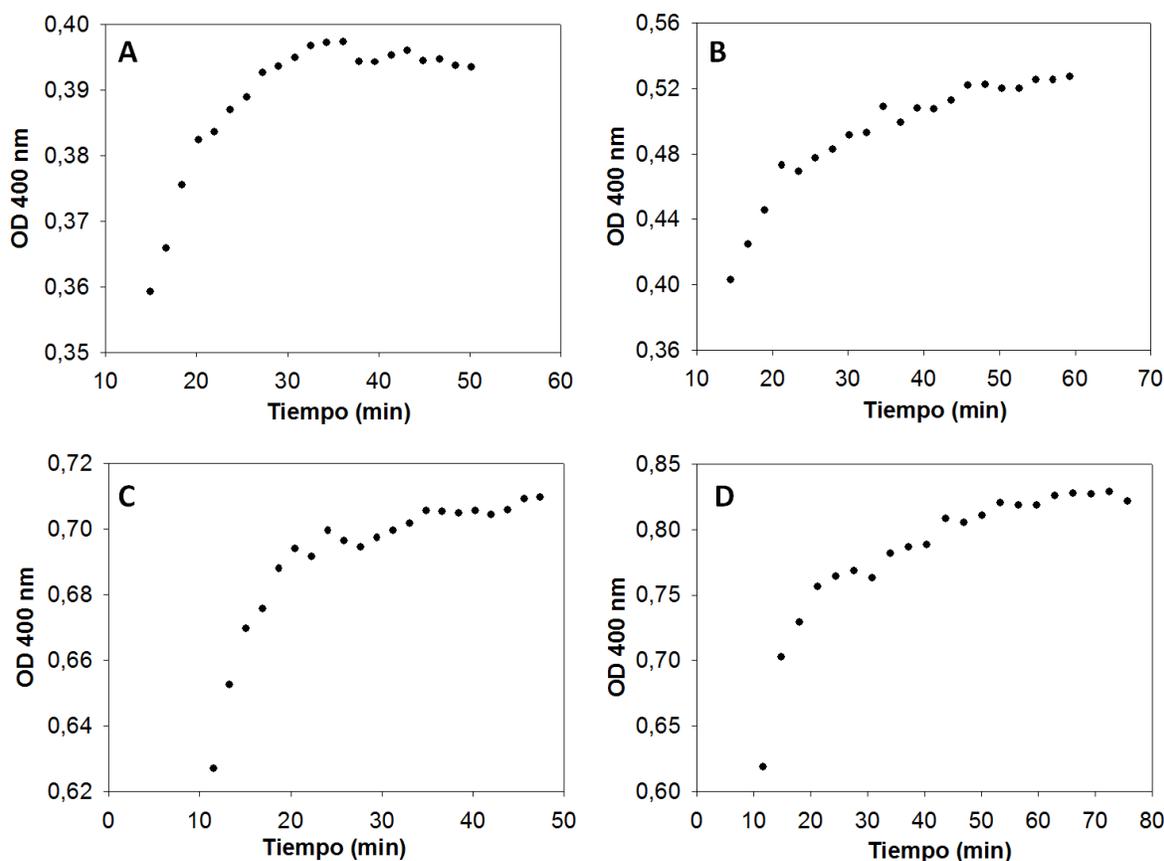
De manera subsiguiente y como primera aproximación experimental, se procedió al estudio de la cinética de los procesos que tienen lugar como resultado de la interacción nanopartícula-LUVs, ante la incorporación de MNP-OA en diferentes fracciones molares. Esto se llevó a cabo realizando ensayos de turbidimetría. Los cambios en el tamaño de las estructuras medidas por medio de turbidimetría (UV-Visible), son visualizados en términos de cambios en la *densidad óptica* (OD). La OD corresponde a la extinción o total atenuación de la luz debido a fenómenos de absorción sumado a efectos de dispersión del haz de luz con el que se irradia la muestra. Bajo determinadas condiciones de contorno, la medición de la densidad óptica por medio de la irradiación con una

longitud de onda de 400 nm, permite realizar una determinación certera de los cambios en el tamaño de estructuras de entre ~100 y 300 nm.<sup>71</sup> En resumen, estos ensayos permiten conocer la velocidad inicial a la cual ocurre la reestructuración de las vesículas ante procesos de agregación, fusión o cualquier otro tipo de rearrreglo, teniendo en cuenta los cambios en la densidad óptica ocasionados por las estructuras que son formadas a lo largo del tiempo.<sup>72</sup>

**Tabla IV.4.1.** Parámetros calculados a partir de los experimentos de turbidimetría realizados con distintas concentraciones de MNP-OA agregadas a LUVs.

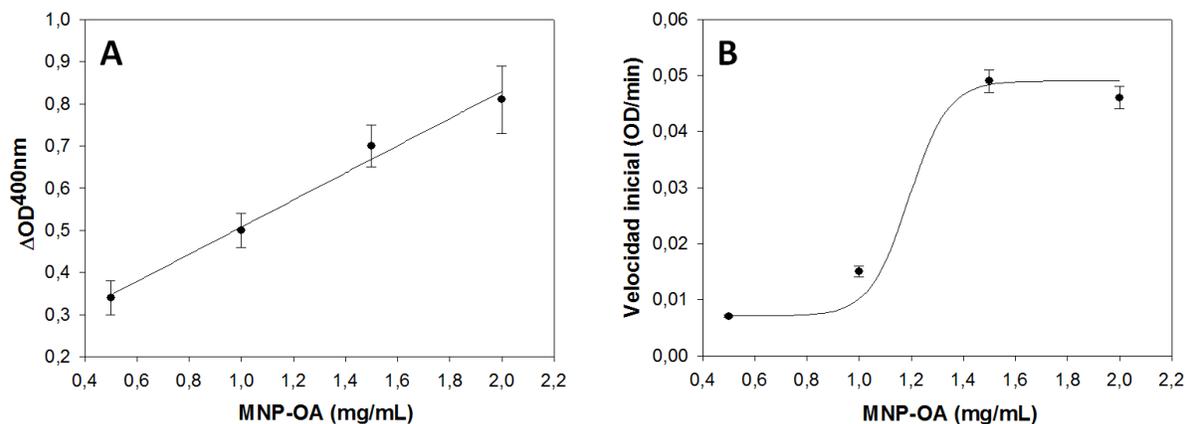
MNP-OA (mg/mL)	$X_{\text{MNP-OA}}$	$\Delta\text{OD}^{400\text{ nm}}$	Velocidad inicial (Abs/min)	$r^2$
2,0	0,0005	(0,81 $\pm$ 0,08)	(0,046 $\pm$ 0,002)	0,9960
1,5	0,0003	(0,70 $\pm$ 0,05)	(0,049 $\pm$ 0,002)	0,9958
1,0	0,0002	(0,50 $\pm$ 0,04)	(0,015 $\pm$ 0,001)	0,9968
0,5	0,0001	(0,34 $\pm$ 0,04)	(0,0070 $\pm$ 0,0002)	0,9988

El efecto sobre la estructuración de las vesículas ante el agregado de diferentes concentraciones de MNP-OA, se estudió midiendo la densidad óptica a 400 nm en función del tiempo a temperatura ambiente (20-24 °C). Tal como se describe en la **Tabla IV.4.1**, se obtuvieron mejores ajustes lineales para fracciones molares bajas de MNP-OA debido a la sensibilidad de esta técnica a la saturación de densidad óptica (aumento de opacidad) que las soluciones de nanopartículas de color pardo causan a las dispersiones de vesículas en medio acuoso. La velocidad inicial del proceso de agregación/fusión se obtuvo para cada muestra, de la región lineal de los perfiles de OD en función del tiempo. Estos experimentos fueron realizados por triplicado. En la **Figura IV.4.14** se muestran algunos de los perfiles de turbidimetría obtenidos para cada concentración de MNP-OA trabajada.



**Figura IV.4.14.** Perfiles de turbidimetría obtenidos luego de la adición de 5  $\mu\text{L}$  de MNP-OA en diferentes concentraciones: 0,5 mg/mL (A), 1,0 mg/mL (B), 1,5 mg/mL (C) y 2 mg/mL (D), a 250  $\mu\text{L}$  de LUVs. Un tiempo de  $\sim 10$  min de estabilización de las LUVs previo a la adición de las nanopartículas, fue permitido para corroborar la ausencia de incremento en la OD por defectos experimentales. Las velocidades iniciales fueron obtenidas de las pendientes de los segmentos lineales antes de alcanzar el inicio de las mesetas de saturación.

Los datos graficados en la **Figura IV.4.15A**, muestran una clara correlación lineal entre la concentración de nanopartículas que son agregadas a los liposomas y los cambios en la densidad óptica a través del tiempo ( $\Delta\text{OD}$ ), de lo cual se deduce que un incremento en la cantidad (concentración) de MNPs-OA agregadas al sistema de vesículas, da lugar a un incremento proporcional en la cantidad de estructuras aglomeradas o fusionadas formadas.



**Figura IV.4.15.** Tendencias calculadas para los ensayos de turbidimetría. **A)** tendencia lineal determinada para el volumen final de las estructuras vesiculares en función de la concentración de nanopartícula añadida al medio acuoso. **B)** perfil sigmoideal de la velocidad inicial con meseta alcanzada a una concentración de MNP-OA agregada a LUVs de 1,5 mg/mL.

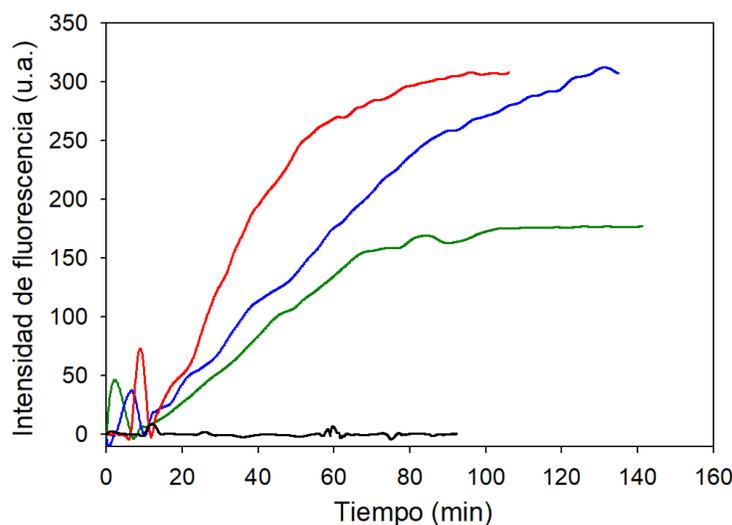
Los cálculos de velocidad inicial en función de la concentración de nanopartícula incorporada (**Figura IV.4.15 B**), permitieron observar una respuesta sigmoideal, alcanzando una meseta para las concentraciones más altas de MNP-OA agregadas (1,5 y 2 mg/mL correspondientes a las  $X_{MNP-OA}$  de 0,0003 y 0,0005 respectivamente) observándose un efecto de saturación. Una característica relevante que muestra esta tendencia se basa en el hecho de que entre concentraciones de MNP-OA de 1,0 ( $X_{MNP-OA} = 0,0002$ ) y 1,5 mg/mL ( $X_{MNP-OA} = 0,0003$ ), se identifica un umbral para la promoción del proceso de aglomeración/fusión. Al superar esta barrera, se obtuvo un aumento de 3,3 veces en la velocidad inicial entre estas dos concentraciones, en contraste con el cambio experimentado entre las concentraciones de nanopartículas de 0,5 ( $X_{MNP-OA} = 0,0001$ ) y 1,0 mg/mL ( $X_{MNP-OA} = 0,0002$ ), entre las cuales la velocidad inicial se ve incrementada en un factor de 2,1.

#### IV.4.2- Mezclado de contenidos internos de LUVs inducido por las MNP-OA

El mezclado de volúmenes internos de vesículas fusionadas, fue estudiado por el ensayo estándar de formación del complejo  $Tb^{3+}/DPA$ .<sup>36</sup> Para este ensayo se mezclaron iguales volúmenes de las poblaciones de vesículas conteniendo  $Tb^{3+}$  y DPA y se dejó estabilizar el sistema durante

un tiempo de 10 minutos. Posteriormente se añadió un volumen de 5  $\mu\text{L}$  de dispersión de MNP-OA. Se utilizaron diferentes concentraciones de nanopartícula en un rango de 0,5 a 2 mg/mL, de esta manera las MNP-OA, respecto de POPC quedaron con las fracciones molares  $X_{\text{MNP-OA}} = 0,0002$ ,  $X_{\text{MNP-OA}} = 0,0007$ , y  $X_{\text{MNP-OA}} = 0,0014$ .

Luego de la incorporación de las nanopartículas en diferentes cantidades, el sistema respondió inmediatamente con un incremento en la intensidad de fluorescencia. En la **Figura IV.4.16** se observa que la  $I_f$  aumenta progresivamente, lo que se atribuye al mezclado de contenidos internos que conduce a la formación del complejo Tb/DPA. Luego de un determinado período de tiempo se alcanzan valores constantes de  $I_f$  y el sistema alcanza un *plateau* que denota la saturación o completación del proceso.



**Figura IV.4.16.** Curvas de mezclado de contenidos internos de LUVs de POPC mediado por MNPs-OA y estudiado por medio de la formación del complejo fluorescente Tb/DPA a lo largo del tiempo. Gráficos correspondientes al mezclado inducido por la adición de diferentes fracciones molares de nanopartículas ( $X_{\text{MNP-OA}}$ ): 0,0002 (verde), 0,0007 (azul) y 0,0014 (rojo). La curva de control por adición de 5  $\mu\text{L}$  del solvente de las nanopartículas (THF) se muestra en negro.

A fin de descartar la posibilidad de que el solvente orgánico, que dispersa las nanopartículas (THF), tuviera algún efecto sobre la fusión de las vesículas y condujera al mezclado de contenidos

internos se evaluó su efecto en presencia de las vesículas lipídicas. El agregado de THF al sistema no produjo modificación en la  $I_f$  tal como se muestra en la curva correspondiente (**Figura IV.4.16**).

Cuando se comparan los perfiles de  $I_f$  obtenidos para las diferentes concentraciones de MNP-OA añadidas, se observa una tendencia similar a la obtenida por medio de otros ensayos presentados anteriormente. De manera general en la **Figura IV.4.16** puede observarse que con la menor cantidad de nanopartícula utilizada y tomando como 100% la  $I_f$  dada por el complejo Tb/DPA co-encapsulado, se obtiene un 31,6 %, en tanto que, con las dos concentraciones más altas utilizadas, el porcentaje de fusión resulta similar, 51,6 y 53,3%.

Posteriormente, se procedió a calcular los valores de las constantes de velocidad en cada experimento con el fin de establecer tendencias entre los resultados obtenidos. Las constantes de velocidad se obtuvieron ajustando los aumentos en  $I_f$ , a curvas exponenciales según la **Ecuación IV.4.4**.<sup>38</sup>

$$y = a + b e^{-kt} \quad (\text{IV.4.4})$$

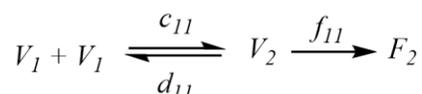
Donde  $a = I_f^0$ ,  $b = I_f^\infty - I_f^0$ ,  $k =$  constante de velocidad del proceso y  $t =$  tiempo. Respecto al perfil de fluorescencia obtenido con  $X_{\text{MNP-OA}} = 0,0007$  y  $X_{\text{MNP-OA}} = 0,0014$ , si bien el ~50% de fusión alcanzado es comparable, la velocidad a la cual ocurre el proceso, es mayor para la condición en donde se utilizó mayor cantidad de nanopartículas. Al comparar estas constantes de velocidad, es posible identificar un cambio abrupto en la respuesta del mezclado de contenidos internos que tiene lugar a bajas fracciones molares de MNP-OA, donde ambas constantes de velocidad son relativamente iguales ( $X_{\text{MNP-OA}} = 0,0002$  y  $0,0007$ ) con respecto una fracción molar de MNP-OA de  $0,0014$ , donde tiene lugar un aumento de 2 veces en dicho parámetro cinético (**Tabla IV.4.2**).

Cuando se compara la velocidad inicial obtenida a partir del ensayo de mezclado de contenidos internos con aquellas obtenidas a partir de turbidimetría (**Tablas IV.4.1-2**), se observa que el proceso de mezclado de contenidos es aproximadamente dos órdenes de magnitud más rápido que el proceso de agregación inicial de las vesículas lipídicas. Análogamente a lo observado en la cinética evaluada por turbidimetría, mayores concentraciones de MNP-OA son capaces de generar incrementos sucesivos en la velocidad inicial del mezclado de contenidos internos.

Vale aclarar que la comparación entre las velocidades iniciales obtenidas por técnicas de turbidimetría y aquellas obtenidas por fluorescencia, es válida. Esto se debe a que las mediciones

de las variaciones en magnitudes físicas cualesquiera (absorbancia, fluorescencia, etc.) a lo largo del tiempo, dan lugar a la obtención de parámetros cinéticos que se independizan del método de medición (**ver apéndice IIIA**).

Según lo establecido por diversos autores en relación con la cinética de la fusión de membranas y los mecanismos que involucra este proceso tal como fueron descritos en la sección **IV.1.1**,<sup>73,74</sup> el proceso de fusión consiste en dos etapas distintas, cinéticamente acopladas. Como se detalla en el esquema **IV.4.5**, el primer paso es la agregación de las vesículas, para simplificar, la formación de dímeros de tipo  $V_2$ , seguido por la formación de un doblete fusionado  $F_2$  como resultado de la fusión de vesículas final:



**Esquema IV.4.5.** Cinética del proceso de agregación/fusión.

La agregación es entonces un proceso de segundo orden, siendo su velocidad dependiente del cuadrado de las concentraciones iniciales de vesículas. En contraste, la fusión es un proceso de primer orden. Esto conduce a que, a bajas concentraciones de vesículas, la agregación es relativamente lenta mientras que la fusión ocurre sin mayores demoras. El caso inverso tendrá lugar si en cambio, se contemplan altas concentraciones de liposomas. Teniendo en cuenta las diferencias aquí observadas, es posible afirmar que en las concentraciones de LUVs ensayadas (44  $\mu\text{M}$ ) frente a las MNP-OA como fusógeno en concentraciones variadas, el proceso de agregación es indefectiblemente limitante (para  $X_{\text{MNP-OA}}$  comparables) del proceso de fusión global. Como puede verse en el esquema de la reacción de fusión, la fusión de las vesículas es un proceso irreversible, mientras que la agregación no lo es, y vesículas que se encuentren en la etapa de formación del dímero  $V_2$  pueden también desagregarse para volver a dar vesículas monómeros ( $V_1$ ). Siendo que la agregación podría ser la etapa limitante en la fusión de las vesículas promovida por las MNP-OA, el factor de la desagregación puede sumarse a las interpretaciones que surgen de la prevalencia de una población remanente con tamaños similares al de las vesículas iniciales (población I) observadas en experimentos de dispersión dinámica de luz (DLS).

En la **Tabla IV.4.2**, se muestran los porcentajes de fusión obtenidos, el tiempo para alcanzar la saturación del proceso, la velocidad inicial a la cual este ocurre y las constantes de velocidad calculadas.

Los datos hasta aquí obtenidos, permiten vislumbrar que tanto la extensión en la cual ocurre la fusión (porcentajes) como la velocidad con la que se lleva a cabo este evento, puede ser controlada con la cantidad de MNP-OA agregada al sistema.

**Tabla IV.4.2** Análisis obtenidos de las mediciones de fluorescencia en el transcurso del tiempo realizadas mediante el ensayo de Tb/DPA a 25 °C. Las constantes de velocidad se obtuvieron ajustando los aumentos en  $I_f$  en el tiempo a curvas exponenciales según la **Ecuación IV.4.4**, y las velocidades iniciales teniendo en cuenta la pendiente de la región lineal para cada curva de  $I_f$  en función del tiempo.

$X_{\text{MNP-OA}}$	Tiempo de saturación (min)	Velocidad inicial ( $I_f/\text{min}$ )	Constante de velocidad $k$ ( $s^{-1}$ )	Fusion (%)
0,0002	(68 ± 1)	(2,75 ± 0,01)	(12,6 ± 0,3) $\times 10^{-3}$	(31,6 ± 5,0)
0,0007	(128 ± 1)	(3,50 ± 0,02)	(15,0 ± 0,1) $\times 10^{-3}$	(51,6 ± 4,0)
0,0014	(92 ± 1)	(6,96 ± 0,04)	(31,0 ± 0,1) $\times 10^{-3}$	(53,3 ± 6,0)

Hasta donde es posible deducir, las MNP-OA tienen la capacidad de promover la agregación (aproximación) de las LUVs por interacción directa con la bicapa lipídica, promoviendo la formación de estructuras de mayor tamaño. Las primeras observaciones por DLS y turbidimetría, no permiten deducir si las vesículas se encuentran solamente agregadas, o en diferentes instancias del evento de fusión. El ensayo de mezclado de contenidos internos, corrobora la unificación del volumen interno de las vesículas, demostrando que las bicapas de vesículas opuestas son efectivamente fusionadas. Como fue observado, las mediciones cinéticas identifican una clara dependencia con la concentración de las nanopartículas. Teniendo en cuenta lo informado en la literatura, es muy factible que las MNP-OA sean capaces de facilitar el proceso de fusión por medio de diferentes mecanismos tales como la interdigitación de las cadenas de OA en la bicapa lipídica<sup>64</sup>, y/o por su internalización en estas últimas<sup>67</sup>. Las relaciones molares entre los agentes fusogénicos y los lípidos que componen las vesículas, son también uno de los muchos factores que

dictan el patrón de fusión y determinan si el sistema es capaz de lograr la ronda/s de fusión y alcanzar el estado de saturación posterior.<sup>60,61</sup> Habiendo encontrado una dependencia notoria en el proceso de fusión (extensión y velocidad en las que ocurre) con el cambio de las relaciones molares de  $X_{\text{MNP-OA}}$  que son enfrentadas a las vesículas lipídicas, es de esperarse que relaciones similares sean igualmente sostenidas en los eventos aquí estudiados respecto a lo informado en la literatura para otros fusógenos.<sup>6,75,76</sup>

En concordancia con ello, se han reportado determinadas concentraciones “*umbral*”, necesarias para inducir la formación de nuevas vesículas a partir de vesículas preexistentes.<sup>61</sup> Así, una fracción molar de 0,35 de oleato ( $X_{\text{OA}}$ ) es necesaria para inducir la acumulación e inserción de micelas de ácido oleico y perturbar las membranas de POPC, causando los cambios de curvatura y formación de regiones no-lamelares que constituyen los arreglos previos a la reproducción vesicular. Cullis et. al.<sup>50,51</sup>, determinaron que concentraciones equimolares de lípidos fusogénicos con respecto a los lípidos presentes en mezclas de eritrocitos reconstituidos (1:1 lípido fusógeno/fosfolípido), permiten la inducción de la fase hexagonal ( $H_{II}$ ) intermediaria en el proceso de fusión. En el marco de estas aseveraciones, la concentración efectiva de ácido oleico que es aportada al sistema de liposomas para la fusión mediada por MNPs-OA, es varios órdenes de magnitud menor a las proporciones implementadas en los sistemas de fusión de membranas mediada por OA como lípido en *bulk*. La concentración más alta de MNP-OA (0,06  $\mu\text{M}$ ) incorporada a las LUVs, aporta una concentración total de OA de  $\sim 9 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ , esto da una fracción molar ( $X_{\text{OA}}$ ) de 0,0002. Teniendo en cuenta que los controles realizados determinaron que la misma concentración de OA que la aportada por las nanopartículas no produjo alteraciones en los perfiles de DLS o FL, y que las MNP-OA producen la reestructuración de bicapas lipídicas con bajas concentraciones de OA, es posible dilucidar que el núcleo magnético de las nanopartículas podría estar cumpliendo un rol sinérgico con el ligando de funcionalización para llevar a cabo este proceso.

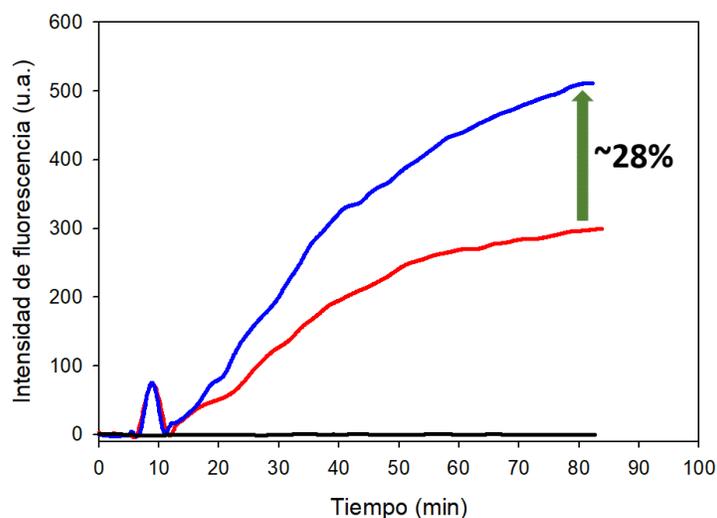
Otra forma de estudiar la dependencia que existe entre las cantidades de nanopartícula incorporada y el desempeño en la promoción de la fusión, es mediante el análisis de las fracciones de superficie que ofrecen las nanopartículas con respecto a la superficie total disponible en el sistema. En el **apéndice IA** se detallan los cálculos realizados acerca del número de entidades disponibles en el medio y las relaciones de áreas superficiales establecidas. Este análisis permite observar que para  $X_{\text{MNP-OA}}$  entre las cuales el sistema se satura en la fusión de las vesículas

disponibles ( $X_{\text{MNP-OA}} = 0,0007$  y  $0,0014$ ), las fracciones de superficie que las nanopartículas exponen con respecto a la superficie total ( $X_{\text{MNP-OA}}$ ) es  $\sim 0,5$ . Esto quiere decir que la relación entre la superficie que las MNP-OA aportan al sistema y las LUVs sobre las cuales se inducirá el proceso de fusión, responden a una relación próxima a 1:1.

#### **IV.4.3- Regulación del proceso de fusión por medio de campos magnéticos de potencial variable**

Luego de establecer que las MNP-OA pueden actuar como fusógenos y mediar la fusión de vesículas lipídicas, se procedió a medir el mezclado de contenidos internos de LUVs (por medio de la formación del complejo Tb/DPA) con aplicación de campos magnéticos de intensidad variable. MNP-OA en diferentes fracciones molares respecto del lípido, se añadieron a las poblaciones de vesículas conteniendo Tb y DPA y luego se aplicó al sistema un campo magnético constante, hasta alcanzar la saturación del proceso de fusión, o bien una rampa de campos magnéticos de intensidad variable.

A fin de comparar el efecto producido en la fusión de vesículas debido a la presencia de un campo magnético respecto a cuando no lo hay, se aplicó un campo de  $0,45$  mT (máximo valor logrado con nuestro arreglo experimental). En la **Figura IV.4.17** se comparan las curvas de  $I_f$  en función del tiempo de la emisión proveniente del complejo Tb/DPA, obtenidas en ausencia y en presencia de campo magnético frente al agregado de la misma cantidad de MNP-OA ( $X_{\text{MNP-OA}} = 0,0014$ ) a las vesículas lipídicas.



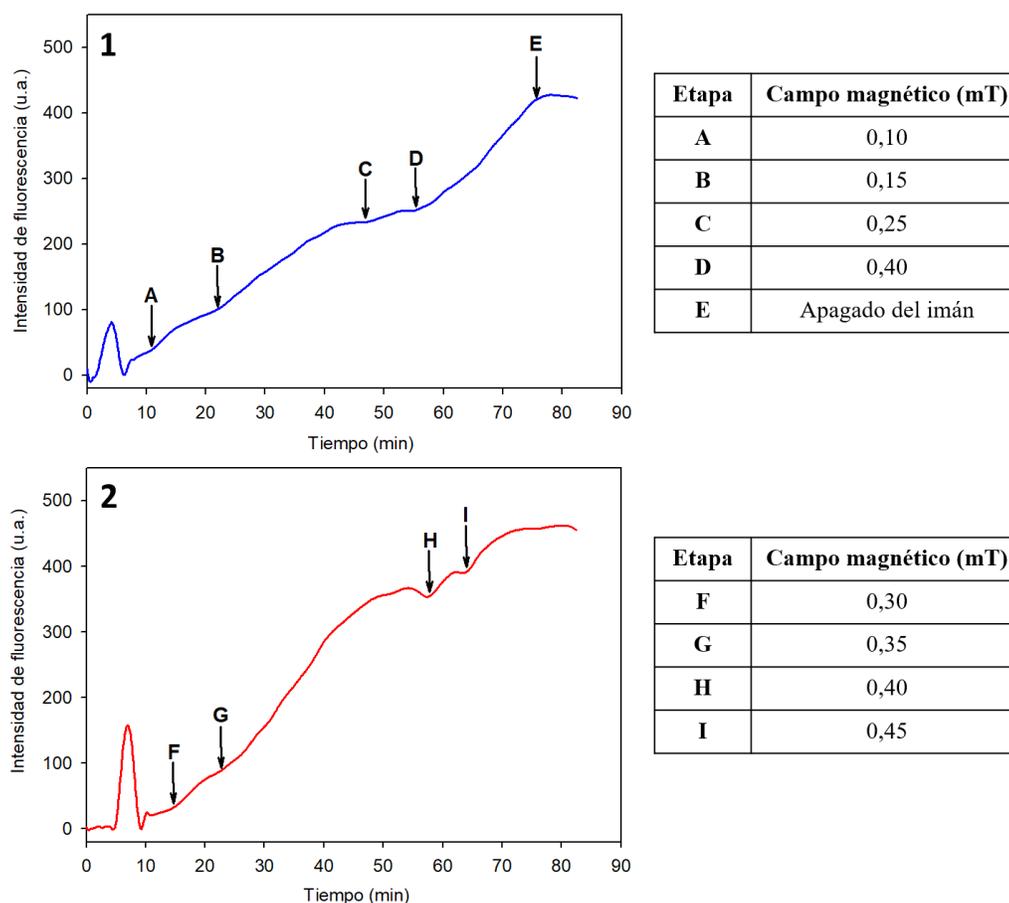
**Figura IV.4.17.** Comparación del desempeño en el mezclado de contenidos entre medios donde se añadieron las MNP-OA en ausencia (rojo) y bajo aplicación (azul) de campos magnéticos de intensidad variable. Ambas curvas corresponden a una  $X_{\text{MNP-OA}} = 0,0014$  respecto al lípido de las vesículas. El gráfico negro ( $I_f \sim 0$ ) corresponde al control realizado bajo aplicación de campo magnético en ausencia de nanopartícula para demostrar la respuesta negativa sobre la fusión de membranas, del ión paramagnético  $\text{Tb}^{3+}$  ante el estímulo externo.

Los datos obtenidos muestran que en presencia de un campo de 0,45 mT la extensión en la cual ocurre el proceso de fusión se incrementa en aproximadamente un 28%, alcanzándose un porcentaje de eficiencia en el proceso, de  $(81,6 \pm 10,0) \%$ . Además, se puede deducir de los perfiles obtenidos que existen variaciones relevantes en cuanto al comportamiento cinético de ambos experimentos. A partir de cálculos realizados por medio del ajuste según la función exponencial mencionada previamente (**Ec. IV.4.4**), se obtuvo que la constante de velocidad ( $k$ ) de mezclado de contenido para el medio manipulado magnéticamente alcanzó un valor de  $(38,0 \pm 0,8) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . Si bien este leve incremento en la velocidad del proceso global puede no representar una variación considerable a efectos de la aplicación del campo magnético, las diferencias son en cambio apreciables, al comparar las velocidades iniciales ( $v_0$ ) obtenidas en ausencia y presencia de del campo magnético en cuestión. Así, mientras que el valor de la  $v_0$  para la mezcla MNP-OA/LUVs ( $X_{\text{MNP-OA}} = 0,0014$ ) en ausencia de campo magnético, se determinó en  $(6,96 \pm 0,04) \text{ min}^{-1}$ , la misma mezcla en presencia de un campo magnético constante de 0,45 mT adquirió un valor de  $v_0$  de

$(11,44 \pm 0,05) \text{ min}^{-1}$ . En suma, la aplicación del campo magnético al sistema MNP-OA/LUVs, no sólo fue capaz de producir un notorio incremento en la extensión (porcentaje) del proceso de fusión, sino también un destacable incremento en un factor aproximado de 1,65 veces, en de la velocidad inicial del mismo.

Posteriormente, se evaluó el efecto de aplicar una rampa de campos magnéticos de intensidad creciente a medida que ocurre el proceso de fusión. En la **Figura IV.4.18** se observa el efecto de aplicar campos desde 0,10 a 0,40 mT a una población de vesículas en presencia de una  $X_{\text{MNP-OA}} = 0,0007$  respecto al lípido. En la curva puede observarse que luego de incrementar el campo se produce un incremento en el régimen de fusión. Lo mismo ocurre cuando campos magnéticos de similar magnitud, son aplicados a una mezcla LUVs/MNP-OA, a una fracción molar de MNP-OA mayor ( $X_{\text{MNP-OA}} = 0,0014$ ). Las alteraciones producidas en la intensidad de fluorescencia durante las etapas **D** en la curva **1**, y **H** e **I** en la curva **2**, denotaron una clara respuesta dinámica del sistema de MNP-OA en la modificación de las proporciones en las que se produce el proceso de fusión. Por otro lado, campos magnéticos de mayores magnitudes aplicados luego de la etapa **I** (curva **2**), no produjeron incrementos adicionales en la  $I_f$ . Este fenómeno puede asociarse con la saturación en el proceso de fusión, donde la completa fusión de las vesículas presentes en el sistema ha sido efectivamente promovida.

Otra característica interesante proviene de la etapa **E** en la curva **1**, donde el electroimán se apagó mientras se producía el mezclado de contenidos bajo un campo de 0,40 mT. Como se demostró anteriormente (**Figura IV.4.17**), el campo magnético aplicado en ausencia de MNP-OA, no produce incremento alguno en la  $I_f$  observada, es decir, no ocurre mezclado de contenidos internos por efecto del estímulo externo por sí solo. En consecuencia, la meseta visualizada en la  $I_f$  para la etapa **E** de la curva **1** ( $X_{\text{MNP-OA}} = 0,0007$ ) una vez que el imán es apagado, podría estar relacionada a una interrupción instantánea en el mezclado de contenidos internos que las nanopartículas son capaces de promover en presencia del campo magnético.



**Figura IV.4.18.** Respuesta dinámica de las MNP-OA durante los ensayos de mezclado de contenido Tb/DPA. Los porcentajes de mezclado de contenido se modificaron en distintas proporciones de acuerdo a los campos magnéticos aplicados en cada etapa (tabla a la izquierda). La desviación estándar de los valores de campo aplicados se corresponde con el valor mínimo de lectura, 0,01 mT. Las fracciones molares de nanopartícula ( $X_{\text{MNP-OA}}$ ) ensayadas fueron de 0,0007 y 0,0014 (curvas 1 y 2, respectivamente).

En comparación con nanopartículas hidrofílicas, que necesitan ser incluidas dentro del volumen interno de vesículas lipídicas, la integración directa de nanopartículas hidrofóbicas en el interior de la bicapa ha demostrado poseer mejores respuestas para su uso en ensayos biomédicos de diversa índole. Como fue discutido en secciones previas, esta marcada diferencia reside en el hecho de que las nanopartículas ubicadas en la bicapa lipídica son capaces de cumplir un rol activo en la interacción entre las vesículas y el medio externo, proporcionando control sobre las propiedades

de la membrana como densidad de empaquetamiento y transiciones de fase.<sup>28,34</sup> Grandes esfuerzos se han puesto en la optimización de plataformas de magnetoliposomas para mejorar el control sobre la velocidad de liberación de fármacos, las concentraciones en las cuales estos se liberan y su vectorización hacia sitios de acción. Investigaciones realizadas en torno a estos desafíos han permitido desarrollar gran cantidad de teorías sobre el efecto de la aplicación de campos magnéticos externos sobre vesículas lipídicas conteniendo nanopartículas magnéticas en el interior de la bicapa. La mayoría de los autores reportan fenómenos de calentamiento electromagnético o generación de ultrasonido por parte de las nanopartículas como algunas de las explicaciones más racionales a los efectos producidos por la aplicación de campos magnéticos.<sup>31,77,78</sup> Pese a ello, no se han propuesto mecanismos precisos que determinen la acción real de este estímulo externo.

La respuesta dinámica encontrada en el sistema de MNP-OA frente a las vesículas lipídicas, ante la aplicación de campos externos podría deberse o bien a fenómenos de mayor frecuencia de choque entre vesículas por acción del efecto magnético, a efectos térmicos, o bien a una sumatoria de mecanismos diferentes. Para conocer el factor que prevalece, sería necesario realizar más estudios. Sin embargo, los campos magnéticos empleados para alcanzar los porcentajes de fusión observados, corresponden aproximadamente al 5% de las intensidades de campo comúnmente empleadas en otros estudios para el desarrollo de aplicaciones biomédicas.<sup>31,34,79</sup> Asimismo, el aumento experimentado en los porcentajes de fusión ante la aplicación de campos magnéticos extremadamente bajos, no solo demuestra la alta sensibilidad de la plataforma aquí desarrollada, sino que también contribuye a corroborar el efecto sinérgico OA-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> del que previamente se hizo mención teniendo en cuenta las fracciones molares de nanopartícula utilizadas.

A diferencia de muchos estudios donde las partículas son inicialmente incorporadas en la membrana de los liposomas, la incorporación externa de las MNP-OA en la dispersión acuosa de los liposomas, implica un aumento en el número de barreras energéticas que deben ser superadas para promover la fusión de membranas. Esto es debido a que la internalización de las nanoestructuras en la bicapa, el cual representa el proceso inicial más probable para la acción fusogénica de las NPs, tiene su costo energético asociado.<sup>80</sup> La determinación de los procesos por los cuales los campos magnéticos son capaces de aumentar la efectividad de la fusión, tiene en cuenta también la acción de este estímulo sobre la nanopartícula como entidad aislada en un primer momento. Esta acción está comprendida dentro del proceso global de fusión que se encuentra beneficiado por la acción del estímulo externo, por lo que corroborar la localización de las MNP-

OA en la bicapa resulta un estudio crucial a los fines de poder determinar un mecanismo de fusión más certero.

#### IV.4.4- Medición de la permeabilidad de membranas.

La determinación de cambios en la permeabilidad de la bicapa de las vesículas modelo o LUVs, constituye un estudio necesario para comprender cuales son los diferentes eventos que ocurren en el proceso de fusión. Pérdidas nulas o leves desde el interior acuoso, son inherentes al mecanismo de la fusión de bicapas. Por el contrario, pérdidas significativas de volumen interno, podrían estar asociadas a importantes desestabilizaciones de las membranas lipídicas en presencia de las nanopartículas. Estas desestabilizaciones pueden conllevar a fenómenos de permeabilización excesiva o incluso ruptura de las bicapas. Procesos de agregación o hemifusión pueden ser erróneamente detectados como fusión completa si el complejo Tb/DPA es formado en el interior de vesículas con alta difusión entre sus membranas.

La modificación de la permeabilidad de las bicapas lipídicas ante la interacción con las MNP-OA fue estudiada de dos maneras, I) por liberación de la sonda fluorescente carboxifluoresceína (CF) a través de la bicapa las LUVs, y II) por liberación del complejo Tb/DPA co-encapsulado en las vesículas. Ambos ensayos fueron realizados empleando la fracción molar de nanopartícula más alta estudiada ( $X_{\text{MNP-OA}} = 0,0014$ ) con respecto al lípido, en la mezcla LUVs/MNP-OA.

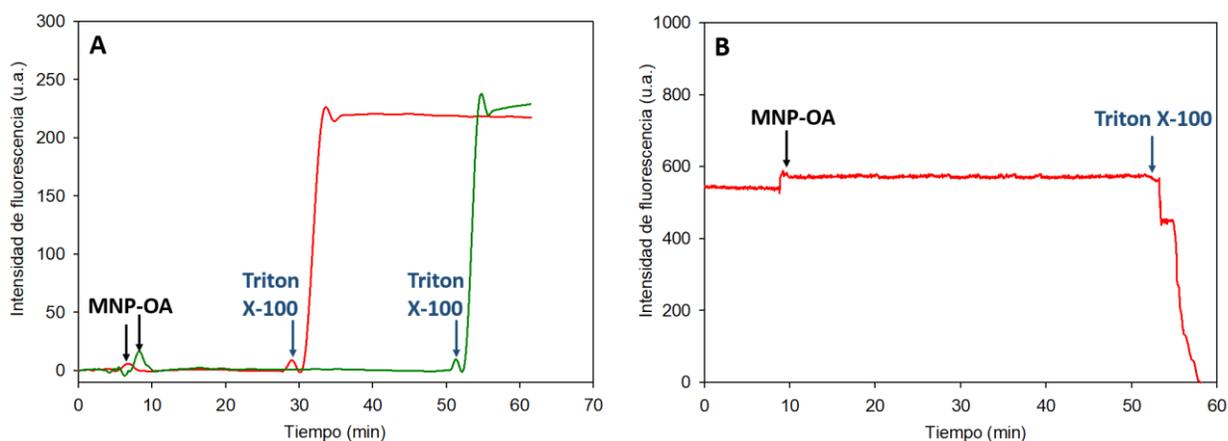
En primer lugar, se evaluó la salida de CF a través de la bicapa. En este caso, se realizaron mediciones en ausencia, y bajo aplicación de campos magnéticos (**Figura IV.4.19A**). Luego de ~8 minutos de estabilización de las vesículas puras conteniendo CF 20 mM, las MNP-OA fueron agregadas a las LUVs. En el primer caso (ausencia de campo), no se observó incremento alguno en la  $I_f$  luego de añadir las NPs, durante 30 min (máximo tiempo evaluado). La posterior adición de Tritón X-100 permitió observar un incremento efectivo de la  $I_f$  debido a la liberación de CF. Este experimento permitió conocer que durante la fusión de las vesículas inducida por las MNP-OA, no hay una pérdida significativa de contenido interno desde el interior de las LUVs por alteraciones en la permeabilidad de la bicapa.

En la segunda variante de este experimento, inmediatamente luego de la adición de las nanopartículas a las vesículas conteniendo CF, se comenzó a aplicar una rampa de potenciales que

generaron campos magnéticos a razón de 0,01 mT/min. Este programa de potenciales se configuró de manera tal que luego de 50 minutos de curso del experimento, se le aplicaran al sistema campos magnéticos en los cuales previamente se vio un efecto de fusión neto. De la **Figura IV.4.19A (curva verde)** se deduce que no hubo incrementos en la  $I_f$  a lo largo de todo el tiempo en el que fueron aplicados los potenciales en presencia de las MNPs-OA. Esto nos permite asumir que las nanopartículas tampoco inducen pérdida detectable de contenido interno, durante el proceso de fusión en presencia de campos magnéticos. El agregado final de surfactante Tritón X-100 rompe las vesículas liberando la CF que muestra la  $I_f$  acorde a su nueva concentración en bulk.

Posteriormente, se evaluó la variación en la  $I_f$  emitida por el complejo Tb/DPA co-encapsulado en las LUVs de acuerdo a la metodología detallada en la sección **IV.3.4.5**, en ausencia de campo magnético. Como se explicó anteriormente, las disminuciones en la  $I_f$  observadas durante la fusión mediada por las MNP-OA en el tiempo, indican la salida del complejo Tb/DPA desde las vesículas, hacia el medio externo. Como se observa en la **Figura IV.4.19B**, la intensidad de fluorescencia inicial (sin normalizar a cero en este caso) comenzó desde los valores señalados como  $I_f$  total, tal como fue demostrado por el promedio de los controles descritos en la sección **IV.3.4.5**, estimada aproximadamente en  $(6,0 \pm 0,3) \times 10^2$  u.a. Luego del agregado de las MNP-OA a las LUVs, la  $I_f$  se mantuvo constante a lo largo del tiempo transcurrido, sin experimentar disminución alguna promovida por la liberación del complejo fluorescente, al medio. Luego de un tiempo aproximado de 50 minutos, el surfactante Tritón X-100 fue añadido para producir la lisis de las vesículas, causando el posterior decaimiento de la  $I_f$  a cero, como se determinó para una dilución total del complejo en el bulk.

Como resultado de lo observado en estos experimentos, es posible aseverar que la fusión de vesículas mediada por MNP-OA transcurre efectivamente sin alteraciones significativas en la permeabilidad de las bicapas, al menos en las concentraciones trabajadas. Los ensayos realizados en torno a la liberación de CF, junto con el ensayo de Tb/DPA co-encapsulado, medidos en el tiempo, son concluyentes de que durante la fusión de membranas mediada por las MNP-OA como agentes fusogénicos, no se producen cambios significativos en la permeabilidad de las bicapas. Este resultado es relevante en el sentido de que no hay pérdida de los compuestos “carga” que son vehiculizados por los liposomas.



**Figura IV.4.19.** Medición de la permeabilidad de las membranas mediante diferentes estudios en mezclas MNP-OA/LUVs ( $X_{\text{MNP-OA}} = 0,0014$ ). **A-** Ensayo de liberación la sonda CF desde las vesículas lipídicas, en ausencia (curva roja) y bajo aplicación (curva verde) de campos magnéticos de 0,01 a 0,5 mT. **B-** Ensayo de liberación del complejo fluorescente Tb/DPA co-encapsulado en las LUVs. Las instancias de agregado de MNP-OA y el surfactante de lisis de las vesículas, Tritón X-100 se encuentran diferenciadas en negro y azul, respectivamente.

#### IV.4.5- Localización de las MNP-OA en bicapas lipídicas

Los estudios realizados hasta aquí han podido confirmar la promoción efectiva del proceso de fusión mediado por las MNP-OA y la ausencia de grandes cambios en la permeabilidad de la bicapa durante su transcurso. Sin embargo, la localización de las nanopartículas en la bicapa representa uno de los interrogantes a resolver, necesario para esclarecer el escenario completo de su modo de acción. Como se estableció en secciones previas, una de las hipótesis principales radica en la presencia de una primera etapa de interacción entre las MNP-OA y las bicapas lipídicas de las LUVs. Esta primera interacción transcurriría con el anclaje e inserción de las nanopartículas a la bicapa por medio de los ligandos OA ubicados en la superficie del núcleo magnético, el cual se ha demostrado, interviene de manera activa (sinérgica) en las diferentes instancias del proceso de fusión. La etapa inicial de incorporación del fusógeno al interior de la bicapa, ha sido definida por muchos autores como un proceso de fusión *per se* entre el nanomaterial diseñado y las vesículas

lipídicas, que constituye una instancia determinante para luego dar lugar al proceso de fusión de membranas opuestas.<sup>80-83</sup> Alexander-Katz et. al.<sup>82</sup> han reportado un mecanismo tipo “*snorkel*” para la penetración de nanopartículas hidrofóbicas. Estos autores proponen que los ligandos de funcionalización son capaces de adquirir cierta flexibilidad, promoviendo la generación de defectos de membrana, disrupción y posterior inserción de las nanopartículas en la bicapa, de manera similar a las reestructuraciones establecidas en los mecanismos más convencionales, propuestos para la de fusión de vesículas. Tanto en este estudio como en otros realizados por otros grupos de investigación,<sup>81,83</sup> la penetración de moléculas en la bicapa ha sido atribuida al efecto hidrofóbico que estructuras de tamaños entre ~5 y 10 nm, son capaces de promover.

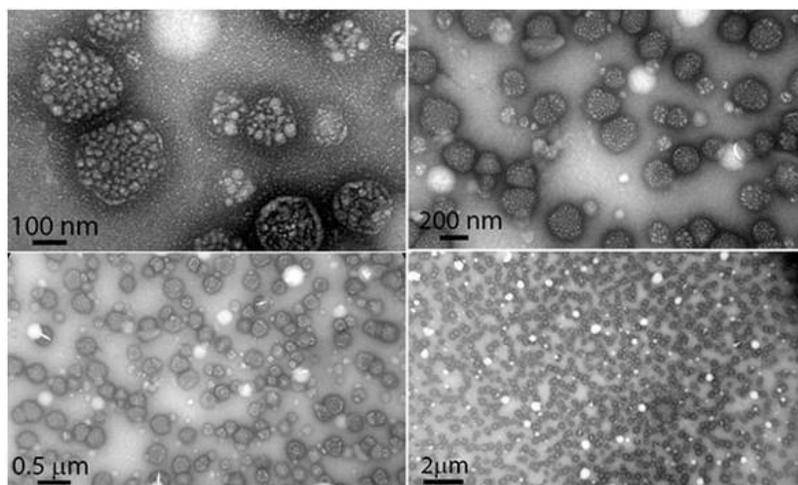
Previamente (**sección IV.4.1**) se consideró que nanopartículas con diámetros mayores que el espesor de la bicapa pueden dar lugar a fenómenos de desajuste o *mismatching* hidrofóbico.<sup>68</sup> En concordancia con esta observación, Von White et. al.<sup>83</sup>, determinaron que nanopartículas hidrofóbicas con diámetros mayores que el espesor de las bicapas, y en altas fracciones molares respecto del lípido total, son capaces de insertarse en membrana de vesículas unilamelares mediante un fenómeno de desajuste hidrofóbico positivo. Este desajuste produce una fluidización de la bicapa lipídica que da origen a fuerzas de capilaridad lateral que están mediadas por las cadenas lipídicas de la bicapa, e intervienen en la aglomeración de las partículas en la membrana, de manera espontánea.<sup>83</sup> En estudios reportados por otros autores,<sup>31</sup> nanopartículas hidrofóbicas de menores tamaños (~5 nm) recubiertas con ácido oleico como ligando estabilizante e internalizadas en vesículas lipídicas, han sido capaces de conferir un incremento en las temperaturas de fusión de los lípidos de bicapa. Esta respuesta da lugar a un incremento en el ordenamiento de la bicapa y, en consecuencia, una estabilización considerable contra la liberación de contenido interno o *leakage* espontáneo.

Adicionalmente, el establecimiento de gradientes como la depleción de moléculas de agua de la región intermembrana o fuerzas de carácter hidrofóbico, dan lugar a un incremento de la interacción nanopartícula-bicapa con cambios consecuentes en las propiedades de la bicapa tales como la densidad de empaquetamiento, la fluidez y las transiciones de fase. Este estado de inserción dinámico, e idealmente no-disruptivo del fusógeno en la membrana lipídica, prosigue luego con la internalización y estabilización de la nanopartícula en la bicapa. En consecuencia, estos nuevos “umbrales” energéticos que aparecen al considerar la composición de ligando de superficie y tamaño de la nanopartícula como factores fundamentales para la internalización de las

NPs en la bicapa (entre otros), deben ser tenidos en cuenta para determinar la factibilidad de esta primera etapa determinante en la fusión de membranas. En el caso de las MNP-OA, tanto el ligando hidrofóbico ácido oleico, como el tamaño promedio de las nanoestructuras (~10 nm), dan lugar a considerar la incorporación en la bicapa de las LUVs como un proceso probable dentro de su desempeño en actividad fusogénica.

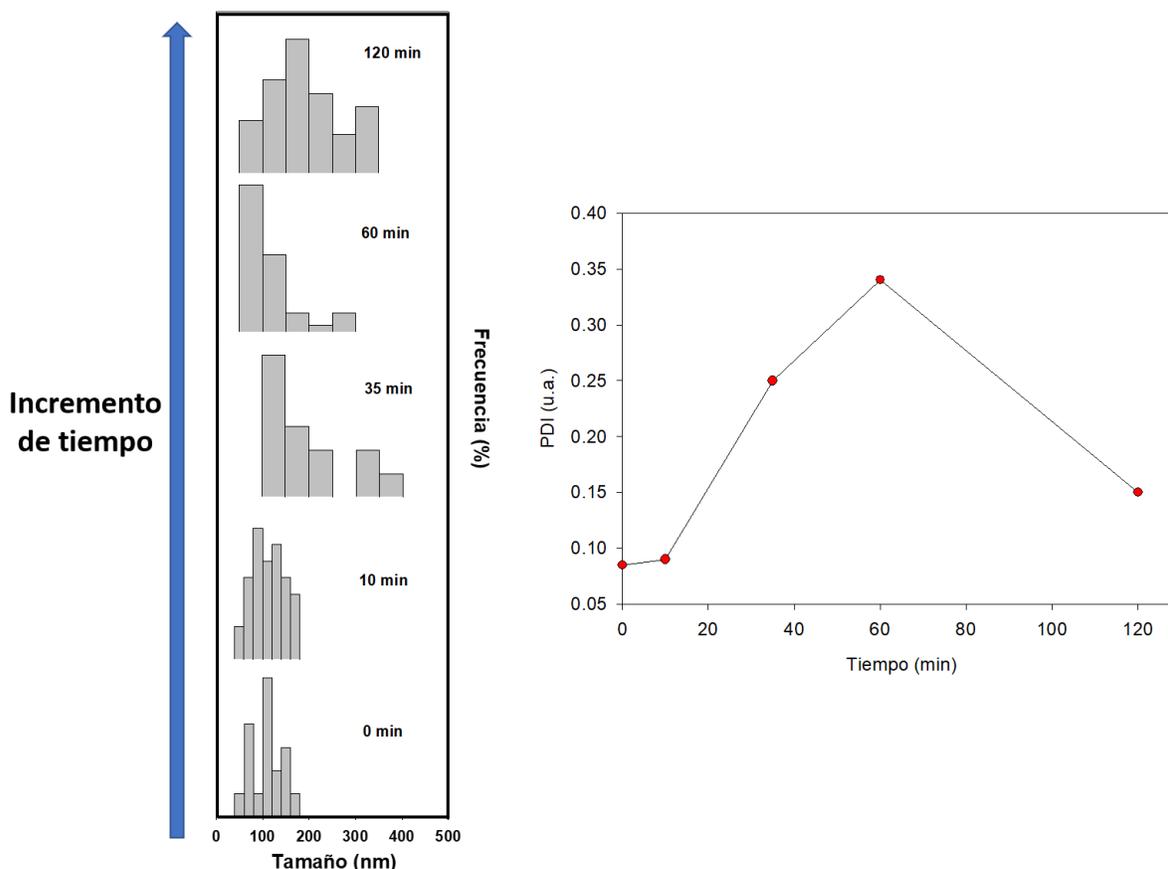
Teniendo en cuenta estas observaciones, se procedió a realizar estudios de microscopía con el objetivo de determinar la localización de las MNP-OA en las bicapas lipídicas y su efecto en la estructura de los liposomas. Ensayos de microscopía de transmisión electrónica (TEM) fueron primeramente realizados por medio de la incubación de MNP-OA en presencia de las vesículas de POPC ( $X_{\text{MNP-OA}} = 0,0014$ ) durante 1 h. Como se muestra en la **Figura IV.4.20**, las MNP-OA parecen ubicarse en las LUVs, respetando la forma esférica de las vesículas y cubriéndolas en toda la superficie disponible. Empleando las mismas cantidades de MNP-OA, se realizaron experimentos de TEM en donde se evaluó la morfología de las vesículas a diferentes tiempos de incubación con las MNP-OA. De las imágenes obtenidas en este ensayo se calcularon los diámetros promedio e índices de polidispersidad.

Los cálculos del índice de polidispersidad (PDI) basados en el histograma adquirido para las muestras incubadas MNP-OA/LUVs a diferentes tiempos, mostraron una buena correlación con los datos de dispersión de luz dinámica (DLS) obtenidos anteriormente. Salvando las diferencias experimentales con la técnica de DLS en relación a la desviación de diámetros por consideración del radio hidrodinámico; TEM registró un aumento notorio en el índice de PDI dentro de un intervalo de tiempo similar de 35 minutos. Dicho incremento podría atribuirse a la aparición de la segunda población de vesículas cuya formación es consistente con lo observado por DLS, dentro de este intervalo de tiempos (**Figura IV.4.21**).



**Figura IV.4.20.** Imágenes de TEM de las MNP-OA incubadas con LUVs de POPC durante 1 h en diferentes magnificaciones y campos de observación. Las imágenes muestran a las nanopartículas magnéticas respetando la morfología de las vesículas.

Si bien DLS tiene una ponderación en volumen mucho más grande respecto al número de vesículas consideradas para la determinación de diámetros promedio, es posible validar con las mediciones cinéticas de TEM, tendencias similares en cuanto al proceso efectivo de reestructuración de vesículas que tiene lugar dentro de un intervalo aproximado de tiempo, de 35-40 min de transcurrida la interacción entre las MNP-OA y las vesículas lipídicas. Sin embargo, nuestro principal hallazgo aquí es, sin duda, la interacción e inserción de las nanopartículas en la bicapa lipídica de las LUVs.



**Figura IV.4.21.** Perfiles de variación en los diámetros promedio obtenidos de imágenes de TEM de vesículas de POPC, realizados para la mezcla MNP-OA/LUVs ( $X_{\text{MNP-OA}} = 0,0014$ ) a lo largo del tiempo (izquierda). Índices de polidispersidad (PDI) calculados para las variaciones de tamaños observados en las LUVs (derecha).

Por ello, con el objetivo de corroborar la integración efectiva de las MNP-OA a la membrana lipídica y si estas últimas son afectadas en alguna medida (permeabilidad, morfología, etc.) como resultado de este fenómeno, se procedió a realizar mediciones con microscopía confocal.

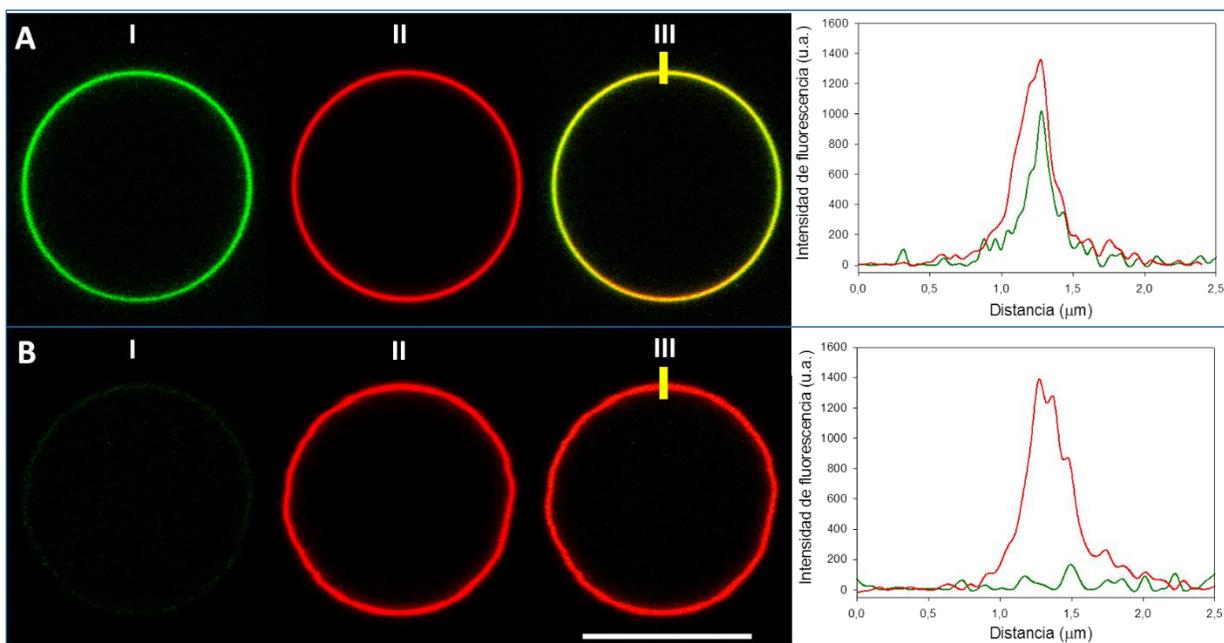
Como se especificó en las secciones **IV.3.4.9-10**, los experimentos de microscopía confocal fueron realizados empleando vesículas unilamelares gigantes (GUVs) como modelos de membrana. Un volumen de nanopartícula marcada con sonda fluorescente (MNP-OA/NBD-PE, canal verde) fue incubado durante 20 minutos con las vesículas gigantes marcadas con sonda de membrana (GUVs/Bodipy-TR-Ceramida, canal rojo) en relaciones lípido/nanopartículas similares

a las utilizadas en experimentos con LUVs. Muestras y controles necesarios fueron posteriormente analizadas bajo el microscopio confocal, por medio de una co-localización de sondas en los canales diferenciados.

En la **Figura IV.4.22A**, se muestra la fluorescencia generada por las MNP-OA/NBD-PE (canal verde) luego de su incubación con las vesículas unilamelares gigantes (GUVs) marcadas con Bodipy-TR ceramida (canal rojo) como marcador de membrana. En **B (Fig. IV.4.22)**, se visualiza el control realizado por medio de la incubación de un volumen del sobrenadante obtenido en el proceso de marcación de las NPs con las GUVs. Como se especificó anteriormente, este control tiene la finalidad de determinar dos cuestiones fundamentales. Por un lado, que toda la fluorescencia asignada a las MNP-OA/NBD-PE, proviene únicamente de las mismas y no de sonda fluorescente (NBD-PE 16:0) libre. Por otra parte, si bien es probable que una parte de la sonda NBD-PE permanezca libre en el medio, es importante determinar de la manera más certera posible que toda la fluorescencia resultante al co-localizar las sondas fluorescentes (presentes en NPs y GUVs), se deban a la presencia de MNP-OA/NBD-PE en interacción con la bicapa lipídica. Esto permite realizar una cuantificación precisa de las cantidades relativas de MNP-OA que son capaces de unirse a la bicapa de las vesículas, por medio del factor de normalización según la **ecuación IV.3.3**. Entonces, teniendo en cuenta la  $I_f$  emitida por cada canal en una misma sección transversal de las bicapas, es posible determinar cuantitativamente la cantidad relativa de nanopartícula que se encuentra unida a la membrana de las GUVs.

Seguidamente, al analizar las imágenes obtenidas por microscopía confocal de los experimentos mencionados, se observó una co-localización absoluta de los canales rojo y verde para las MNP-OA/NBD-PE incubadas con GUVs ( $N = (0,64 \pm 0,09)$  u.a.) (**Figura IV.4.22A**). El control para la validación de la señal proveniente de las nanopartículas en la membrana, fue realizado sometiendo un volumen de MNPs-OA al mismo proceso de marcación usual y suspendiéndolas luego en una mezcla THF/H<sub>2</sub>O 50:50 luego de los lavados en etanol en lugar de THF puro. Los procesos posteriores de separación de fases junto con la decantación magnética asistida por un imán convencional, facilitaron la precipitación de las nanopartículas marcadas. Luego, se extrajo un volumen de 5  $\mu$ L de este sobrenadante que podría contener restos de NBD-PE 16:0, que pudo haberse liberado desde las MNP-OA (o no haberse unido a ellas), y se incubó de igual manera en presencia de las vesículas lipídicas. Como se observa en la **Figura IV.4.22B**, el ensayo en presencia de sobrenadante demostró ausencia de emisión fluorescente en el canal verde asociado

a la sonda NBD-PE, y la co-localización de canales muestra únicamente emisión fluorescente roja debido al marcador de membrana ( $N = (0,04 \pm 0,01)$  u.a.). Los ensayos realizados en microscopía de fluorescencia confocal permiten entonces confirmar que las MNP-OA se encuentran efectivamente presentes en la membrana lipídica, con un valor de normalización ( $N$ ) de  $(0,6 \pm 0,1)$  u.a. obtenido para la emisión total de fluorescencia proveniente de la interacción nanopartícula-membrana.



**Figura IV.4.22.** Imágenes de microscopía confocal de **(A)** GUVs incubadas con MNP-OA/NBD-PE y **(B)** control realizado incubando un volumen del sobrenadante obtenido luego del proceso de marcación de las NPs, con GUVs. La diferenciación de los canales de izquierda a derecha para los paneles A y B está definida como sigue: MNP-OA/NBD-PE (verde, **I**), marcador de membrana Bodipy-ceramida (rojo, **II**), y co-localización de las sondas (superposición de canales **I** y **II**; **III**). La cuantificación de sonda fluorescente realizada a lo largo de la sección transversal de la membrana, denotada por la línea amarilla correspondiente en **III**, se graficó a la derecha de los paneles correspondientes **A** y **B**. La barra de escala corresponde a  $10 \mu\text{m}$ .

## IV.5- CONCLUSIÓN

En este estudio se demostró el potencial de las nanopartículas magnéticas funcionalizadas con ácido oleico (MNP-OA) para promover la fusión de vesículas lipídicas. Los diferentes ensayos realizados permitieron determinar cada una de las variables responsables del desempeño de las MNP-OA en el evento de fusión y adquirir conocimientos acerca de posibles mecanismos de interacción nanopartícula/bicapa necesarios para llevar a cabo este proceso. Tanto en los experimentos de cinética y crecimiento de las vesículas lipídicas en el tiempo, como en los ensayos de mezclado de contenido interno, se observó una dependencia entre las cantidades de nanopartícula empleadas y la eficiencia en el proceso de fusión de bicapas. Estudios realizados por diversos grupos de investigación empleando lípidos de diverso largo de cadena y grado de insaturación (ácido oleico entre ellos), han puesto especial énfasis en la relación existente entre las fracciones molares lípido de bicapa/lípido fusogénico y la factibilidad alcanzar los reordenamientos lipídicos del sistema de bicapas desde una fase L a una fase H<sub>II</sub>. Sin embargo, la gran mayoría establece que fracciones molares cercanas a la proporción 1:1 fusógeno: lípido de bicapa, son necesarias para atravesar las diferentes barreras energéticas y promover estos cambios. Por el contrario, los estudios aquí realizados demostraron que fracciones molares de fusógeno ( $X_{\text{MNP-OA}}$ ) de entre 0,0002 y 0,0014 son capaces de promover la aproximación y el mezclado de contenidos internos de vesículas lipídicas, en diferentes proporciones. Adicionalmente, el rango utilizado de fracciones molares de nanopartícula para inducir la fusión de membranas, se corresponde con fracciones molares de MNP-OA ensayadas en monocapas mixtas con lípidos puros en estudios previos realizados por el presente grupo de investigación.<sup>84</sup> En los mismos, monocapas obtenidas para una mezcla MNP-OA/POPC en  $X_{\text{MNP-OA}} = 0,0003$ , evidenciaron un comportamiento de expansión del film experimental con respecto al film ideal. Este fenómeno se condice con un comportamiento de fluidización o incremento en la elasticidad del film lipídico en presencia de las MNP-OA y representa además una de las configuraciones ampliamente reportadas como requisito para que un dado compuesto actúe como agente fusogénico en la fusión de bicapas. Desde este punto de vista, la inserción de las nanopartículas en la bicapa en las concentraciones reportadas, tiene como consecuencia la disminución en la densidad de empaquetamiento de las moléculas de POPC que la constituyen. Acorde a los mecanismos para la inducción del mezclado

de bicapas; la expansión del film observada en monocapas, podría fácilmente correlacionarse con el “*imput*” de generación de defectos o perturbaciones en la bicapa, para dar lugar a la fusión.

Las bajas concentraciones de MNP-OA necesarias para inducir fusión, no constituyeron el único parámetro para dar lugar a la interpretación de una sinergia entre el ácido oleico (potencial fusógeno) y el núcleo magnético. Los ensayos de regulación del mezclado de contenidos internos mediante campos magnéticos variables, demostraron que campos magnéticos del orden de los mT (~5% de los campos empleados en plataformas reportadas como útiles en nanomedicina<sup>28,31,78</sup>), son capaces modificar dinámicamente, la actividad fusogénica de las MNP-OA. Las nanopartículas en cuestión, evidenciaron una rápida respuesta al estímulo externo durante la aplicación de campos magnéticos crecientes en el tiempo, y un incremento notorio en los porcentajes de fusión finales luego de la aplicación de un campo continuo de ~0,5 mT.

Los estudios realizados a través de la liberación de carboxifluoresceína (CF) y el complejo Tb/DPA desde el interior de las vesículas hacia el medio externo, permitieron principalmente determinar la ausencia de cambios en la permeabilidad de las bicapas como resultado de la incorporación de las MNP-OA a las vesículas lipídicas. Adicionalmente, dada la sensibilidad y reproducibilidad del sistema MNP-OA/LUVs ante los estos ensayos de *leakage* realizados, fue posible validar la extensión del proceso de fusión en los porcentajes de mezclado de contenido obtenidos en los ensayos de formación de complejo Tb/DPA.

Si bien los mecanismos de fusión precisos continúan sin ser determinados en su totalidad, las mediciones acerca de los cambios morfológicos en el sistema permitieron entablar importantes relaciones acerca de las etapas existentes en la interacción MNP-OA/bicapa. A través de los datos adquiridos en DLS, se determinó que cambios estructurales que conllevan a la formación de una segunda población de vesículas, tienen lugar a tiempos aproximados de 40 min. Si bien este tiempo marca el inicio medible de los procesos de reestructuración de bicapas para dar lugar a la fusión, se adquirió información acerca de procesos previos que ocurren a tiempos cortos y resultan fundamentales para la promoción de la fusión por parte de las MNP-OA. A partir de las modificaciones observadas en el entorno iónico de las vesículas a lo largo del tiempo (potencial Z), se dedujo que importantes interacciones entre las nanopartículas y las LUVs, son generadas desde la adición del fusógeno al medio. Dichas interacciones se corresponderían con procesos incorporación de las nanopartículas magnéticas en el interior o en la periferia de la bicapa lipídica y comprenden etapas determinantes en la promoción del evento de fusión. La proporción en la que

la incorporación de nanopartículas con diámetros mayores que el espesor de las bicapas lipídicas es capaz de ser promovida, dependerá de una multiplicidad de factores. Por ello, la determinación de los mecanismos de internalización probables implica considerar tanto las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas como las interacciones predominantes en la nanobiointerfase LUVs/MNP-OA. Si bien lograr una determinación precisa acerca de las vías de incorporación de las nanopartículas a las bicapas requerirá estudios más profundos, mediciones a través de técnicas de microscopía diversas, permitieron corroborar que las MNP-OA son capaces de entablar una interacción efectiva con las membranas lipídicas.

Ensayos realizados por TEM confirmaron la presencia de las MNP-OA en la superficie de las LUVs y procesos de reestructuración de las bicapas a tiempos intermedios, fundamentados en los valores calculados de los índices de polidispersidad (PDI) a partir de mediciones en el tiempo. Con el fin de confirmar esta posible interacción de las MNP-OA con la membrana lipídica, se llevaron a cabo estudios en microscopía confocal por medio del marcado fluorescente de las nanopartículas y su incubación a tiempos cortos, con vesículas unilamelares gigantes (GUVs) obtenidas por el método de electroformación. Las observaciones realizadas por medio de la co-localización de canales permitieron identificar un fenómeno de internalización efectiva de las MNP-OA en la bicapa de las vesículas.

Habiendo determinado la localización de las nanopartículas y teniendo en cuenta los procesos observados a través de todas las técnicas empleadas para la determinación de la fusión mediada por las nanopartículas hidrofóbicas, es posible proponer un mecanismo para la acción fusogénica del sistema bajo estudio. En una primera instancia las MNP-OA parecieran interaccionar activamente con las vesículas, llevando a cabo un proceso de anclaje e internalización en la bicapa lipídica. Esta primera etapa, puede definirse como el primer proceso formal de fusión en el cual las nanopartículas son capaces de atravesar la primer barrera de energía del sistema, asociada a la solvatación de las mismas en el dominio hidrofóbico interno de las membranas lipídicas de manera total o parcial.<sup>80</sup> Debido al diámetro que presentan las MNP-OA (~10,7 nm), una internalización parcial puede ser quizás la explicación más racional. Sumado a ello, es probable que las cadenas de OA sean capaces de interactuar con las cadenas lipídicas de los fosfolípidos de membrana de manera tal que las MNP-OA intervienen de más de una forma durante su desempeño en el proceso de fusión. Por un lado, permiten la generación de defectos y fluidización de las membranas necesarias para dar lugar a los arreglos subsiguientes característicos de la fusión. Por el otro, el

incremento en el número de dominios hidrocarbonados en la región intermembrana, cataliza en cierta forma la aproximación de membranas opuestas por medio de gradientes de depleción de moléculas de agua (efecto hidrofóbico). Cualquiera sea la interacción predominante, el hecho de que la aplicación de campos externos sea capaz de promover los cambios dinámicos observados en el proceso de fusión, da a entender también que las MNP-OA son capaces de modificar la estructura y las propiedades de las membranas lipídicas. Comportamientos de ésta índole, han sido reportados como característicos de estructuras donde las nanopartículas se encuentran formando parte de las vesículas lipídicas.<sup>31,34</sup> De igual manera, la saturación en la fusión observada al incrementar las concentraciones de fusógeno añadido, puede estar relacionada con una saturación en la internalización o anclaje de las nanopartículas a las vesículas para promover los procesos en cuestión. Dadas las diferencias obtenidas en cuanto a las velocidades iniciales determinadas para los procesos de agregación y mezclado de contenidos internos, es probable que en las concentraciones de vesícula lipídica trabajadas, el proceso de agregación o acercamiento de vesículas opuestas sea el limitante de la velocidad y promoción del proceso de fusión mediado por MNP-OA en el caso aquí estudiado.

Tanto la internalización de las nanopartículas a la bicapa como el proceso de contacto de vesículas opuestas subsiguiente, pueden estar mediados por fenómenos de interdigitación de cadenas lipídicas OA/bicapa. De esta forma, las MNP-OA son capaces de generar los defectos estructurales o frustraciones topológicas necesarias para dar lugar a la transición de fases  $L \rightarrow H_{II}$ . Posteriormente, la unión de ambas bicapas es efectivamente promovida junto con el mezclado de contenidos vesiculares, que transcurre sin pérdidas detectables de volúmenes internos.

Si bien existen aún una gran variedad de factores a explorar a nivel mecanístico, es posible concluir que las nanopartículas magnéticas hidrofóbicas aquí estudiadas, representan un potencial sistema altamente sensible y de respuesta controlada para la inducción de procesos de fusión de membranas. El fácil y rápido control en las proporciones en las que se produce la fusión mediada por las MNP-OA las convierte en una plataforma novedosa con un gran potencial en aplicaciones biomédicas y biotecnológicas.

## IV.6- REFERENCIAS

- (1) Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and P. W. *Molecular Biology of the Cell*; Garland Science: New York, USA., 2002.
- (2) White, J. M. Membrane Fusion. *Science*. **1992**, 258, 917–924.
- (3) Marsden, H. R.; Tomatsu, I.; Kros, A.; Marsden, H. R. Model Systems for Membrane Fusion. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 1572–1585.
- (4) Chernomordik, L. V.; Kozlov, M. M. Mechanics of Membrane Fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, 15 (7), 675–683.
- (5) Cevc, G.; Richardsen, H. Lipid Vesicles and Membrane Fusion. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, 38, 207–232.
- (6) Mondal Roy, S.; Sarkar, M. Membrane Fusion Induced by Small Molecules and Ions. *J. Lipids* **2011**, 2011, 1–14.
- (7) Verwey, E. J. W. Theory of the Stability of Lyophobic Colloids. *J. Phys. Colloid Chem.* **1947**, 51 (3), 631–636.
- (8) Cevc, G. How Membrane Chain Melting Properties Are Regulated by the Polar Surface of the Lipid Bilayer. *Biochemistry* **1987**, 26 (20), 6305–6310.
- (9) Burgess, S. W.; McIntosh, T. J.; Lentz, B. R. Modulation of Poly(Ethylene Glycol)-Induced Fusion by Membrane Hydration: Importance of Interbilayer Separation. *Biochemistry* **1992**, 31 (10), 2653–2661.
- (10) Tian, Z.; Gong, J.; Crowe, M.; Lei, M.; Li, D.; Ji, B.; Diao, J. Biochemical Studies of Membrane Fusion at the Single-Particle Level. *Prog. Lipid Res.* **2019**, 73 (January), 92–100.
- (11) Ungermann, C.; Kümmel, D. Structure of Membrane Tethers and Their Role in Fusion. *Traffic* **2019**, 20 (7), 479–490.
- (12) Brukman, N. G.; Uygur, B.; Podbilewicz, B.; Chernomordik, L. V. How Cells Fuse. *J. Cell Biol.* **2019**, 218 (5), 1436–1451.

- (13) Pattni, B. S.; Chupin, V. V.; Torchilin, V. P. New Developments in Liposomal Drug Delivery. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (19), 10938–10966.
- (14) Rideau, E.; Dimova, R.; Schwille, P.; Wurm, F. R.; Landfester, K. Liposomes and Polymersomes: A Comparative Review towards Cell Mimicking. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47* (23), 8572–8610.
- (15) Bhattacharya, A.; Devaraj, N. K. Tailoring the Shape and Size of Artificial Cells. *ACS Nano* **2019**, *13* (7), 7396–7401.
- (16) Deng, W.; Chen, W.; Clement, S.; Guller, A.; Zhao, Z.; Engel, A.; Goldys, E. M. Controlled Gene and Drug Release from a Liposomal Delivery Platform Triggered by X-Ray Radiation. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 1–11.
- (17) Sang, W.; Zhang, Z.; Dai, Y.; Chen, X. Recent Advances in Nanomaterial-Based Synergistic Combination Cancer Immunotherapy. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48* (14), 3771–3810.
- (18) Peralta, M. F.; Guzmán, M. L.; Pérez, A. P.; Apezteguia, G. A.; Fórmica, M. L.; Romero, E. L.; Olivera, M. E.; Carrer, D. C. Liposomes Can Both Enhance or Reduce Drugs Penetration through the Skin. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 1–11.
- (19) Zylberberg, C.; Gaskill, K.; Pasley, S.; Matosevic, S. Engineering Liposomal Nanoparticles for Targeted Gene Therapy. *Gene Ther.* **2017**, *24* (8), 441–452.
- (20) Mozafari, M. R. *Nanocarrier Technologies : Frontiers of Nanotherapy*; Springer US, 2006.
- (21) Wu, X.; Li, Q. T. Ca<sup>2+</sup>-Induced Fusion of Sulfatide-Containing Phosphatidylethanolamine Small Unilamellar Vesicles. *J. Lipid Res.* **1999**, *40* (7), 1254–1262.
- (22) Lasic, D. D. Novel Applications of Liposomes. *Trends Biotechnol.* **1998**, *16* (7), 307–321.
- (23) Micheletto, Y. M. S.; Marques, C. M.; Pesce Da Silveira, N.; Schroder, A. P. Electroformation of Giant Unilamellar Vesicles: Investigating Vesicle Fusion versus Bulge Merging. *Langmuir* **2016**, *32* (32), 8123–8130.
- (24) Monnier, C. A.; Burnand, D.; Rothen-Rutishauser, B.; Lattuada, M.; Petri-Fink, A. Magnetoliposomes: Opportunities and Challenges. *Eur. J. Nanomedicine* **2014**, *6* (4), 201–

- 215.
- (25) Szuplewska, A.; Rękorajska (Joniec), A.; Pocztańska, E.; Krysiński, P.; Dybko, A.; Chudy, M. Magnetic Field-Assisted Selective Delivery of Doxorubicin to Cancer Cells Using Magnetoliposomes as Drug Nanocarriers. *Nanotechnology* **2019**, *30* (31), 315101.
- (26) Choi, W. Il; Sahu, A.; Wurm, F. R.; Jo, S. M. Magnetoliposomes with Size Controllable Insertion of Magnetic Nanoparticles for Efficient Targeting of Cancer Cells. *RSC Adv.* **2019**, *9* (26), 15053–15060.
- (27) Barreto, G. R.; Kawai, C.; Tofanello, A.; Neves, A. A. R.; Araujo-Chaves, J. C.; Belleti, E.; Lanfredi, A. J. C.; Crespilho, F. N.; Nantes-Cardoso, I. L. Magnetoliposomes as Model for Signal Transmission. *R. Soc. Open Sci.* **2019**, *6* (1), 181108.
- (28) Preiss, M. R.; Bothun, G. D. Stimuli-Responsive Liposome-Nanoparticle Assemblies. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2011**, *8* (8), 1025–1040.
- (29) Cintra, E. R.; Ferreira, F. S.; Santos Junior, J. L.; Campello, J. C.; Socolovsky, L. M.; Lima, E. M.; Bakuzis, A. F. Nanoparticle Agglomerates in Magnetoliposomes. *Nanotechnology* **2009**, *20* (4).
- (30) Lee, N.; Yoo, D.; Ling, D.; Cho, M. H.; Hyeon, T.; Cheon, J. Iron Oxide Based Nanoparticles for Multimodal Imaging and Magnetoresponse Therapy. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (19), 10637–10689.
- (31) Chen, Y.; Bose, A.; Bothun, G. D. Controlled Release from Bilayer- Decorated Magnetoliposomes via Electromagnetic Heating. *ACS Nano* **2010**, *4* (6), 3215–3221.
- (32) Beaune, G.; Ménager, C.; Cabuil, V. Location of Magnetic and Fluorescent Nanoparticles Encapsulated inside Giant Liposomes. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (25), 7424–7429.
- (33) Han, L.; Zhou, X. Synthesis and Characterization of Liposomes Nano-Composite-Particles with Hydrophobic Magnetite as a MRI Probe. *Appl. Surf. Sci.* **2016**, *376*, 252–260.
- (34) Hanuš, J.; Ullrich, M.; Dohnal, J.; Singh, M.; Štěpánek, F. Remotely Controlled Diffusion from Magnetic Liposome Microgels. *Langmuir* **2013**, *29* (13), 4381–4387.
- (35) Wilschut, J.; Diizgiines, N.; Fraley, R.; Papahadjopoulos, D. Studies on the Mechanism of

- Membrane Fusion : Kinetics of Calcium Ion Induced Fusion of Phosphatidylserine Vesicles Followed by a New Assay for Mixing of Aqueous Vesicle Contentst. *Biochemistry* **1980**, *19*, 6011–6021.
- (36) Düzgüneş, N., Faneca, H., Lima, M. Methods to Monitor Liposome Fusion, Permeability, and Interaction with Cells. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *606*, 209–232.
- (37) Hoekstra, D.; Düzgüneş, N. Lipid Mixing Assays to Determine Fusion in Liposome Systems. *Methods Enzymol.* **1993**, *220*, 15–32.
- (38) Chakraborty, H.; Mondal, S.; Sarkar, M. Membrane Fusion: A New Function of Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Biophys. Chem.* **2008**, *137* (1), 28–34.
- (39) Komatsu, H.; Okada, S. Ethanol-Induced Aggregation and Fusion of Small Phosphatidylcholine Liposome: Participation of Interdigitated Membrane Formation in Their Processes. *BBA - Biomembr.* **1995**, *1235* (2), 270–280.
- (40) Fezoua-Boubegtiten, Z.; Hastoy, B.; Scotti, P.; Milochau, A.; Bathany, K.; Desbat, B.; Castano, S.; Oda, R.; Lang, J. The Transmembrane Domain of the SNARE Protein VAMP2 Is Highly Sensitive to Its Lipid Environment. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2019**, *1861* (3), 670–676.
- (41) Kriegenburg, F.; Bas, L.; Gao, J.; Ungermann, C.; Kraft, C. The Multi-Functional SNARE Protein Ykt6 in Autophagosomal Fusion Processes. *Cell Cycle* **2019**, *18* (6–7), 639–651.
- (42) Ulrich, A. S.; Otter, M.; Glabe, C. G.; Hoekstra, D. Membrane Fusion Is Induced by a Distinct Peptide Sequence of the Sea Urchin Fertilization Protein Bindin. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (27), 16748–16755.
- (43) Zheng, T.; Chen, Y.; Shi, Y.; Feng, H. High Efficiency Liposome Fusion Induced by Reducing Undesired Membrane Peptides Interaction. *Open Chem.* **2019**, *17* (1), 31–42.
- (44) Versluis, F.; Voskuhl, J.; Kolck, B. Van; Zope, H.; Bremmer, M.; Albrechtse, T.; Kros, A. In Situ Modification of Plain Liposomes with Lipidated Coiled Coil Forming Peptides Induces Membrane Fusion. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 8057–8062.
- (45) Zope, H. R.; Versluis, F.; Ordas, A.; Voskuhl, J.; Spaink, H. P.; Kros, A. In Vitro and in

- Vivo Supramolecular Modification of Biomembranes Using a Lipidated Coiled-Coil Motif. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, *52* (52), 14247–14251.
- (46) Düzgüne, N.; Nir, S.; Wilschut, J.; Bentz, J.; Newton, C.; Portis, A.; Papahadjopoulos, D. Calcium- and Magnesium-Induced Fusion of Mixed Phosphatidylserine/Phosphatidylcholine Vesicles: Effect of Ion Binding. *J. Membr. Biol.* **1981**, *59* (2), 115–125.
- (47) Maggio, B.; Lucy, J. A. Polar Group Behaviour in Mixed Monolayers of Phospholipids and Fusogenic Lipids. *Biochem. J.* **1976**, *155* (2), 353–364.
- (48) Ohnishi, S. ichi; Ito, T. Calcium-Induced Phase Separations in Phosphatidylserine-Phosphatidylcholine Membranes. *Biochemistry* **1974**, *13* (5), 881–887.
- (49) Maggio, B. B.; Lucy, J. A. Studies on Mixed Monolayers of Phospholipids and Fusogenic Lipids. *Biochemistry* **1975**, *149*, 597–608.
- (50) Hope, M. J.; Cullis, P. R. The Role of Nonbilayer Lipid Structures in the Fusion of Human Erythrocytes Induced by Lipid Fusogens. *BBA - Biomembr.* **1981**, *640* (1), 82–90.
- (51) Cullis, P. R., Hope, M. J. Effects of Fusogenic Agent on Membrane Structure of Erythrocyte Ghosts and the Mechanism of Membrane Fusion. *Nat. Commun.* **1978**, *271*, 672–674.
- (52) Mason, W.; Miller, N. G. A. Fusion of Charged and Uncharged Liposomes by N-Alkyl Bromides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1979**, *91* (3), 878–885.
- (53) Frascione, D.; Diwok, C.; Almer, G.; Opriessnig, P.; Vonach, C.; Gradauer, K.; Mangge, H.; Stollberger, R.; Prassl, R. Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide ( USPIO ) -Based Liposomes as Magnetic Resonance Imaging Probes. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 2349–2359.
- (54) Laouini, A.; Jaafar-Maalej, C.; Limayem-Blouza, I.; Sfar, S.; Charcosset, C.; Fessi, H. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *J. Colloid Sci. Biotechnol.* **2012**, *1* (2), 147–168.
- (55) Bartlett, G. R. Phosphorus Assay in Column Chromatography. *J. Biol. Chem.* **1959**, *234* (3), 466–468.

- (56) Barnes, L. S.; Kaneshige, K. R.; Strong, J. S.; Tan, K.; Von Bremen, H. F.; Mogul, R. Effects of Terbium Chelate Structure on Dipicolinate Ligation and the Detection of Bacillus Spores. *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105* (12), 1580–1588.
- (57) Jimah, J.R., Schlesinger, P. H., Tolia, N. H. Liposome Disruption Assay to Examine Lytic Properties of Biomolecules. *Bio. Protoc.* **2017**, *7* (15), 1–16.
- (58) Angeloval, M. I.; Mard, P.; Faucon, J. E.; Bothorel, P. Liposome Electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **1986**, *81*, 303–311.
- (59) Angelova, M. I.; Soléau, S.; Méléard, P.; Faucon, F.; Bothorel, P. Preparation of Giant Vesicles by External AC Electric Fields. Kinetics and Applications. *Progr Colloid Polym Sci* **1992**, *131*, 127–131.
- (60) Luisi, P. L.; Souza, T. P. De; Stano, P. Vesicle Behavior : In Search of Explanations. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 14655–14664.
- (61) Souza, T. P. De; Holzer, M.; Stano, P.; Steiniger, F.; May, S.; Schubert, R.; Fahr, A.; Luisi, P. L.; Jena, D.-; Zentrum, E.; et al. New Insights into the Growth and Transformation of Vesicles : A Free- Flow Electrophoresis Study. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 12212–12223.
- (62) Deamer, D. W. Boundary Structures Are Formed by Organic Components of the Murchison Carbonaceous Chondrite. *Nature* **1985**, *317* (6040), 792–794.
- (63) McNeil, S. E. Nanoparticle Therapeutics: A Personal Perspective. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **2009**, *1* (3), 264–271.
- (64) Šegota, S.; Vojta, D.; Kendziora, D.; Ahmed, I.; Fruk, L.; Baranović, G. Ligand-Dependent Nanoparticle Clustering within Lipid Membranes Induced by Surrounding Medium. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119* (16), 5208–5219.
- (65) Lin, X.; Li, Y.; Gu, N. Nanoparticle’s Size Effect on Its Translocation across a Lipid Bilayer: A Molecular Dynamics Simulation. *J. Comput. Theor. Nanosci.* **2010**, *7* (1), 269–276.
- (66) Ding, H. M.; Tian, W. De; Ma, Y. Q. Designing Nanoparticle Translocation through Membranes by Computer Simulations. *ACS Nano* **2012**, *6* (2), 1230–1238.

- (67) Gupta, R.; Rai, B. Effect of Size and Surface Charge of Gold Nanoparticles on Their Skin Permeability: A Molecular Dynamics Study. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (March), 1–13.
- (68) Li, Y.; Chen, X.; Gu, N. Computational Investigation of Interaction between Nanoparticles and Membranes: Hydrophobic/Hydrophilic Effect. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (51), 16647–16653.
- (69) Labouta, H. I.; El-Khordagui, L. K.; Kraus, T.; Schneider, M. Mechanism and Determinants of Nanoparticle Penetration through Human Skin. *Nanoscale* **2011**, *3* (12), 4989–4999.
- (70) Labouta, H. I.; Kraus, T.; El-Khordagui, L. K.; Schneider, M. Combined Multiphoton Imaging-Pixel Analysis for Semiquantitation of Skin Penetration of Gold Nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2011**, *413* (1–2), 279–282.
- (71) Elsayed, M. M. A.; Cevc, G. Turbidity Spectroscopy for Characterization of Submicroscopic Drug Carriers, Such as Nanoparticles and Lipid Vesicles: Size Determination. *Pharm. Res.* **2011**, *28* (9), 2204–2222.
- (72) Vico, R. V.; Voskuhl, J.; Ravoo, B. J. Multivalent Interaction of Cyclodextrin Vesicles, Carbohydrate Guests, and Lectins: A Kinetic Investigation. *Langmuir* **2011**, *27* (4), 1391–1397.
- (73) Bentz, Joe; Nir, Shlomo; Wilschut, J. Mass Action Kinetics of Vesicle Aggregation and Fusion. **1983**, *6*, 333–363.
- (74) Wilschut, J.; Hoekstra, D. Membrane Fusion: Lipid Vesicles as a Model System. *Chem. Phys. Lipids* **1986**, *40* (2–4), 145–166.
- (75) Lentz, B. R.; Lee, J. K. Poly(Ethylene Glycol) (PEG)-Mediated Fusion between Pure Lipid Bilayers: A Mechanism in Common with Viral Fusion and Secretory Vesicle Release? *Mol. Membr. Biol.* **1999**, *16* (4), 279–296.
- (76) Agirre, A.; Nir, S.; Nieva, J. L.; Dijkstra, J. Induction of Aggregation and Fusion of Cholesterol-Containing Membrane Vesicles by an Anti-Cholesterol Monoclonal Antibody. *J. Lipid Res.* **2000**, *41* (4), 621–628.
- (77) Podaru, G. V.; Chikan, V.; Prakash, P. Magnetic Field Induced Ultrasound from Colloidal

- Superparamagnetic Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120*, 2386–2391.
- (78) Rodrigues, A. R. O.; Gomes, I. T.; Almeida, B. G.; Araújo, J. P.; Castanheira, E. M. S.; Coutinho, P. J. G. Magnetic Liposomes Based on Nickel Ferrite Nanoparticles for Biomedical Applications. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17* (27), 18011–18021.
- (79) Viroonchatapan, E.; Sato, H.; Ueno, M.; Adachi, I.; Murata, J.; Saiki, I.; Tazawa, K.; Horikoshi, I. Release of 5-Fluorouracil from Thermosensitive Magnetoliposomes Induced by an Electromagnetic Field. *J. Control. Release* **1997**, *46*, 263–271.
- (80) Rasch, M. R.; Rossinyol, E.; Hueso, J. L.; Goodfellow, B. W.; Arbiol, J.; Korgel, B. A. Hydrophobic Gold Nanoparticle Self-Assembly with Phosphatidylcholine Lipid: Membrane-Loaded and Janus Vesicles. *Nano Lett.* **2010**, *10* (9), 3733–3739.
- (81) Santiago, R.; Reigada, R. Interaction Modes between Nanosized Graphene Flakes and Liposomes: Adsorption, Insertion and Membrane Fusion. *BBA- Gen. Subj.* **2019**, *1863* (4), 723–731.
- (82) Van Lehn, R. C.; Atukorale, P. U.; Carney, R. P.; Yang, Y. S.; Stellacci, F.; Irvine, D. J.; Alexander-Katz, A. Effect of Particle Diameter and Surface Composition on the Spontaneous Fusion of Monolayer-Protected Gold Nanoparticles with Lipid Bilayers. *Nano Lett.* **2013**, *13* (9), 4060–4067.
- (83) Von White, G.; Chen, Y.; Roder-Hanna, J.; Bothun, G. D.; Kitchens, C. L. Structural and Thermal Analysis of Lipid Vesicles Encapsulating Hydrophobic Gold Nanoparticles. *ACS Nano* **2012**, *6* (6), 4678–4685.
- (84) Matshaya, T. J.; Lanterna, A. E.; Granados, A. M.; Krause, R. W. M.; Maggio, B.; Vico, R. V. Distinctive Interactions of Oleic Acid Covered Magnetic Nanoparticles with Saturated and Unsaturated Phospholipids in Langmuir Monolayers. *Langmuir* **2014**, *30* (20), 5888–5896.

## **CAPÍTULO V**

### **Conclusión general y perspectivas futuras**

## V.1- CONCLUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En el marco de la presente tesis de doctorado se llevó a cabo un estudio exhaustivo acerca de la interacción entre nanopartículas de plata y nanopartículas de magnetita, ambas de naturaleza hidrofóbica, con biomembranas modelo. El estudio de estas interacciones tuvo como objetivo fundamental, hacer un aporte al conocimiento de las diferentes fuerzas motrices, factores y fenómenos que regulan el comportamiento entre nanopartículas y membranas biológicas usando sistemas supramoleculares complejos. Dado que los fosfolípidos representan el constituyente mayoritario de las membranas biológicas, los modelos de biomembrana aquí descriptos (monocapas de Langmuir, monocapas soportadas, liposomas, etc.) representan sistemas eficaces que permitieron llevar a cabo los ensayos pertinentes para dilucidar los principales actores intervinientes en la interacción con las nanopartículas. El entendimiento de los procesos que gobiernan las *nanobiointerfases* entre las nanopartículas desarrolladas con fines biotecnológicos y las diferentes estructuras presentes en medios biológicos, es necesario para poder llevar a cabo el diseño racional y controlado de estos nanomateriales a fin de alcanzar su mayor potencial en el desempeño de las aplicaciones biomédicas, terapéuticas, cosméticas, etc., para las cuales son requeridos.

Con este objetivo, y a lo largo de las primeras etapas del desarrollo de este trabajo, se optimizaron rutas de síntesis y purificación de las nanopartículas bajo estudio: AgNP-OA y MNP-OA de manera controlada y reproducible. Las diferentes técnicas de caracterización empleadas permitieron a la vez, obtener información valiosa sobre la morfología, tamaño y propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas sintetizadas. Adicionalmente, se calcularon las masas molares de los nanomateriales sintetizados por medio de la información derivada de estas técnicas. De esta forma fue posible contar con un detalle preciso de las propiedades y cantidades de las nanopartículas que fueron enfrentadas a los modelos de biomembranas.

Dado el reconocido potencial que las AgNPs poseen como agentes antimicrobianos y los esfuerzos que se han puesto para entender los mecanismos mediante los cuales son capaces de ejercer dicha actividad, se propuso estudiar a las AgNP-OA como potencial plataforma biocida en entornos lipofílicos, y determinar las variables que regulan las tasas de actividad que presentan. Los ensayos en monocapas de Langmuir de films de AgNP-OA y films mixtos conformados por

diferentes mezclas AgNP-OA/lípido (y mezclas de lípidos), permitieron determinar que las nanopartículas de plata hidrofóbicas son estables en la interfase aire/agua, y que las mismas, son capaces de inducir un efecto de expansión de los films lipídicos con incremento de su elasticidad en el plano (fluidización). Se corroboró que las AgNP-OA producen un mayor desorden a nivel molecular en las fases líquido-condensadas (LC) que en las fases líquido-expandidas (LE). También pudo conocerse que la interacción de estas NPs frente a modelos de biomembranas con coexistencia de fases, conlleva a una mayor permanencia de las fases LE, que se prolongan hasta presiones superiores respecto a lo que se observa en ausencia de las AgNP-OA. Esta reorganización fue observada en los ensayos de la interacción de las AgNP-OA frente a un modelo de biomembrana que simula la composición del estrato córneo (SCM) de la piel. En este último caso, las AgNP-OA produjeron un demezclado de los constituyentes que conllevó a una disminución en el empaquetamiento de los lípidos y a un incremento en la elasticidad de un film con fase altamente condensada (ordenada). Este efecto es importante debido a que las AgNP-OA podrían modificar la propiedad de barrera del estrato córneo. A través del empleo de monocapas transferidas a sustratos sólidos (modelo de Langmuir-Blodgett), se confirmó el modelo planteado de interacción de las AgNP-OA frente al SCM, donde estas NPs promueven (en principio) un efecto de reorganización estructural sobre las moléculas que conforman la capa de la piel.

Adicionalmente, se determinó que las AgNP-OA son propensas a presentar adsorción de fosfolípidos sobre su superficie. Este es un aspecto que debería considerarse, al igual que se lo hace con las proteínas, en lo que respecta al cambio de identidad química de las nanopartículas cuando son expuestas a un entorno biológico. Las interacciones de adsorción constituyen uno de los fenómenos más importantes capaces de modificar una multiplicidad de aspectos, condicionando, mejorando o limitando la actividad biomédica de las nanopartículas.

A través de ensayos de liberación de  $\text{Ag}^+$  desde las nanopartículas (una de las principales vías reportadas para su actividad biocida), se evaluó la capacidad de las AgNP-OA para liberar los iones plata en medios acuosos y lipofílicos. Estos estudios permitieron confirmar que las AgNP-OA son capaces de liberar iones  $\text{Ag}^+$ , en concentraciones biocidas y durante tiempos prolongados, en ambos ambientes. Si bien se requerirán más estudios para determinar la medida en la que la adsorción de biomoléculas puede modificar el desempeño de las AgNP-OA como agente antimicrobiano, los ensayos realizados en torno a la liberación de iones plata en diferentes medios, demostraron que mayores concentraciones de  $\text{Ag}^+$  son liberadas cuando las AgNP-OA se

encuentran en entornos lipofílicos (vesículas multilamelares). Es posible deducir entonces que, ante la presencia de membranas biológicas (o medios lipofílicos en general), estas nanopartículas hidrofóbicas son capaces de interactuar favorablemente, mejorando notablemente su actividad terapéutica. La habilidad de las AgNP-OA para disrumpir en la organización estructural de modelos complejos de biomembranas como el de estrato córneo, favoreciendo la expansión y el incremento de la elasticidad de estos films, demuestra el gran potencial que estas NPs pueden tener en una gran variedad de aplicaciones cosméticas y terapéuticas.

A continuación, se llevaron a cabo estudios para determinar la capacidad de las nanopartículas magnéticas hidrofóbicas (MNP-OA) para inducir procesos de fusión de bicapas lipídicas.

Es sabido que los procesos de fusión de membranas son responsables de regular gran cantidad de funciones vitales de las células. Desde el punto de vista biotecnológico, numerosas investigaciones se han abocado al desarrollo de plataformas con aplicación en el campo de la fusión de membranas que permitan lograr un adecuado control en el transporte direccionado y la liberación final de diferentes tipos de fármacos o moléculas bioactivas. Esto ha permitido adquirir conocimiento acerca las propiedades de diferentes tipos de moléculas orgánicas, fármacos y cationes metálicos (entre otros), para promover procesos de fusión. Dentro de este tipo de moléculas con actividad fusogénica (*agentes fusogénicos*), se encuentra el ácido oleico (OA), utilizado en la síntesis de muchos nanomateriales como ligando de funcionalización o agente estabilizante, como es el caso de las nanopartículas aquí estudiadas.

La interacción favorable frente a films lipídicos de diversa composición que las MNP-OA han demostrado poseer a través de estudios previos (monocapas de Langmuir) en el laboratorio, sumado a las propiedades superparamagnéticas corroboradas mediante los ensayos de caracterización y la presencia de un ligando de reconocida actividad fusogénica como parte de su estructura, se hipotetizó la idea de que estas nanopartículas tendrían las aptitudes necesarias para ser evaluadas como promotores de procesos de fusión controlada de bicapas lipídicas. Empleando liposomas como modelos de biomembrana, se llevó a cabo el estudio de la interacción entre las MNP-OA y las vesículas lipídicas, con el fin de identificar procesos de reestructuración de bicapas asociados a fenómenos de fusión.

Como resultado de los diversos ensayos realizados con respecto a los cambios en los tamaños, cinética de agregación y mezclado de contenidos internos, fue posible corroborar que las MNP-OA son, en efecto, capaces promover la fusión de bicapas lipídicas. Los ensayos de mezclado de

contenidos internos y turbidimetría permitieron identificar claras diferencias asociadas a la cinética de procesos de aglomeración y mezclado de contenidos que indicaron que ambos procesos cinéticamente acoplados, dependieron directamente de la concentración de MNP-OA añadida al sistema. Además, por medio de ensayos de liberación de contenido interno o “leakage” se corroboró que los procesos de reestructuración de las bicapas que median las nanopartículas, transcurren sin pérdidas detectables de contenido interno.

Sin embargo, es sabido que en la fusión de bicapas promovida por agentes externos puede transcurrir con la disrupción de la estructura organizacional de las moléculas de la bicapa a través de procesos como la internalización de estas estructuras en la bicapa, mediada por diferentes fuerzas como van der Waals, efecto hidrofóbico, etc. Debido a ello, se realizaron mediciones a través de diferentes técnicas de microscopía en las vesículas lipídicas mediante las cuales se determinó que las MNP-OA interactúan con los lípidos de bicapa, anclándose a ellos y, posiblemente, incorporándose en determinadas proporciones a la bicapa lipídica. Si bien la determinación del grado de interacción entre las nanopartículas y las membranas de los liposomas, requerirá una mayor cantidad de estudios a futuro, el hecho de poder aseverar una interacción efectiva, arroja luz acerca de los mecanismos más probables que pueden tener lugar en la interacción fusógeno-membrana bajo estudio. Teniendo en cuenta que el ácido oleico está definido como el principal promotor del proceso de fusión, y considerando el anclaje observado de las MNP-OA a las membranas de las vesículas, es evidente que una gran parte de estos mecanismos se encuentran mediados por interacciones hidrofóbicas de las cadenas de OA que exponen las NPs al medio y los fosfolípidos de las biomembranas.

La pregunta que surge entonces es: el núcleo magnético, ¿es capaz de intervenir activamente en la regulación del proceso de fusión? La respuesta a este interrogante se obtuvo de los experimentos de mezclado de contenidos internos bajo la aplicación de campos magnéticos variables de baja intensidad. Tal como fue demostrado durante los ensayos correspondientes, la aplicación de los estímulos magnéticos externos, al sistema MNP-OA/LUVs, indicó la presencia de una respuesta dinámica de las nanopartículas en las proporciones en las que se produce el mezclado de contenidos internos, obteniéndose para cada campo aplicado un incremento diferente de los porcentajes de fusión alcanzados. La aplicación de un campo constante durante los experimentos de mezclado de contenidos, produjo un incremento notorio en el porcentaje de fusión obtenido,

con respecto al que se obtiene para una mezcla MNP-OA/LUVs en iguales concentraciones de nanopartículas, en ausencia de campos magnéticos.

Considerando fundamentalmente dos cuestiones relevantes es posible deducir una respuesta al interrogante antes planteado. En primer lugar, es claro que las nanopartículas son capaces de responder inmediatamente a campos aplicados de intensidades bajas (~5% de campos empleados en aplicaciones de biomedicina), promoviendo un mayor porcentaje de fusión de bicapas lipídicas. En segundo lugar, la fracción molar de OA ( $X_{OA}$ ) que aportan las MNP-OA en la máxima concentración de nanopartícula incorporada a las LUVs, es cuatro órdenes de magnitud menor que las informadas como concentraciones fusogénicas de OA en *bulk*. Dadas estas circunstancias, podría decirse que el núcleo de las MNP-OA no solo interviene en el proceso de fusión de bicapas como resultado del efecto que el campo magnético induce en el núcleo de las partículas (calentamiento, ultrasonido, por ej.), sino también de manera activa como entidades discretas probablemente por la forma en la que permiten a los ligandos OA llevar a cabo el anclaje y posterior mezclado de las bicapas lipídicas.

Teniendo en cuenta el comportamiento observado en la fusión promovida por las MNP-OA y la mecánica reportada para el cumplimiento de estos procesos, es factible asumir que la reestructuración de los lípidos de la biomembrana que se produce durante este evento conlleva a un incremento de la elasticidad de las bicapas, necesaria para favorecer termodinámicamente la promoción de la fusión. El comportamiento de incremento en la elasticidad de las membranas, también pudo deducirse de las observaciones realizadas en monocapas mixtas de MNP-OA y el fosfolípido POPC, constituyente de las vesículas unilamelares ensayadas en los experimentos de fusión. La expansión o incremento en la elasticidad de las monocapas de POPC, es en este caso producida por las MNP-OA en fracciones molares similares que las ensayadas en los experimentos de fusión. Dado que a presiones superficiales próximas a 30 mN/m el comportamiento en films en la interfase aire/agua es contrastable con el comportamiento evaluado en bicapas lipídicas, la similitud en el comportamiento observado entre ambos modelos permite confirmar el tipo de interacciones que tienen lugar entre las MNP-OA y la bicapa de las vesículas lipídicas.

Al comparar el comportamiento observado para nanopartículas de plata y nanopartículas magnéticas recubiertas con ácido oleico en la interfase aire/agua, y su desempeño en la interacción frente a diferentes fosfolípidos y mezclas de fosfolípidos, es claro que existen marcadas diferencias

que confirman que el núcleo de las nanopartículas tiene una alta influencia en el desempeño de las interacciones establecidas entre las NPs y las biomembranas.

Como corolario principal de esta tesis, ha sido posible demostrar que el núcleo de las nanopartículas hidrofóbicas con igual funcionalización superficial juega un papel fundamental en las interacciones con biomoléculas como lo son los fosfolípidos constituyentes de las membranas biológicas. Además, la funcionalización impartida por ligandos de naturaleza hidrofóbica les confiere a las nanopartículas la capacidad de interactuar activamente con modelos de biomembranas de diferentes maneras, siendo fáciles de incorporar en entornos lipofílicos en proporciones y velocidades regulables. Su alta estabilidad en medios lipofílicos o entornos biológicos de composición fosfolipídica variada, les permiten a las nanopartículas hidrofóbicas con propiedades ópticas, antimicrobianas, magnéticas y fusogénicas, ejercer una actividad que puede ser regulada según los tiempos de exposición a dichos ambientes o por acción de estímulos externos como la aplicación de campos magnéticos de intensidad variable.

Las potencialidades presentadas por las nanopartículas estudiadas dentro de la presente tesis doctoral, así como el conocimiento obtenido acerca de los diferentes mecanismos de interacción frente a los modelos de biomembranas ensayados, contribuirá en el futuro a generar un diseño controlado y racional de nuevas plataformas con aplicación en el campo de las nanobiociencias y diversas terapias biomédicas.



## APÉNDICE

## IA- Cálculo del número de LUVs y MNP-OA empleadas en los ensayos de fusión y su relación en áreas

El área que ocupa una molécula de POPC a 30 mN/m, presión a la cual se encuentran empaquetadas las moléculas de fosfolípido en una bicapa<sup>1</sup>, puede considerarse como  $A_{30\text{ mN/m}}^{\text{POPC}} = 0,63\text{ nm}^2/\text{molec.}^2$

Considerando la superficie de una esfera,  $S = 4\pi r^2$ , el valor obtenido para la superficie externa de una LUV de un diámetro aproximado de 108 nm ( $r = 54\text{ nm}$ ), es de  $S_{\text{LUVs}} = 36644\text{ nm}^2$ .

Por ende, el número de moléculas de POPC que forman parte de una hemicapa de la LUV puede estimarse como,

$$\frac{36644\text{ nm}^2}{0,63\text{ nm}^2} = 58165\text{ moléculas de POPC (hemicapa de 1 LUV)}$$

Haciendo la suposición de que ambas hemicapas del liposoma están constituidas por el mismo número de moléculas de fosfolípido, se puede estimar que la cantidad de moléculas de POPC que forman un liposoma es,

$$\begin{aligned} \text{N}^\circ \text{ de moléculas de POPC en la bicapa} &= 2 \times \text{N}^\circ \text{ de moléculas de POPC en una hemicapa} \\ \text{N}^\circ \text{ de moléculas de POPC en la bicapa} &= 116330\text{ moléculas de POPC} \end{aligned}$$

Considerando un ensayo estándar donde se mezcla típicamente un volumen de 250  $\mu\text{L}$  de dispersión de LUVs, cuya concentración inicial en POPC fue determinada como 44  $\mu\text{M}$ , con 5  $\mu\text{L}$  de MNP-OA cuya concentración inicial fue 3  $\mu\text{M}$  se obtienen en la mezcla las siguientes fracciones molares  $X_{\text{MNP-OA}} = 0,0014$ ,  $X_{\text{POPC}} = 0,9986$ .

Calculando el número total de moléculas de POPC presente en la dispersión, y considerando el número de moléculas de POPC que conforman una vesícula, se puede estimar el número de LUVs presentes en la dispersión,

$$\begin{aligned} 1000\text{ mL} &\text{ ————— } 44 \times 10^{-6}\text{ mol POPC} \\ 0,250\text{ mL} &\text{ ————— } X = 11 \times 10^{-9}\text{ mol POPC} \end{aligned}$$

$$11 \times 10^{-9} \text{ mol POPC} \times 6,02 \times 10^{23} = 6,62 \times 10^{15} \text{ moléculas de POPC}$$

El número total de LUVs es,

$$N^{\circ} \text{ de LUVs} = \frac{6,62 \times 10^{15} \text{ moléculas}}{116330 \text{ moléculas de POPC}} = \mathbf{5,69 \times 10^{10}}$$

Por otra parte, respecto a las nanopartículas se puede hacer la misma estimación,

$$\begin{aligned} 1000 \text{ mL MNP-OA} & \text{ ————— } 3 \times 10^{-6} \text{ mol MNP-OA} \\ 5 \times 10^{-3} \text{ mL MNP-OA} & \text{ ————— } X = 1,5 \times 10^{-11} \text{ mol MNP-OA} \end{aligned}$$

El número total de partículas presentes en el sistema es,

$$1,5 \times 10^{-11} \text{ mol MNP-OA} \times 6,02 \times 10^{23} = \mathbf{9,03 \times 10^{12}} \text{ MNP-OA}$$

Tal como se mencionó anteriormente la superficie expuesta por un liposoma es,

$$S_{LUVs} = 36644 \text{ nm}^2$$

Realizando el mismo cálculo para las MNP-OA ( $r=5,4$ ), se tiene que,

$$S_{MNP-OA} = 366,4 \text{ nm}^2$$

De manera que teniendo en cuenta la cantidad de entidades disponibles en el medio (número de LUVs=  $5,69 \times 10^{10}$ , número de MNP-OA=  $9,03 \times 10^{12}$ ) y la superficie total que son capaces de exponer de manera individual, es posible determinar que la superficie total que ofrecen tanto LUVs como MNP-OA son las siguientes:

$$\begin{aligned} S_{LUVs}^{TOTAL} &= 2,08 \times 10^{15} \text{ nm}^2 \\ S_{MNP-OA}^{TOTAL} &= 3,31 \times 10^{15} \text{ nm}^2 \end{aligned}$$

Esto quiere decir que, en las concentraciones presentes de cada una de las entidades, las MNP-OA se encuentran prácticamente en una relación 1:1 en superficie con respecto a las vesículas. Este hecho, justifica su amplia probabilidad de cubrir toda la superficie de las LUVs a las cuales se enfrentan.

APÉNDICE

Traduciendo esto a fracciones de superficie expuesta por las MNP-OA, respecto a la superficie total queda,

$$X_{MNP-OA}^S = \frac{S_{MNP-OA}}{(S_{MNP-OA} + S_{LUVs})}$$

para la condición en donde se utilizan 250  $\mu$ L de LUVs con [POPC]= 44  $\mu$ M y 5  $\mu$ L de MNP-OA 3  $\mu$ M ( $X_{MNP-OA}$ = 0,0014); la fracción de superficie ofrecida por MNP-OA con respecto a la superficie total presente en el sistema es

$$X_{MNP-OA}^S = \frac{3,31 \times 10^{15}}{(3,31 \times 10^{15} + 2,08 \times 10^{15})} = 0,61$$

La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos para  $X_{MNP-OA}^S$  considerando las diferentes fracciones molares de MNP-OA utilizadas en este trabajo.

$X_{MNP-OA}$	$X_{MNP-OA}^S$
0,0001	0,12
0,0002	0,21
0,0003	0,26
0,0005	0,36
0,0007	0,44
0,0014	0,61

## IIA- Cálculo del volumen interno disponible y dilución de sonda Tb/DPA en el buffer externo

Para 1 LUV de ~108 nm de diámetro, y cuya bicapa posee un espesor aproximado de 4 nm, se puede suponer que el diámetro efectivo para el interior acuoso es de ~104 nm, es decir:  $r = 52 \text{ nm}$ .<sup>3</sup>

Entonces, teniendo en cuenta el volumen de la esfera  $V = \frac{4}{3}\pi r^3$ , el volumen interno de 1 LUV adquiere el valor de  $V = 588977 \text{ nm}^3 = 5,89 \times 10^{-16} \text{ cm}^3$ .

Seguidamente, de acuerdo a la cantidad de vesículas disponibles calculadas en la sección IA, el volumen total de contenido interno (CI) se puede considerar como,

$$V_{\text{TOTAL (CI)}} = V_{\text{CI}} \times N^{\circ} \text{ de LUVs}$$

$$V_{\text{TOTAL (CI)}} = 5,89 \times 10^{-16} \text{ cm}^3 \times 5,69 \times 10^{10} = \mathbf{3,35 \times 10^{-5} \text{ cm}^3}$$

Suponiendo que la concentración de  $\text{Tb}^{3+}$  y DPA en el interior de las vesículas es la misma que la del buffer a partir del cual se preparan, 7,5 mM y 75 mM, respectivamente, y considerando que en los ensayos de mezclado de contenido se emplean 125  $\mu\text{L}$  de cada población en un volumen final de 250  $\mu\text{L}$ , la cantidad de moles de  $\text{Tb}^{3+}$  y DPA presentes en el ensayo se puede estimar cómo,

$$[\text{Tb}^{3+}] = \frac{1,68 \times 10^{-5} \text{ mL} \times 7,5 \times 10^{-3} \text{ mol}}{1000 \text{ mL}} = 1,26 \times 10^{-10} \text{ mol Tb}^{3+}$$

$$[\text{DPA}] = \frac{1,68 \times 10^{-5} \text{ mL} \times 75 \times 10^{-3} \text{ mol}}{1000 \text{ mL}} = 1,26 \times 10^{-9} \text{ mol DPA}$$

Si se considera el volumen final en el que estos moles de  $\text{Tb}^{3+}$  y DPA se encontrarán una vez que se incorporan las MNP-OA y el surfactante de lisis de las vesículas Tritón X-100:

$$V_f = 250 \mu\text{L LUVs} + 5 \mu\text{L MNP} - \text{OA} + 10 \mu\text{L Tritón X100} = 265 \mu\text{L}$$

La concentración final de  $\text{Tb}^{3+}$  en la solución luego de la lisis de las vesículas será:

$$[\text{Tb}^{3+}]_{\text{final}} = \frac{1000 \text{ mL} \times 1,26 \times 10^{-10} \text{ mol}}{265 \times 10^{-3} \text{ mL}} = 4,7 \times 10^{-7} \text{ M}$$

El factor de dilución de esta especie respecto a la concentración inicial será:

APÉNDICE

$$\frac{[Tb^{3+}]_{inicial}}{[Tb^{3+}]_{final}} = \frac{7,5 \times 10^{-3} M}{4,7 \times 10^{-7} M} = 15957$$

Mientras que la concentración final de DPA luego de la lisis de las vesículas será:

$$[DPA]_{final} \frac{1000 \text{ mL} * 1,26 \times 10^{-9} \text{ mol}}{265 \times 10^{-3} \text{ mL}} = 4,7 \times 10^{-6} M$$

Dando un factor de dilución de:

$$\frac{[DPA]_{inicial}}{[DPA]_{final}} = \frac{75 \times 10^{-3} M}{4,7 \times 10^{-6} M} = 15957$$

Acorde a la bibliografía disponible, para una estructura de complejo Tb/DPA con coordinación 1:1 ( $Tb(DPA)_1(H_2O)_6$ ) y 1:2 ( $Tb(DPA)_2(H_2O)_3$ ), la constante de asociación está dada por  $K_a = 1 \times 10^6 M^{-1}$ .<sup>4</sup> Teniendo en cuenta las concentraciones iniciales de  $Tb^{3+}$  y DPA presentes en cada población de vesículas, la concentración final aproximada de complejo Tb/DPA que puede formarse en un entorno confinado en el caso de un mezclado de contenidos internos sin pérdida detectable de cualquiera de las contrapartes del complejo, está dada por la ecuación:

$$K_a = \frac{[Tb(DPA)_1]}{[Tb^{3+}] \times [DPA]} = 1 \times 10^6 M^{-1}$$

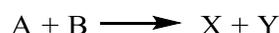
La resolución a esta ecuación empleando las concentraciones iniciales de  $Tb^{3+}$  y DPA da como resultado, una concentración aproximada de complejo Tb/DPA en el interior de las vesículas de  $5,6 \times 10^{-4}$  mM.

Cuando las vesículas fusionadas se lisan por el agregado de Tritón X-100, la dilución que experimentan ambas especies es de aproximadamente 15900 veces, tal como se calculó previamente. En esta situación, y teniendo en cuenta la nueva concentración que adquieren  $Tb^{3+}$  y DPA la concentración estimada de complejo es de  $3,5 \times 10^{-8}$  mM. Acorde a los espectros de fluorescencia adquiridos para muestras del complejo en bulk, esta concentración de complejo ya no es detectada por emisión de fluorescencia.

### III A- Dependencia de la determinación de parámetros cinéticos con los métodos físicos de medición

Para determinar diferentes parámetros cinéticos pueden utilizarse diferentes métodos físicos de medición (absorbancia, fluorescencia, turbidez, áreas de un cromatograma, etc) los cuales deben responder de manera lineal a los cambios medidos. En las mediciones cinéticas lo que se analiza son cambios de la magnitud física medida en función del tiempo y los parámetros cinéticos que se obtienen se independizan del método de medición.

A modo de ejemplo, para un proceso



La magnitud física medida  $\varepsilon$ , (absorbancia, fluorescencia, área de cromatograma, etc.) será la suma de la contribución de los 4 componentes.

$$\varepsilon = \varepsilon_A + \varepsilon_B + \varepsilon_X + \varepsilon_Y$$

Cada una de las contribuciones es linealmente proporcional a la concentración individual

$$\varepsilon_A = m_A[A] \quad \varepsilon_B = m_B[B] \quad \varepsilon_X = m_X[X] \quad \varepsilon_Y = m_Y[Y]$$

$$\varepsilon = m_A[A] + m_B[B] + m_X[X] + m_Y[Y]$$

Suponiendo que A sea el reactivo limitante, la ecuación anterior se simplifica si se expresa en términos de [A]

$$[X] = [Y] = [A]_0 - [A]$$

$$[B] = [B]_0 - \{[A]_0 - [A]\}$$

$$\varepsilon = m_A[A] + m_B\{[B]_0 - [A]_0 + [A]\} + m_X\{[A]_0 - [A]\} + m_Y\{[A]_0 - [A]\}$$

De manera tal que al comienzo de la reacción ( $t_0$ )

$$[X] = [Y] = 0$$

APÉNDICE

$$\varepsilon_0 = m_A[A]_0 + m_B[B]_0$$

Al final de la reacción ( $t_\infty$ )

$$[A] = 0 \quad \varepsilon_\infty = m_B\{[B]_0 - [A]_0\} + m_X[A]_0 + m_Y[A]_0$$

Los cambios en  $[A]$  se pueden relacionar con  $\varepsilon$  tomando por ejemplo la diferencia entre  $\varepsilon_\infty$  y  $\varepsilon_0$

$$\varepsilon_\infty - \varepsilon_0 = m_B[B]_0 - m_B[A]_0 + m_X[A]_0 + m_Y[A]_0 - m_A[A]_0 - m_B[B]_0 = m[A]_0$$

Teniendo en cuenta la notación:

$$m = -m_A - m_B + m_X + m_Y$$

Se derivan las siguientes ecuaciones:

$$\varepsilon_\infty - \varepsilon_0 = m[A]_0$$

$$\varepsilon_\infty - \varepsilon_0 = m[A]$$

$$\varepsilon - \varepsilon_0 = m\{[A]_0 - [A]\}$$

De manera alternativa, es posible expresar las concentraciones en términos de los valores de  $\varepsilon$

$$[A] = \frac{\varepsilon_\infty - \varepsilon}{m}$$

$$[A]_0 = \frac{\varepsilon_\infty - \varepsilon_0}{m}$$

$$[A]_0 - [A] = \frac{\varepsilon - \varepsilon_0}{m}$$

Substituyendo estas ecuaciones en las ecuaciones de velocidad integradas, es posible obtener las constantes de velocidad en términos de los valores de  $\varepsilon$  sin ningún cálculo directo de las concentraciones.

Así, para una reacción de primer orden como las ensayadas en el presente trabajo de tesis:

$$\ln \frac{[A]}{[A]_0} = -kt$$

$$\ln \frac{(\varepsilon_\infty - \varepsilon)}{(\varepsilon_\infty - \varepsilon_0)} = -kt$$

#### IVA- REFERENCIAS

- (1) Marsh, D. Lateral Pressure in Membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **1996**, *1286* (3), 183–223.
- (2) Villanueva, M. E.; Lanterna, A. E.; Vico, R. V. Hydrophobic Silver Nanoparticles Interacting with Phospholipids and Stratum Corneum Mimic Membranes in Langmuir Monolayers. *J. Colloid Interface Sci.* **2019**, *543*, 247–255.
- (3) Rideau, E.; Dimova, R.; Schwille, P.; Wurm, F. R.; Landfester, K. Liposomes and Polymersomes: A Comparative Review towards Cell Mimicking. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47* (23), 8572–8610.
- (4) Barnes, L. S.; Kaneshige, K. R.; Strong, J. S.; Tan, K.; Von Bremen, H. F.; Mogul, R. Effects of Terbium Chelate Structure on Dipicolinate Ligation and the Detection of Bacillus Spores. *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105* (12), 1580–1588.