

**Universidad Nacional de Córdoba**

---

Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas, (IIBYT - CONICET), Cátedra de Química Biológica, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales

**TESIS DOCTORAL EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**ESTUDIO DINÁMICO DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-  
COMPOSICION DE NANOPARTÍCULAS Y FILMES  
LIPÍDICOS**

Lic. Milagro Mottola

Directora: Dra. María Angélica Perillo

**Córdoba, Argentina**

**2021**



I I B Y T

El presente trabajo de tesis fue realizado en la Cátedra de Química Biológica, Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba – Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIBYT-CONICET) bajo la supervisión de la Dra. María Angélica Perillo.



Dra. María Angélica Perillo

La Comisión Evaluadora de Tesis se encuentra integrada por:

Dra. María Laura Fanani

(CIQUIBIC, CONICET-Facultad de Ciencias Químicas, UNC)

Dra. Raquel Viviana Vico

(INFIQC, CONICET-Facultad de Ciencias Químicas, UNC)

Dra. Julieta María Sanchez

(IIBYT, CONICET-FCEFyN, UNC)

Dra. Nadia Silvia Chiaramoni (evaluadora externa)

(G. VINCULADO AL IMBICE-GBEY, CONICET – UNQUILMES)

Febrero de 2021, Córdoba, Argentina

# Defensa Oral y Pública

Lugar y Fecha:

Calificación:

## COMISIÓN EVALUADORA

Firma: .....Aclaración: .....

Firma: .....Aclaración: .....

Firma: .....Aclaración: .....

Firma: .....Aclaración: .....

# Listado de publicaciones derivadas de la tesis

## Publicados en revistas científicas indexadas

**Mottola, M.**, Caruso, B., Perillo, M. A. “*Langmuir films at the oil/water interface revisited*”. Scientific Reports, 9 (1), 2259. 2019.

Jiang, S., **Mottola, M.**, Han, S., Thiramanas, R., Graf, R., Lieberwirth, I., Mailänder, V., Crespy, D., Landfester, K., “*Versatile Preparation of Silica Nanocapsules for Biomedical Applications*”. Particle & Particle Systems Characterization, 37, 1900484. 2020.

Jiang, S., Prozeller, D., Pereira, J., Simon, J., Han, S., Wirsching, S., Fichter, M., **Mottola, M.**, Gehring, S., Lieberwirth, I., Morsbach, S., Mailänder, V., Crespy, D., Landfester, K. “*Controlling protein interactions in blood for effective liver immunosuppressive therapy by silica nanocapsules*”. Nanoscale, 12(4): 2626-2637. 2020.

## Enviados para ser publicados

**Mottola, M.**, Perillo, M. A. “*Phospholipids at the liquid-liquid interface. Modelling lipid droplets and emulsion particles*”. Manuscrito en preparación.

## Presentaciones en Congresos y Jornadas

**Mottola, M.**, Caruso, B., Perillo, M. A. “*Langmuir films at the oil/water interface revisited*” (Poster). 1<sup>ra</sup> mención de honor al premio “JORGE PONCE HORNOS” en la XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica. San Luis. 27 - 29 de noviembre 2019.

**Mottola, M.**, Perillo, M. A. “*Lipid monolayers at the liquid/liquid interface as an experimental model to understand miniemulsions*” (Poster). XLVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica. Buenos Aires. 5 - 7 de diciembre 2018.

**Mottola, M.**, Caruso, B., Perillo, M. A. “*Lipid-Vaseline microemulsions at the Air/Water interface*” (Digital poster). Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias. Buenos Aires. 13 - 17 de noviembre 2017.

Caruso, B., **Mottola, M.**, Perillo, M. A. “*Lipid droplet biogenesis and hydrophobic blisters inside bilayers studied using monolayer wetting by liquid lenses.*” (Digital poster). Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias. Buenos Aires. 13 - 17 de noviembre 2017

Flores, S.S., **Mottola, M.**, Perillo, M. A., Sanchez, J. M. “*HIS-Tag  $\beta$ -Galactosidase in heterogenous system*”. (Digital poster). Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias. Buenos Aires. 13 - 17 de noviembre 2017.

**Mottola, M.**, Perillo, M. A. “*Organization and Dynamics of phospholipids at liquid-liquid interface*” (Poster). Humboldt Kolleg - Frontiers in Physical Sciences. Buenos Aires. 14-18 de noviembre 2016.

**Mottola, M.**, Perillo, M. A. “*A molecular, rheological and thermodynamic study of lipid-vaseline mixtures*” (Digital poster/Oral Poster). III Latin American Federation of Biophysical Societies (LAFeBS), IX IberoAmerican Congress of Biophysics, XLV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica. San Miguel de Tucumán. 23 – 25 de noviembre 2016.

**Mottola, M.**, Perillo, M. A. “*EPC monolayers at the oil/water interface*” (Poster). Latin American Crosstalk in Biophysics and Physiology. Seccional Biofísica Uruguay (SBF.uy), Sociedad Argentina de Biofísica (SAB), LAFeBS. Salto, Uruguay. 26 - 29 de noviembre 2015.

**Mottola, M.**, Perillo, M. A. “*DPPC monolayers at the oil/water interface*” (Poster). XLIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica. Santiago del Estero, Argentina. 4 – 6 de noviembre 2015.

Colmano G. N., **Mottola M.**, Perillo M A. “*Thermodynamic behavior and epifluorescence microscopy of mixed DOPC/Cho monolayers at the air/water interface*” (Póster). XLIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica. Santiago del Estero. 4 – 6 de noviembre 2015.

*Dedicada a **Gabriel**,  
por su paciencia y amor en este largo camino  
y a mi **familia** por su apoyo incondicional.*

*En memoria de **Ernesto**,  
querido amigo y colega que me  
acompañó en gran parte de este trayecto.  
“Gott weiß ich will kein Engel sein“.*

A veces lo humano, sólo es humano.  
A veces la justicia se troca injusticia.  
A veces la lluvia se combina con lágrimas.  
A veces las plegarias sólo quedan en el cielo.  
A veces el dolor nos enseña a ser felices.  
A veces la verdad sólo es mera verdad.  
A veces la brisa sólo es simple melodía.  
A veces el amor lo es todo,  
a veces el amor es la muerte.  
A veces la vida es sólo vida.

Alejandra M. Mottola



E.J.G. -2016-

# Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Químicas, la casa de estudios en la que he pasado la mayor parte de mis días durante diez años, que me permitió formarme como Licenciada en Química y hoy permite que pueda alcanzar el ansiado título de Doctora en Ciencias Químicas.

A la Cátedra de Química Biológica, Depto. de Química de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba y al Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIBYT-CONICET), por recibirme en su comunidad y brindarme el espacio de trabajo, así como el acceso a todas sus instalaciones, materiales y equipamientos que fueron imprescindibles para desarrollar esta tesis.

A la Universidad Nacional de Córdoba. Me enorgullece ser parte de una Universidad de gran excelencia académica que defiende una educación pública, gratuita e inclusiva.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por permitirme realizar investigación en mi país como becaria doctoral. Además, a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), al Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT) y a la Secretaria de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT-UNC) por financiar este trabajo a través de los subsidios otorgados.

A mi Comisión Asesora: Laura, Raquel y Julieta, quienes estuvieron desde un primer momento siguiendo mi desempeño durante estos años, y me brindaron desinteresadamente siempre su apoyo, cariño, consejos y enseñanzas para poder lograr el gran objetivo de finalizar mi tesis con la mejor calidad académica posible. Además, quisiera agradecer a la Dra. Nadia S. Chiamoni, por dedicar su tiempo para revisar esta Tesis como evaluadora externa.

Al la Dra. María Angélica Perillo (Marieca, para mí) por recibirme con los brazos abiertos en su laboratorio, por permitirme ser su tesista y ser una guía en cada actividad y experimento que realicé en esta tesis. No solo agradecerle a nivel científico todo lo que me ha enseñado, así como la rigurosidad de sus consejos y predisposición para discutir resultados, sino también por su confianza y por su dedicación, aunque estuviera en un millón de cosas a la vez. Por el tiempo compartido y por ser una hermosa persona, de la que admiro su calidez humana, así como su excelencia académica. A nivel personal le agradezco profundamente por su apoyo, paciencia,



charlas y mates cuando las cosas no iban como quería o cuando las cuestiones familiares se volvían una prioridad. ¡Gracias!

Al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) por la valiosa oportunidad de hacer dos estancias de investigación en Alemania. Gracias a la Dra. Landfester por recibirme gentilmente en su laboratorio y en especial al Dr. Jiang, por dedicarme su tiempo, compartir sus conocimientos y ser un guía permanente durante mi estancia.

A toda mi familia, en especial a mis padres, Carlos y Celia. Por brindarme la oportunidad de estudiar y apoyarme siempre en todo camino que quiero emprender. Por ser indispensables, por ser mis guías y ayudarme a ser la persona que soy hoy. También agradecerles a todos mis amados hermanos: Caro, Ale, Marta, Marie y Carlos, por estar permanentemente a mi lado, por compartir los buenos y malos momentos, por escucharme y preocuparse cada vez que lo necesito.

A mis tías, Piqui, Elena y Beba por estar siempre atentas a mis logros, brindándome su cariño y entusiasmo durante estos años para que llegue al final del camino.

A mi querido esposo, Gabriel, sin su constante amor y sostén no podría haber terminado esta tesis. Gracias por tu compañía, comprensión y paciencia a cada momento; por ser el motor de mi vida y estar apoyándome en cada paso que doy, aunque eso haya implicado muchos sacrificios. Gracias por darme la oportunidad de aprender que después de cada tormenta siempre sale el sol. ¡Te amo!

A mis amigos facultativos y de la vida: Lucas, Sofi, Vane, Virgi, Ro, Nico, Cristian, Mati, Rober, Ema, Gise, Víctor, Agus y Yeni. Gracias por ser mis amigos, por acompañarme en los momentos de felicidad y tristeza que sucedieron a lo largo de estos años. A veces no nos vemos seguido o nos quedamos comunicados, pero sabemos que a pesar de las distancias siempre estamos cerca.

A mi querida Protofamilia, Sandra, Nico, Iván y Meli. Sin ellos transitar el largo camino de la tesis hubiera sido mucho más difícil. Gracias por escucharme pacientemente y traer siempre alegría a mi vida. Es hermoso haber compartido tantos mates, charlas, juntadas y también horas de laboratorio, congresos, cursos, jornadas hasta hacernos compañía cuando había que quedarse a trabajar hasta tarde. ¡Gracias! ¡Espero poder festejar sus tesis pronto!

A todos los miembros del laboratorio de Biomembranas y Biofísica Molecular, por estar presentes, ya sea para compartir mates y charlas de la vida para hacer más llevadero un día de trabajo o para brindarme su tiempo cuando era necesario discutir resultados, metodologías y compartir sus conocimientos. ¡Gracias infinitas por los hermosos momentos compartidos, por su amistad y cariño!

*“Las palabras nunca alcanzan cuando lo que  
hay que decir desborda el alma”*

*Julio Cortázar*

*“No debemos olvidar que cuando se descubrió el radio nadie sabía que iba a ser útil en hospitales. Era un trabajo de ciencia pura. Y ello es prueba de que el trabajo científico no debe considerarse desde el punto de vista de su uso directo. Se debe realizar por sí mismo, por la belleza de la ciencia y luego siempre existirá la posibilidad de que un descubrimiento científico se convierta, como el radio, en un beneficio para la humanidad.”*

*Marie Skłodowska-Curie*

# Índice

<b>Índice de Tablas y Figuras.....</b>	<b>15</b>
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>20</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>23</b>
<b>Capítulo I</b>	
<b>Introducción .....</b>	<b>24</b>
I.1.    Introducción general. Nanobiotecnología.....	24
I.2.    El interés en los lípidos y su polimorfismo .....	27
I.3.    Nanoestructuras lipídicas como matrices para moléculas biológicamente activas .....	34
I.4.    Nanopartículas de emulsión.....	35
I.4.1. Definición, clasificación y nomenclatura .....	35
I.4.2. Parámetros de estabilidad .....	38
I.4.3. Formulación y preparación de emulsiones .....	42
I.4.4. Desafíos vigentes en la formulación de emulsiones.....	44
I.5.    Filmes de Langmuir como modelos de estudio .....	45
I.5.1. Importancia histórica .....	45
I.5.2. Fundamentos teóricos .....	46
I.5.3. Monocapas de Langmuir en la interfase agua/aceite.....	49
I.5.4. Técnicas asociadas a monocapas de Langmuir .....	50
I.6.    Nanoemulsiones como plataformas para la encapsulación de drogas y enzimas .....	51
I.7.    Hipótesis .....	54
I.8.    Objetivos.....	54
I.8.1. Objetivo general .....	54
I.8.2. Objetivos específicos .....	54
<b>Capítulo II</b>	
<b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>55</b>
II.1.    Materiales .....	55
II.1.1. Monocapas de Langmuir en interfase O/W y A/W .....	55
II.1.2. Nanoemulsiones y Nanocápsulas .....	56

---

II.2. Métodos .....	57
II.2.1. Determinación de la composición de Vaselina (VAS).....	57
II.2.1.1. Análisis espectroscópico mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) .....	57
II.2.1.2. Análisis mediante cromatografía de gases-espectrometría de masa (CG-MS) .....	58
II.2.2. Experimentos en Filmes de Langmuir y Langmuir-Blodgett.....	58
II.2.2.1. Monocapas en la interfase agua/aire (A/W) .....	59
II.2.2.2. Monocapas en la interfase aceite/agua (O/W).....	59
II.2.2.3. Filmes de Langmuir-Blodgett (LB).....	61
II.2.3. Análisis teóricos .....	63
II.2.3.1. Área molecular promedio y presión superficial o interfasial .....	63
II.2.3.2. Módulo de compresibilidad (K) .....	63
II.2.3.3. Análisis termodinámico.....	64
II.2.3.4. Cinética de difusión de los fosfolípidos (PL) en la interfase O/W....	65
II.2.3.5. Análisis de miscibilidad de componentes en monocapas.....	66
II.2.4. Técnicas para la caracterización superficial y análisis de imágenes en filmes de Langmuir .....	67
II.2.4.1. Microscopía de ángulo de Brewster (BAM) .....	67
II.2.4.1.1. Adquisición de la imagen .....	68
II.2.4.1.2. Cálculos de la altura (h) de lentes observadas por BAM en monocapas EPC/VAS .....	69
II.2.4.2. Microscopía de Epifluorescencia (EFM) .....	70
II.2.4.3. Microscopía de Epifluorescencia Confocal Espectral.....	71
II.2.5. Emulsiones y Nanocápsulas: preparación y caracterización .....	72
II.2.5.1. Síntesis de nanoemulsiones lipídicas .....	72
II.2.5.2. Preparación de nanocápsulas (NCs) a partir de emulsiones O/W .....	72
II.2.5.2.1. Determinación de la eficiencia de encapsulación de dexametasona (DXM) en nanocápsulas. ....	73
II.2.5.2.2. Ensayos de liberación de dexametasona a partir de NCs .....	75
II.2.5.3. Técnicas para la caracterización de miniemulsiones (ME) y nanocápsulas (NCs) .....	77
II.2.5.3.1. Análisis por dispersión dinámica de la luz (DLS).....	77
II.2.5.3.2. Análisis por técnicas de microscopía electrónica.....	78
II.2.5.3.3. Análisis del área superficial mediante el método de Brunauer – Emmett – Teller (BET) .....	78
II.2.5.3.4. Mediciones de potencial zeta ( $\zeta$ ) .....	79

<b>Capítulo III</b>	
<b><i>Composición química y definición de la Vaselina</i></b> .....	<b>81</b>
III.1. Introducción.....	81
III.2. Caracterización química de VAS por $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN.....	82
III.3. Análisis de VAS por CG-MS .....	85
III.4. Conclusiones.....	87
<b>Capítulo IV</b>	
<b><i>Filmes de Langmuir en la interfase líquido/líquido</i></b> .....	<b>88</b>
IV.1. Introducción.....	88
IV.2. Resultados y Discusión.....	90
IV.2.1. Monocapas adsorbidas (AM).....	90
IV.2.2. Monocapas esparcidas y adsorbidas en la interfase O/W .....	95
IV.2.3. Filmes de Langmuir de EPC/VAS en la interfase agua/aire: un modelo experimental de monocapas de EPC en la interfase aceite/agua .....	99
IV.3. Conclusiones.....	103
<b>Capítulo V</b>	
<b><i>Mezclas pseudobinarias de lípido/vaselina en la interfase agua/aire</i></b> .....	<b>106</b>
V.1. Introducción.....	106
V.2. Resultados y Discusión.....	108
V.2.1. Monocapas de DPPC en la interfase O/W .....	108
V.2.2. Análisis de mezclas pseudobinarias DPPC/VAS en la interfase A/W ..	114
V.2.3. Análisis de la mezcla DPPC/VAS <sub>0,2</sub> .....	119
V.3. Conclusiones.....	122
<b>Capítulo VI</b>	
<b><i>Monocapas en la interfase O/W como un modelo experimental de emulsiones..</i></b>	<b>128</b>
VI.1. Introducción.....	128
VI.2. Resultados y discusión .....	129
VI.2.1. Emulsiones de DPPC/VAS.....	129
VI.2.2. Determinación del tamaño de las partículas por DLS .....	132
VI.3. Conclusiones.....	137
<b>Capítulo VII</b>	
<b><i>Emulsiones como moldes para la síntesis de nanocápsulas de sílica</i></b> .....	<b>138</b>
VII.1. Introducción.....	138

---

VII.2. Resultados y Discusión.....	140
VII.2.1. Control estructural de la polimerización activada por interfase.....	140
VII.2.2. Influencia de la relación fase hidrofóbica/agua en el diámetro de las nanocápsulas (NCs) .....	142
VII.2.3. Selección de nanocápsulas con interés en aplicaciones biomédicas	144
VII.2.4. Liberación controlada de Dexametasona .....	145
VII.2.5. Síntesis de Nanocápsulas en Argentina.....	150
VII.3. Conclusiones.....	152
<b>Capítulo VIII</b>	
<b><i>Conclusiones generales</i> .....</b>	<b>154</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>159</b>
A.1. Certificado de análisis de VAS. ....	159
A.2. Capítulo IV. Sección IV.2.3.....	160
A.3. Capítulo V. Sección V.2.2.....	161
A.4. Capítulo VII. Sección VII.2.3. ....	162
A.5. Capítulo VII. Sección VII.2.4. ....	163
<b>Referencias .....</b>	<b>168</b>

# Índice de Tablas y Figuras

## Tablas

Tabla 1. Estructuras formadas por moléculas anfifílicas según su parámetro crítico de empaquetamiento.....	32
Tabla 2. Análisis reológico y termodinámico de los filmes de Langmuir.....	98
Tabla 3. Parámetros moleculares, reológicos y termodinámicos de monocapas de DPPC. .....	111
Tabla 4. Parámetros que describen la transición de fase a 25 °C de DPPC en las interfases A/W y O/W.....	112
Tabla 5. Parámetros moleculares y reológicos de monocapas mezcla de DPPC/VAS <sub>A/W</sub> .116	
Tabla 6. Datos obtenidos para el análisis de composición de la monocapa en las condiciones del PG ( $X_{PG}$ , $v_{AS} = 0,2$ y $\pi_{PG} = 15$ mN/m).....	126
Tabla 7. Caracterización de las emulsiones O/W para distintas relaciones molares DPPC/VAS. ....	132
Tabla 8. Estabilidad coloidal, diámetros hidrodinámicos ( $D_h$ ) e índice de polidispersidad (PDI) de NCs preparadas con diversas cantidades molares de tensioactivos CTMA-Cl y Lutensol AT50.....	142
Tabla 9. Espesor ( $d$ ) y diámetros hidrodinámicos ( $D_h$ ) de NCs preparadas con distintas proporciones de aceite/agua.....	143
Tabla 10. Diámetros hidrodinámicos ( $D_h$ ), potencial zeta ( $\zeta$ ) y eficiencia de encapsulación (EE) de DXM de las nanocápsulas obtenidas.....	147



---

## *Figuras*

Figura 1. La nanoescala.....	25
Figura 2. Estructura química genérica de la molécula de un fosfolípido.....	28
Figura 3. Diagrama de fases hipotético lípido/agua.....	30
Figura 4. Esquema representativo de la formación y ruptura de una emulsión.....	39
Figura 5. Esquema ilustrativo del perfil de energía libre de una nanoemulsión.....	40
Figura 6. Mecanismos de desestabilización de emulsiones.....	42
Figura 7. Monocapas en la interfase agua/aire.....	48
Figura 8. Esquema de una isoterma de presión superficial vs. MMA.....	49
Figura 9. Modelo de estudio de la interfase O/W en una partícula de emulsión.....	50
Figura 10. Estructura de lípidos y sondas fluorescentes.....	56
Figura 11. Estructuras químicas de las sustancias utilizadas en la preparación de emulsiones.....	57
Figura 12. Cuba de Langmuir para interfases líquido/líquido.....	60
Figura 13. Preparación de monocapas con diferentes métodos de siembra.....	61
Figura 14. Técnica de Langmuir-Blodgett.....	62
Figura 15. Microscopía de ángulo de Brewster.....	69
Figura 16. Esquema ilustrativo de la síntesis de NCs.....	73
Figura 17. Curva de calibración para determinar la concentración de DXM en agua a pH 7 mediante espectroscopia UV-Vis.....	75

Figura 18. Estructura molecular del L-glutati3n (GSH) y del disulfuro de glutati3n (GSSG). .....	77
Figura 19. Esquema representativo del fundamento te3rico del potencial zeta .....	80
Figura 20. Espectro <sup>1</sup> H-RMN de la Vaselina .....	83
Figura 21. Espectro de <sup>13</sup> C-RMN-DEPT 135° de la Vaselina. ....	84
Figura 22. An3lisis cromatogr3fico de la composici3n de VAS .....	86
Figura 23. Adiciones sucesivas de EPC a la interfase A/O, a distintas distancias de la placa de Wilhelmy. ....	90
Figura 24. Adsorci3n de EPC en la interfase VAS/W.....	91
Figura 25. Cin3tica de formaci3n de la monocapa de EPC en la interfase VAS/W.....	93
Figura 26. Isotermas $\pi$ vs. MMA o K vs. MMA para monocapas de EPC. ....	96
Figura 27. Isotermas de presi3n superficial/interfasial vs. 3rea molecular promedio normalizadas. ....	97
Figura 28. An3lisis de los ciclos de C-D en monocapas de EPC/VAS <sub>0.02, A/W</sub> . ....	100
Figura 29. Microscop3a de Epifluorescencia Confocal Espectral de EPC/VAS en la interfase A/W.....	102
Figura 30. Efecto de la temperatura en monocapas de DPPC en la interfase A/W y O/W. ....	108
Figura 31. Isotermas $\pi$ . vs MMA de monocapas de DPPC normalizadas. ....	110
Figura 32. Micrograf3as obtenidas por EFM para monocapas de DPPC.....	113
Figura 33. Isotermas de mezclas DPPC/VAS y diagramas de MMA vs. X <sub>VAS</sub> . ....	115
Figura 34. Im3genes obtenidas mediante BAM para monocapas mezclas de DPPC/VAS .....	117

---

Figura 35. Diagrama de fases de $\pi$ vs. $X_{VAS}$ para mezclas DPPC/VAS.....	118
Figura 36. Estudio de la mezcla DPPC/VAS <sub>0,2</sub> a $\pi = 15$ mN/m mediante EFM y BAM..	120
Figura 37. Análisis por Microscopía Espectral de la mezcla pseudobinaria DPPC/VAS <sub>0,02</sub> .....	121
Figura 38. Esquema ilustrativo de la transición de fase en mezclas líquidas binarias con solubilidad parcial y nucleación. ....	123
Figura 39. Modelo de hemipartícula de emulsión. ....	127
Figura 40. Isotherma de adsorción de DPPC en la interfase vaselina/agua. ....	130
Figura 41. Análisis y caracterización de las emulsiones [DPPC] <sub>O/W, 0.01 mM</sub> y [DPPC] <sub>O/W, 0. 1 mM</sub> a partir de datos obtenidos mediante DLS. ....	134
Figura 42. Análisis del área molecular de la DPPC en la interfase de una partícula de emulsión. ....	136
Figura 43. Influencia del tipo de surfactante en la formación de nanocápsulas de sílica..	141
Figura 44. Micrografías TEM de nanocápsulas con distintos diámetros hidrodinámicos obtenidos al modificar la relación de volumen fase hidrofóbica/agua. ....	143
Figura 45. Microscopía SEM y TEM de las nanocápsulas obtenidas. ....	145
Figura 46. Efecto de la proporción de enlaces disulfuro o tetrasulfuro en la morfología de las nanocápsulas con interior acuoso.....	147
Figura 47. Análisis de la liberación de DXM desde las nanocápsulas de sílica.....	149
Figura 48. Análisis mediante DLS y microscopía TEM de NC <sub>VAS</sub> y NC <sub>Agua</sub> .....	151

---

## *Figuras Anexo*

Figura A. 1. Caracterización de VAS provista por el fabricante.....	159
Figura A. 2. Microscopía de epifluorescencia confocal espectral de monocapas EPC/VAS <sub>0,02</sub> en la interfase A/W.....	160
Figura A. 3. Diagrama de MMA vs. X <sub>VAS</sub> para la mezcla DPPC/VAS.....	161
Figura A. 4 Espectro <sup>1</sup> H-RMN de las nanocápsulas de sílica (NC <sub>agua</sub> ) antes y después de la evaporación del solvente a temperatura ambiente durante 12 horas.....	162
Figura A. 5. Grado de hidrólisis de los alcoxisilanos emulsionados.....	163
Figura A. 6. Espectros de <sup>1</sup> H MAS RMN, <sup>13</sup> C CP-MAS RMN, y <sup>29</sup> Si MAS RMN.....	166

# Abreviaturas

- $\Gamma$ : exceso de superficie, del inglés “Surface excess”.
- $\gamma$ : tensión superficial.
- $\gamma_{m,A/W}$  o  $\gamma_{m,O/W}$ : tensión superficial o interfasial de la monocapa mezcla DPPC/VAS en las zonas libre de gotas o en las zonas que subyacen a la gota, respectivamente
- $\Delta G_{comp}$ : energía libre de compresión.
- $\Delta G_{Trans}$ : energía libre de transición de fase.
- $\nabla[PL]_O$ : gradiente de concentración de los fosfolípidos a través de la fase aceite.
- $\zeta$ : potencial zeta.
- $\eta_{agua}$  o  $\eta_{aceite}$ : viscosidad del agua o del aceite, respectivamente.
- $\mu E$ : microemulsiones.
- $\pi$ : presión superficial o interfasial.
- $\pi_c$ : presión lateral de colapso
- $\pi_{eq}$ : presión lateral de equilibrio.
- $\pi_{eq,sat}$ : presión de equilibrio de saturación.
- $\pi_{PG}$ : presión lateral en el punto de gota.
- $\pi_{PT}$ : presión lateral en el punto triple.
- $\pi_{Trans}$ : presión lateral de transición de fase.
- $A_{T,m}$ : área total ocupada por la monocapa mezcla DPPC/VAS.
- $A/O$ : interfase aire/aceite.
- $A/W$ : interfase agua/aire.
- $A_{DPPC,mA/W}$ : área ocupada por una molécula de DPPC en zonas libre de gotas.
- $AM$ : monocapas adsorbidas.
- $AM_{A/O}$ : monocapas adsorbidas con siembra en la interfase aire/aceite.
- $AM_{O/W}$ : monocapas adsorbidas con siembra en la interfase aceite/agua previamente formada.
- $A_{VAS,mA/W}$ : área ocupada por una molécula de VAS en zonas libre de gotas.
- $BAM$ : microscopía de Ángulo de Brewster.
- $BET$ : técnica de análisis de área superficial “*Brunauer, Emmett y Teller*”.
- $CG-MS$ : cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas.
- $CMC$ : concentración micelar crítica.
- $CSM$ : centro de masa espectral.
- $CTAB$ : bromuro de cetiltrimetilamonio.
- $CTMA-Cl$ : cloruro de cetiltrimetilamonio.
- $DEPT$ : análisis de mejoramiento sin distorsión por transferencia de polarización (del inglés *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*).
- $D_h$ : diámetro hidrodinámico.
- $DLS$ : dispersión dinámica de la luz por su denominación en inglés “*Dynamic light scattering*”.
- $D_{PL}$ : coeficiente de difusión 3D de los fosfolípidos en el aceite.
- $DPPC/VAS_{A/W}$ : monocapa de la mezcla pseudobinaria DPPC y vaselina en la interfase agua/aire.
- $DPPC_{A/W}$ : monocapas de DPPC en la interfase agua/aire.
- $DPPC_{O/W}$ : monocapas de DPPC en la interfase aceite/agua.
- $DXM$ : Dexametasona.
- $EE$ : eficiencia de encapsulación.
- $EFM$ : microscopía de Epifluorescencia.

- EMC:** concentración de monómero en equilibrio.
- EPC/VAS<sub>A/W</sub>:** monocapa de la mezcla pseudobinaria EPC y vaselina en la interfase agua/aire.
- EPC:** L- $\alpha$ -fosfatidilcolina de huevo.
- EPC<sub>O/W</sub>:** monocapas de EPC en la interfase aceite/agua.
- $f_{m, O/W}$  o  $f_{m, A/W}$ :** fracción del área total ocupada por la  $m$ ,  $O/W$  o por la  $m$ ,  $A/W$ , respectivamente.
- G:** estado gaseoso.
- GSH:** L- Glutación.
- HLB:** balance hidrofílico-lipofílico.
- HLD:** diferencia lipofílica-hidrofílica.
- $h_o$ :** espesor de la fase aceite.
- $K$ :** módulo de compresibilidad
- LB:** filmes de Langmuir-Blodgett.
- LC:** estado líquido condensado.
- LE:** estado líquido expandido.
- LF:** filmes monomoleculares/ monocapas de Langmuir.
- LF<sub>A/W</sub>:** filmes de Langmuir en la interfase agua/aire.
- LF<sub>O/W</sub>:** filmes de Langmuir en la interfase agua/aceite.
- $m, A/W$ :** monocapa mezcla DPPC/VAS ubicada en la interfase A/W en las zonas libres de gotas.
- $m, O/W$ :** monocapa mezcla DPPC/VAS ubicada en la interfase O/W en las zonas que subyacen a la gota.
- ME:** miniemulsión.
- MMA:** área molecular promedio.
- MMA<sub>ap</sub>:** área molecular promedio aparente.
- MMA<sub>m, A/W</sub>:** área molecular promedio de la monocapa mezcla VAS/DPPC.
- MMA<sub>min</sub>:** área molecular mínima que ocupa el tensoactivo en la interfase.
- NBD-PC:** 1-palmitoyl-2-12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino] dodecanoyl-sn-glycero-3-fosfolina.
- NCs:** nanocápsulas de sílica.
- NE:** nanoemulsión.
- NR:** 5H-benzo [ $\alpha$ ] fenoxazin-5-ona, 9- (dietilamina), Rojo de Nilo.
- $n_{VAS, G}$ :** número de moléculas de VAS que conforman una gota.
- $n_{VAS, T}$ :** número de moléculas totales de VAS.
- $n_{VAS, m A/W}$ :** número de moléculas de VAS en la monocapa mezcla DPPC/VAS en zonas libres de gotas.
- $n_{VAS, m O/W}$ :** número de moléculas de VAS en la monocapa mezcla DPPC/VAS en zonas que subyacen a la gota.
- O/W:** interfase aceite/agua por su denominación en inglés “oil” y “water” e indica emulsiones de tipo aceite en agua.
- Pc:** parámetro crítico de empaquetamiento.
- PC:** fosfatidilcolina.
- PDI:** índice de polidispersidad.
- PG:** punto de gota.
- PL:** fosfolípidos
- PT:** punto triple.
- Rhod-PE:** L- $\alpha$ -fosfatidiletanolamina-N-(lisamina rodamina B sulfonil).
- RMN:** espectroscopia de resonancia magnética nuclear.
- S:** estado sólido.

- 
- SDPPC, VAS:** solubilidad de DPPC en VAS.
- SEM:** microscopía electrónica de barrido por su denominación en inglés “*Scanning Electron Microscope*”.
- SEPC, VAS:** solubilidad de EPC en VAS.
- SM:** monocapas esparcidas por su denominación en inglés “*spread monolayers*”.
- T<sub>c</sub>:** temperatura de transición de fase.
- TEM:** microscopía electrónica de transmisión por su denominación en inglés “*Transmission Electron Microscopy*”.
- TEOS:** Tetraetoxisilano.
- TESPD:** bis[3-(trietoxisilil)propil]disulfuro.
- TESPT:** bis[3-(trietoxisilil)propil] tetrasulfuro.
- VAS/W:** vaselina/agua.
- VAS:** Vaselina.
- V<sub>PL</sub>:** velocidad de difusión de los fosfolípidos.
- W/O:** agua en aceite.
- X<sub>DPPC</sub>:** fracción molar de DPPC en una mezcla.
- X<sub>m,A/W</sub> o X<sub>m,O/W</sub>:** fracción molar de VAS en la monocapa mezcla DPPC/VAS en las zonas libre de gotas o en las zonas que subyacen a la gota, respectivamente.
- X<sub>PG, VAS</sub>:** fracción molar de vaselina en el punto de gota
- X<sub>VAS</sub>:** fracción molar de vaselina en una mezcla.

# Resumen

Los lípidos, de origen vegetal o animal, han ganado un renovado interés como excipientes de formulaciones farmacéuticas para la administración de drogas hidrofóbicas por vía parenteral, debido a sus capacidades de aumentar la biodisponibilidad de los fármacos y disminuir la variabilidad en las concentraciones plasmáticas. Por otra parte, las miniemulsiones de lípidos (ME) son dispersiones de aceite en agua con un tamaño de partícula en el rango de 100 nm hasta  $< 1 \mu\text{m}$ , estabilizadas por una capa interfasial de un tensioactivo y son sistemas comúnmente utilizados para encapsular, mantener y liberar moléculas de interés farmacológico.

En este contexto, los filmes monomoleculares de Langmuir (LF) en la interfase líquido/líquido se pueden utilizar como modelos experimentales para investigar el comportamiento dinámico de los tensioactivos en la interfase agua/aceite en una ME. La información obtenida a partir de LF nos permite definir parámetros tales como la densidad molecular máxima de los tensioactivos, la composición molecular, la solubilidad mutua de los componentes en la interfase y el área molecular media de los componentes en función de la presión lateral interfasial.

Hasta el momento, se ha aprendido mucho sobre monocapas de tensioactivos insolubles en la interfase agua-aire, pero no se han realizado suficientes esfuerzos para aplicar la metodología de monocapas en la interfase aceite/agua debido a las amplias dificultades experimentales que implica. Por lo tanto, en esta tesis se discute como eje central la aplicación de esta técnica para estudiar desde un punto de vista biofísico la composición y el comportamiento termodinámico de monocapas de fosfolípidos (EPC o DPPC) en la interfase vaselina/agua, cuyos resultados son utilizados luego para optimizar formulaciones de ME. Adicionalmente, con la intención de remarcar la versatilidad y utilidad de estos sistemas como potenciales candidatos en aplicaciones biomédicas se demuestra, mediante el uso de surfactantes sintéticos, cómo las partículas de una ME pueden utilizarse como molde en un proceso de polimerización interfasial para obtener así nanocápsulas de sílice útiles para encapsular sustancias de interés. A los fines de evaluar esta encapsulación se utiliza, de manera exitosa, la Dexametasona (DXM) como droga modelo.

---



*“El mejor científico es aquel que está abierto a la experiencia y que comienza con un romance, con la idea de que todo es posible.”*  
Ray Bradbury.

# Capítulo I

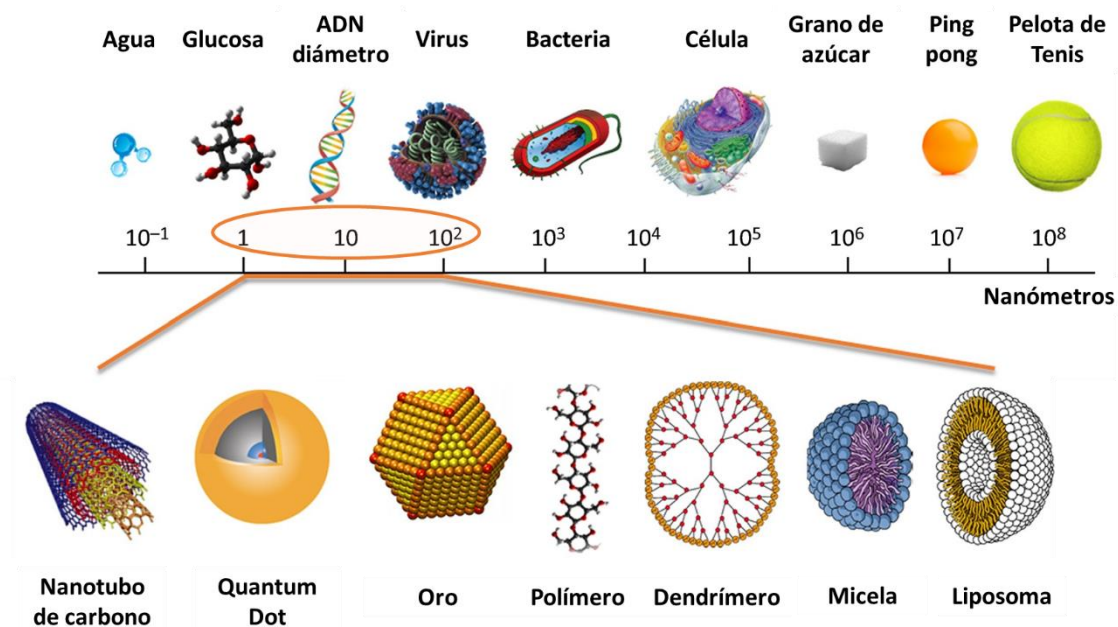
## *Introducción*

### **I.1. Introducción general. Nanobiotecnología**

La ciencia ha experimentado en las dos últimas décadas una nueva revolución, representada por dos nuevas disciplinas denominadas nanociencia y nanotecnología. La primera, es el campo de la ciencia que se dedica al estudio de los fenómenos, las propiedades y la manipulación de la materia en una escala nanométrica. Mientras que la segunda, es la ciencia e ingeniería de diseñar, sintetizar, caracterizar y aplicar materiales y sistemas de escala nanométrica. Implica técnicas y métodos de estudio, diseño, fabricación y manipulación de objetos nanométricos para crear materiales, dispositivos y sistemas en aplicaciones que aprovechan las propiedades de los nanomateriales. En esta escala, considerada en el rango de 1 - 100 nm, las propiedades de la materia difieren fundamentalmente de los átomos individuales o de los materiales masivos formados por los mismos átomos y, al manipular el sistema en la nanoescala pueden surgir propiedades únicas<sup>1</sup>.

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 científico sugirió por primera vez, la idea de manipular partículas o materiales a escala molecular y atómica. Más de una década después, en su trabajo titulado *“On the Basic Concept of Nanotechnology”*, el profesor Norio Taniguchi acuñó el término nanotecnología al describir estructuras con dimensiones ultrapequeñas. Sin embargo, no fue hasta la década de los años 1980 donde inició efectivamente la era de la nanotecnología. En esta época los científicos recién tuvieron las herramientas adecuadas para estudiar los sistemas en la nanoescala, como el microscopio de efecto túnel (STM, del inglés, *scanning tunneling microscope*) y el microscopio de fuerza atómica (AFM, del inglés *atomic force microscope*).

Aunque la nanociencia y la nanotecnología modernas son bastante nuevas, los materiales a nanoescala se utilizaron durante siglos. Partículas de oro y plata de distintos tamaños nanométricos crearon colores en las vidrieras de las iglesias medievales hace cientos de años. Los artistas en ese entonces simplemente no sabían que el proceso que usaron para crear estas hermosas obras de arte en realidad condujo a cambios en la composición de los materiales con los que estaban trabajando. Actualmente, a esta escala, los científicos pueden manipular átomos para crear materiales más fuertes, más livianos y eficientes con propiedades prediseñadas<sup>2</sup>. Se están encontrando una amplia variedad de formas de fabricar materiales a nanoescala para aprovechar sus propiedades mejoradas que sus contrapartes de mayor escala. Consecuentemente, algunos de los más grandes progresos que se realizaron en esta área, 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. Los principales ejemplos de moléculas y estructuras de interés dentro de este rango se encuentran ilustradas en la Figura 1, junto con otros objetos para comparación y referencia<sup>3</sup>.



**Figura 1. La nanoescala.**

Comparaciones en la escala nanométrica de nano -materiales y -(bio)estructuras (panel inferior) con elementos biológicos y objetos cotidianos para referencia (panel superior). En esta escala es claro que lo nano es más pequeño que una bacteria, pero más grande que átomos y moléculas simples (figura adaptada de la ref. 3).

Dadas las funciones inherentes a la nanoescala para los componentes biológicos de las células vivas, era inevitable que la nanotecnología se aplicara a las ciencias de la vida. Dichas aplicaciones dan lugar al término "*nanobiotecnología*"<sup>4</sup>. Este término describe la convergencia de los mundos de las ciencias biológicas, la ingeniería y la nanotecnología, para estudiar elementos existentes en la naturaleza que se puedan utilizar como inspiración o herramientas para fabricar nuevos dispositivos nanotecnológicos con aplicaciones o fines biológicos y bioquímicos.

La investigación y el desarrollo en nanotecnología incluye la manipulación controlada de las nanoestructuras y su integración como componentes de materiales, sistemas y arquitecturas complejas que presentan una estructura jerárquica. Es posible emplear dos tipos de enfoques para el diseño controlado de nanoestructuras: las técnicas "top-down" en las que se comienza con macro- o micro-materiales a los que se les incorporan detalles de estructuración en la nanoescala mediante fotolitografía, nanolitografía, nanomoldeado y nanofluídica<sup>5</sup>; y las "bottom-up" donde se empieza con la generación de unidades que luego se autoensamblan<sup>6</sup>. Las primeras logran un control relativamente bueno en la microescala, pero existen límites de resolución y precisión que causan un alto costo instrumental para controlar propiedades en el nivel nanoscópico con la especificidad y precisión requerida a escala molecular, sobre todo con biomoléculas cuya funcionalidad es muy sensible a estas alteraciones. Las segundas están típicamente representadas por las biomoléculas anfipáticas, las que poseen la capacidad intrínseca de auto-ensamblarse en estructuras de escala nanométrica.

Dada la capacidad de autoorganización "bottom-up" intrínseca de las biomoléculas, no se requiere elaborar moldes prediseñados, ni preensamblar o preconformar las biomoléculas con precisión externa para lograr una topografía/topología particular de la nanobioestructura, ya que las biomoléculas contienen la capacidad de autogenerar nanoestructuras definidas con propiedades específicas. De esta manera, emergen a nivel supramolecular propiedades, no presentes en las moléculas individuales, con la característica de ser sensibles a la modulación inducida por sutiles señales químicas, físicas o biológicas.

En consecuencia, en el caso de las nanobioestructuras no se requiere incorporar detalles de estructuración sino que sólo se requiere comprender los códigos moleculares que las determinan para direccionarlas a estructuras que tienen una respuesta biológica definida<sup>7</sup>.

En este sentido, la biofísica nos provee de las herramientas teóricas y experimentales para el estudio de estos nanosistemas basados en estructuras supramoleculares autoensambladas.

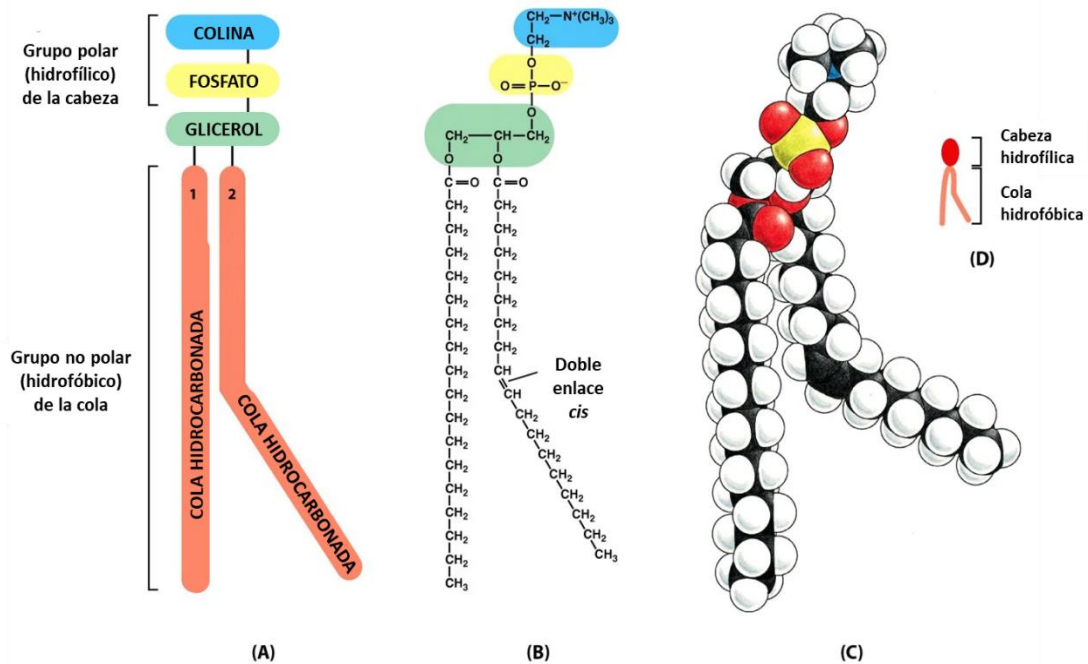
En el presente trabajo de tesis, se han seleccionado como objeto de estudio filmes ultradelgados nanoestructurados, partículas de nanoemulsión y nanocápsulas poliméricas para liberación-encapsulación y/o modificación química-estructural de sustancias bioactivas. En estos modelos por medio de la modulación recíproca sustancia-organización molecular del sistema, se estudiarán y controlarán fenómenos que emergen a nivel supramolecular cuando su unidad mínima molecular son fosfolípidos.

## **I.2. El interés en los lípidos y su polimorfismo**

Los lípidos comprenden un grupo heterogéneo de biomoléculas orgánicas ampliamente distribuidas en animales y vegetales. A pesar de que exhiben diferentes características químicas y considerables variaciones en su estructura molecular, presentan una propiedad física en común y es que son solubles en solventes orgánicos e insolubles o poco solubles en agua debido a la escasa polaridad de sus moléculas. Además, los lípidos no forman estructuras poliméricas como las de los aminoácidos o monosacáridos, por lo que su masa molecular no alcanza valores muy elevados.

Desde el punto de vista de la química biológica el estudio de los lípidos tiene especial interés porque desempeñan importantes y variadas funciones: a) Son componentes esenciales de los seres vivos; los lípidos que se encuentran en una célula están, en su mayor parte, asociados entre sí y con proteínas constituyendo parte fundamental de todas las membranas celulares. b) En los animales constituyen el principal material de reserva energética (grasas neutras). c) A nivel nutricional, adquieren importancia en los alimentos siendo significativas fuentes de energía por su alto contenido calórico y frecuentemente vehiculizan vitaminas liposolubles. d) Numerosas sustancias de importante actividad fisiológica se encuentran relacionadas con este grupo de compuestos tales como vitaminas, hormonas, ácidos biliares, etc<sup>8</sup>.

Por otra parte, desde el punto de vista fisicoquímico los lípidos son moléculas anfipáticas, es decir que su estructura molecular presenta una región hidrofóbica formada por cadenas hidrocarbonadas y una región hidrofílica o cabeza polar, cuya estructura química determinará si el lípido es no iónico, aniónico, catiónico o zwitteriónico (ver Figura 2).



**Figura 2. Estructura química genérica de la molécula de un fosfolípido.**

Estructura de una molécula de fosfatidilcolina representada (A) de forma esquemática, (B) según su fórmula química estructural semidesarrollada, (C) en un modelo espacial compacto y (D) como su modelo gráfico (simbólico) simplificado de uso habitual (adaptada de ref. 9). Note que el cambio de orientación de la cadena que contiene el doble enlace en configuración *cis* es meramente ilustrativo.

Cabe destacar que esta anfipaticidad es la característica más importante y distintiva de los lípidos porque los convierte en sustancias tensioactivas (también llamados surfactantes), es decir que son agentes que pueden modificar la tensión superficial en la superficie de contacto entre dos fases. En particular, en presencia de una interfase agua/aire las moléculas de lípidos orientarán sus cadenas hidrocarbonadas hacia el aire, mientras que sus grupos polares permanecerán en contacto con el medio acuoso. Como consecuencia, al encontrarse adsorbidos a la interfase formando un filme monomolecular modificarán las propiedades interfaciales del sistema y disminuirán así la tensión superficial del agua líquida.

Por el contrario, si los lípidos se dispersan en soluciones acuosas, las regiones hidrofóbicas interaccionarán entre sí, creando un espacio hidrofóbico del que el agua es excluida; mientras que los grupos hidrofílicos se orientarán hacia el medio acuoso,

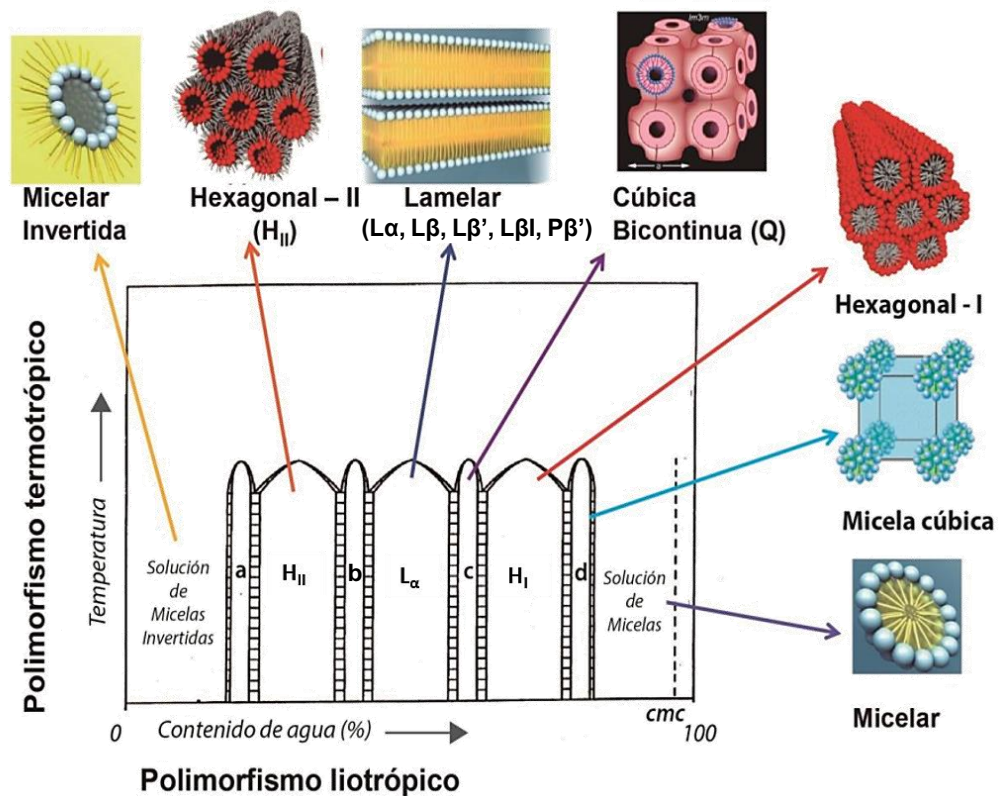
manteniéndose solvatados. Este fenómeno, que ocurre como consecuencia del “efecto hidrofóbico”, permite a los lípidos autoensamblarse en diferentes tipos de agregados supramoleculares como micelas, liposomas u otras fases no bicapa. Este proceso de autoorganización es altamente cooperativo e implica la participación simultánea de una gran cantidad de moléculas, donde el sistema aumenta su entropía debido a un incremento del desorden de las moléculas de agua.

Consecuentemente, si se preparan mezclas con cantidades extremadamente bajas de lípidos en agua, se observa que estos existen en el medio acuoso como monómeros libres. En este punto el sistema resultante podría considerarse como una solución de lípidos en agua. Ya que, en estas condiciones diluidas, las propiedades coligativas del sistema tales como presión osmótica, tensión superficial, conductividad, etc., exhiben un comportamiento ideal similar a las que se observan en las soluciones ideales de electrolitos. No obstante, a medida que la concentración de lípidos continúa incrementándose se observa un punto donde las propiedades coligativas del sistema se desvían de la idealidad. Este punto corresponde a la concentración de lípidos en la cual se produce la formación de agregados supramoleculares. En particular, la concentración a la que se produce este fenómeno se denomina concentración micelar crítica (CMC) cuando se hace referencia a la máxima concentración de monómeros de lípido en solución coexistiendo con estructuras micelares. Si las estructuras formadas no son micelares, es más correcto referirse a este término como concentración de monómero en equilibrio (EMC) o concentración de agregación crítica (CAC)<sup>10</sup>.

Los valores de CMC para anfifilos presentan una clara dependencia con el largo de la cadena hidrocarbonada, aunque la naturaleza química de su grupo polar también debe tenerse en cuenta. A medida que la cadena hidrocarbonada incrementa su longitud, el valor de la CMC disminuye, es decir, que las micelas se forman a menor concentración de lípido. Si se comparan, además, especies no iónicas con otras que presentan carga en su grupo polar, la CMC será mayor para estas últimas. A modo de ejemplo puede considerarse el caso de los glicerofosfolípidos DPPC y DCPC, cuya diferencia principal es el largo de sus cadenas hidrocarbonadas (16 y 10 átomos de C respectivamente), lo que resulta en valores de CMC de  $7 \times 10^{-10}$  M y  $5 \times 10^{-6}$  M, respectivamente. Mientras que algunos detergentes, de cadenas más cortas y otros grupos polares como el dodecilsulfato de sodio (SDS), presentan valores de CMC mayores (en el rango de  $10^{-3}$  M), lo que indica además una mayor solubilidad en agua.

De este modo, se puede dilucidar que las dispersiones de lípidos en agua o en mezclas agua/aceite resultan en sistemas polimórficos y complejos, donde el tipo de empaquetamiento que adopten los lípidos en solución, es decir la fase lipídica resultante, no será trivial y dependerá de varios parámetros tales como la geometría molecular, la rigidez de su parte hidrofóbica, el balance hidrofóbico-hidrofílico que presente, la concentración de lípidos, el pH, la temperatura, la presión y la fuerza iónica<sup>11</sup>.

Considerando esto, en la Figura 3 puede observarse un diagrama de fases hipotético que describe el comportamiento de un sistema lipídico con respecto a la temperatura (comportamiento termotrópico) y con respecto al contenido de agua (comportamiento liotrópico). Generalmente, las distintas estructuras lipídicas se clasifican según su organización de largo alcance, según la conformación de las cadenas hidrocarbonadas y según la curvatura adoptada por la fase<sup>12</sup>.



**Figura 3. Diagrama de fases hipotético lípido/agua.**

Se observan las transiciones que ocurren variando el contenido de agua o la temperatura. Las regiones denotadas a, b, c y d contienen fases intermedias, muchas de las cuales son cúbicas (figura adaptada de ref. 11 y 12).

Según esta clasificación, existen organizaciones de largo alcance como la lamelar (L) y micelar (M); bidimensional hexagonal (H), tridimensional cúbica (Q) y tridimensional

cúbica cristalina (C). En particular, las fases lamelares (bicapas lipídicas) presentan diferentes transiciones termotrópicas<sup>13</sup> y según el orden que adquieran las cadenas hidrocarbonadas existen fases fluidas ( $L\alpha$ ) donde las cadenas se encuentran desordenadas y se pierde la estructura de red y fases lamelares cristalinas ( $L_c$ ) comunes a bajas temperaturas y/o hidratación que exhiben un orden de corto y largo alcance en tres dimensiones. Además, existen fases ordenadas tipo gel dentro de las cuales pueden distinguirse la fase gel ( $L\beta$ ) con los lípidos en conformación *todo-trans* formando una estructura regular y la fase gel o también llamada líquido-cristalina ( $L\beta'$ ) altamente estructurada con los lípidos en conformación *trans* y con una inclinación respecto al plano de la membrana que depende del grupo polar del lípido<sup>14</sup>. Sin embargo, cuando ocurre la inserción de pequeñas moléculas (por ejemplo etanol, lidocaína, flunitrazepam<sup>15</sup>) en la región de grupos polares se puede formar la fase L gel interdigitada ( $L\beta I$ ), en la cual el área de sección transversal por cadena es similar a  $L\beta$ , pero con aproximadamente el doble del área disponible por grupo polar. Por último, también puede existir la fase gel ondulada ( $P\beta$ , del inglés “*rippled phase*”) que muestra ondulaciones periódicas en la superficie de la membrana. Esta fase se forma antes de la denominada transición de fase principal ( $L\beta' \rightarrow L\alpha$ ), y consiste en una fase lipídica parcialmente fundida con un menor ordenamiento que la fase  $L\beta$ , constituyendo un estadio intermedio que raras veces es detectable.

Finalmente, de acuerdo con la curvatura se puede distinguir entre estructuras tipo I cuando las cadenas hidrocarbonadas están orientadas hacia el interior del agregado (curvatura positiva) o de tipo II o invertida, cuando las cadenas hidrocarbonadas están orientadas hacia el exterior (curvatura negativa)<sup>16</sup>.

Por otra parte, las propiedades de empaquetamiento de moléculas anfipáticas dependen de factores termodinámicos acoplados a la geometría molecular<sup>17</sup>. La misma determina la interacción entre las moléculas en el agregado lipídico. Una geometría complementaria optimiza las interacciones intermoleculares de corto alcance del tipo Van der Waals en estructuras de distintas curvaturas.

Las restricciones, impuestas sobre la curvatura intrínseca (también llamada espontánea) de la interfase, derivadas de la geometría molecular están representadas en el parámetro crítico de empaquetamiento ( $P_c$ ) cuyo valor permite predecir el tipo de estructura de autoagregación molecular a formarse: micela, bicapa o fases no bicapa (hexagonal II o cúbicas bicontinuas)<sup>17</sup>, como se describe en la Tabla 1.



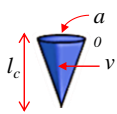






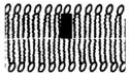

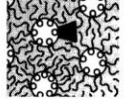
El parámetro crítico de empaquetamiento ( $P_c$ ) se define según <sup>18</sup>:

$$P_c = \frac{v}{a_0 \times l_c} \quad (1)$$

Donde  $v$  es el volumen del grupo hidrofóbico,  $a_0$  es el área de la cabeza polar y  $l_c$  es la longitud de la cadena hidrocarbonada.

Por lo tanto, conociendo los parámetros geométricos de cada lípido se puede predecir la estructura que formará al agregarse en medio acuoso. Sin embargo, puede suceder que un lípido con un determinado  $P_c$  no forme la estructura esperada. Por ejemplo, una molécula con un  $P_c > 1$  puede formar parte de una hemicapa perteneciente a una bicapa “plana”, cuya curvatura esperada es 0. En este caso la curvatura espontánea de la molécula es distinta de cero y la bicapa experimenta un estrés que deriva en una estructura “frustrada” o lo que se denomina como “frustración topológica”. Si las fuerzas de cohesión de la bicapa no compensan esta perturbación, se genera una transición desde la estructura lamelar a algunas de las fases no-lamelares. Es energéticamente más favorable para el sistema sufrir una transición de fase hacia una estructura donde las moléculas intervinientes se encuentren en su mínimo energético, de acuerdo con su  $P_c$ <sup>10</sup>.

**Tabla 1. Estructuras formadas por moléculas anfifílicas según su parámetro crítico de empaquetamiento.** Adaptada de ref.18.

Tipo de lípidos	Parámetro Crítico de empaquetamiento ( $P_c$ )	Geometría molecular	Estructuras formadas
Lípidos de una cadena (surfactantes) con grupos polares grandes.	$< 1/3$	Cono 	Micelas 
Lípidos de una cadena con grupos polares pequeños.	$1/3 - 1/2$	Cono truncado 	Micelas cilíndricas 
Lípidos con doble cadena y grupos polares grandes.	$1/2 - 1$	Cono truncado 	Bicapas curvas 
Lípidos con doble cadena y cabezas polares pequeñas.	$\sim 1$	Cilindro 	Bicapas planas 
Lípidos con doble cadena (insaturadas) y grupos polares pequeños.	$> 1$	Cono truncado invertido 	Micelas invertidas 

Entonces, se puede comprender cómo distintos tipos de lípidos pueden acomodar mutuamente sus geometrías a los fines de empaquetarse juntos en una biomembrana

(bicapa), ajustarse al tipo de curvatura adoptada por la monocapa externa (curvatura positiva) y la de la monocapa interna (curvatura negativa) y compensar la tensión de curvatura de la monocapa. Cualquier asimetría en las especies moleculares y/o en campos de fuerza a ambos lados de una membrana dará como resultado una configuración de equilibrio curvada. Esta asimetría puede ser generada por campos superficiales, como cambios en la densidad de anfifilos en una monocapa, configuraciones espaciales y de carga eléctrica de moléculas adsorbidas, así como valores límites de campos generados más allá de la membrana, en el seno de la solución, tales como la concentración de electrolitos y el pH.

Los cambios en la tensión de curvatura afectan el empaquetamiento de las cadenas hidrocarbonadas (a  $T > T_c$ ), el volumen del grupo polar<sup>19</sup> y, por ende, la hidratación de membrana y la hidrofobicidad de la interfase membrana-agua<sup>20-21</sup>. De esta manera, es posible afectar la organización y la electrostática de la membrana y, en consecuencia, modificar la adsorción de proteínas (y otras moléculas) solubles a la interfase lípido/agua, la velocidad y el mecanismo de reacciones interfaciales dependientes de la partición membrana-agua de sustratos y productos solubles<sup>22</sup> así como, la cinética de reacciones que utilizan como sustratos a componentes de membrana<sup>23</sup>.

Así pues, la naturaleza anfifílica de los lípidos y su complejidad estructural junto con su gran importancia biológica permitió que sean un objeto de estudio de interés en el área de la biofísica de biomembranas, de la química interfásial y de los sistemas coloidales. Es importante remarcar que nuestro conocimiento actual sobre la estructura y la función de las biomembranas, así como el concepto de bicapa lipídica, no hubiese sido posible si en el intento de comprender estos fenómenos de adsorción interfásial, no se hubieran logrado instaurar distintos modelos experimentales que permitan su estudio. Como consecuencia, estos mismos avances permitieron que los lípidos surgieran posteriormente como potenciales candidatos para diversas aplicaciones en industrias farmacéuticas, alimentarias o cosméticas, donde sus características estructurales también serían utilizadas como inspiración para sintetizar nuevos y mejores surfactantes.

El uso efectivo de fosfolípidos en alimentos, cosméticos, medicina y biotecnología requiere del conocimiento y de la comprensión de las propiedades termodinámicas y dinámicas de su química interfásial. En muchos casos, la aplicación de tensioactivos tiene lugar en condiciones no estacionarias, por lo que las propiedades dinámicas son de gran importancia<sup>24</sup>. Para poder estudiar un sistema tan variable y sensible a cambios en la

temperatura, en la presión, y en el potencial químico de sus componentes, es necesaria la utilización de modelos experimentales sencillos que permitan el adecuado control de las variables de interés y de las condiciones experimentales. De esta manera, se podrá caracterizar al sistema apropiadamente describiendo sus características generales de comportamiento y topología.

### **I.3. Nanoestructuras lipídicas como matrices para moléculas biológicamente activas**

Los lípidos, de origen vegetal o animal, han ganado un renovado interés como excipientes de formulaciones farmacéuticas para la administración de drogas hidrofóbicas por vía oral. Esto se debe a sus capacidades de aumentar la biodisponibilidad oral y disminuir la variabilidad en las concentraciones plasmáticas de vitaminas lipofílicas y drogas <sup>25</sup> así como, de péptidos y proteínas incluyendo vacunas orales <sup>26</sup>. Con fines similares, en la industria de alimentos el encapsulamiento de vitaminas adicionadas a alimentos funcionales y de enzimas ha cobrado un gran interés; un ejemplo de ello es el encapsulamiento de proteasa para evitar su acción prematura durante la maduración de los quesos <sup>27</sup> o, contrariamente, acelerar la maduración y simultáneamente evitar defectos en el sabor y en la textura aplicando cócteles de enzimas encapsuladas (proteasa, peptidasa y lipasa) <sup>28</sup>.

Las estructuras lipídicas más usadas como matrices para el encapsulamiento de moléculas bioactivas, tanto de moléculas hidrofóbicas como hidrofílicas, enzimas y DNA, son los liposomas (vesículas uni o multilamelares) constituidas por lípidos cuya geometría molecular cilíndrica permite su autoorganización bajo la forma de bicapas plegadas que encierran un interior acuoso. Otras formulaciones lipídicas muy usadas para encapsular moléculas hidrofóbicas son los líquidos (sólo triglicéridos) y las emulsiones (aceite + surfactante) líquidas o sólidas dependiendo, de la temperatura de transición de fase ( $T_c$ ) del lípido. Actualmente, el uso de fases cúbicas líquido cristalinas (por ej. sistemas de monooleína/agua) como matrices para estudiar enzimas inmovilizadas y moléculas pequeñas está cobrando un creciente interés <sup>29-32</sup>, particularmente en cómo y porqué la estructura del agregado lipídico cambia cuando un compuesto lipofílico se solubiliza en la matriz lipídica.

La polaridad y la estructura de la molécula encapsulada determinará si ésta se localiza en la interfase polar o en la región no polar de la capa lipídica y si puede afectar la curvatura interfásial del agregado provocando una transición de fase. La presencia de moléculas

atrapadas puede afectar la organización supramolecular, particularmente, la localización a nivel de las cabezas polares induce tensiones de curvatura<sup>19-21</sup> que pueden llevar a cambios catastróficos en la fase liotrópica y en el equilibrio termotrópico.

De este modo, las propiedades de empaquetamiento de los lípidos en estructuras tipo bicapas o no-bicapas depende de factores termodinámicos acoplados a las geometrías moleculares e implican un balance de las interacciones intermoleculares hidrofílicas e hidrofóbicas entre las moléculas. El tipo de estructura de autoagregación que forma una mezcla lipídica puede sufrir grandes cambios, dentro de estrechos rangos de composición, cuando la tensión de curvatura llega a un límite. Esto implica modificaciones en la estabilidad y se manifiesta con cambios en la forma y en el tamaño como reflejo de la evolución del agregado desde un tipo de organización que, debido al aumento en la proporción de alguno de sus componentes, se volvió inestable y debe migrar hacia otro tipo de organización más estable.

## **I.4. Nanopartículas de emulsión**

### **I.4.1. Definición, clasificación y nomenclatura**

En los últimos años ha habido un considerable interés principalmente dentro de las industrias alimentaria, farmacéutica y agroquímica en el uso de dispersiones coloidales para encapsular, proteger y suministrar componentes lipofílicos bioactivos, como nutraceuticos, medicamentos, vitaminas, antimicrobianos y antioxidantes<sup>33-35</sup>. Por lo tanto, una gran cantidad de investigaciones recientes se ha dedicado a la fabricación, caracterización y utilización de dispersiones coloidales que contengan partículas muy pequeñas como sistemas de liberación. En esta tesis se hará referencia a un tipo de dispersión coloidal que puede crearse a partir de componentes como agua, tensioactivos y aceites: las emulsiones.

Una emulsión puede definirse como un sistema heterogéneo de dos fases que consta de partículas estables finamente dispersas (fase interna) en una segunda fase continua, en la que es inmiscible. En la mayoría de los casos en los cuales se hace una emulsión con dos líquidos inmiscibles, uno de los líquidos es una fase acuosa y el otro una fase aceite u orgánica. Se utilizarán las abreviaturas provenientes del inglés W (water) y O (oil) para dichas fases, ya que en español las palabras agua y aceite empiezan por la misma letra.

Las emulsiones directas (aceite en agua, O/W), así como las emulsiones indirectas o inversas (agua en aceite, W/O), se pueden preparar y estabilizar con un agente emulsionante. Como se mencionó anteriormente, las moléculas anfifílicas exhiben afinidad simultánea por medios polares (agua) y medios apolares (aceite) y tienden a acumularse en la interfase de estas mezclas. Esta partición produce una disminución drástica de la tensión superficial de la interfase, facilitando la mezcla entre el agua y el aceite y, por tanto, la formación de la emulsión. Existen una gran variedad de surfactantes sintéticos y naturales que pueden utilizarse. Sin embargo, las fosfatidilcolinas (PC) son el grupo más prevalente entre los diversos tipos de fosfolípidos para ser utilizadas como agentes emulsionantes en la preparación de partículas de emulsión (principalmente para aplicaciones farmacéuticas). Esto se debe a que las PC son fosfolípidos comunes en las membranas biológicas y, por lo tanto, tienen como ventajas su carga neta neutra, su inocuidad química, su biocompatibilidad y biodegradabilidad<sup>36</sup>. Puede decirse que los lípidos son los surfactantes elegidos por la naturaleza, ejerciendo estos un rol “conciliador” en la estructura de los organismos vivos. Los distintos efectos que suscita el carácter anfifílico de estos compuestos confiere a los lípidos un papel importante entre las moléculas de la vida<sup>10</sup>.

El tipo de emulsión (directa o inversa) que se formará depende entre otros factores del balance entre las propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas del agente emulsificante. Generalmente, se cumple la regla de Bancroft, la cual establece que la fase continua de una emulsión es aquella en la que el emulsionante es más soluble. Además, la naturaleza anfipática de los surfactantes puede ser expresada en términos de una escala empírica que comúnmente se denomina balance HLB (balance hidrofílico-lipofílico). Este parámetro fue originalmente propuesto por Griffin hace más de 60 años y considera en su cálculo las distintas regiones presentes en la estructura molecular del tensioactivo<sup>37</sup>. A pesar de que sigue vigente y que con el tiempo se han descrito distintas y nuevas ecuaciones para su cálculo, uno de los mayores inconvenientes es que el número HLB se asigna al agente tensioactivo puro cuyo comportamiento suele diferir en solución. Por ello, actualmente se está tratando de lograr una transición hacia el uso del parámetro HLD (diferencia lipofílica-hidrofílica) que fue desarrollado originalmente por Salager a finales de 1970, el mismo es una propiedad del sistema y no del surfactante. y eso marca una gran diferencia<sup>38-39</sup>.

Paralelamente, otro aspecto importante a tratar es la denominación de los distintos tipos de emulsiones según el tamaño de las partículas de la fase dispersa, que aún es un tema

por resolver. A lo largo de la historia se han utilizado distintos términos como macro-, micro-, mini- y nano- emulsiones sin llegar precisamente a un consenso entre los autores en lo que respecta a sus definiciones. Sin embargo, puede considerarse que las macroemulsiones están formadas por partículas de diámetros entre 0,4  $\mu\text{m}$  hasta 100  $\mu\text{m}$ . Mientras que las microemulsiones son sistemas isotrópicos con diámetros menores a 100 nm (mayoritariamente de 10 a 50 nm)<sup>40</sup>, y no son emulsiones constituidas de pequeñas gotas como creyó *Schulman* al proponer esta denominación en 1959<sup>41</sup>, sino que consisten en sistemas monofásicos dentro de los cuales un surfactante particularmente eficaz hace posible la coexistencia, a escala casi molecular, de aceite y agua. Presentan microdominios, no necesariamente esféricos y generalmente interconectados que fluctúan rápidamente dentro del tiempo y el espacio<sup>42</sup>. Es importante aclarar que las microemulsiones muestran un comportamiento diferente al de las macro o nanoemulsiones y, en muchas situaciones, las terminologías de emulsión "aceite en agua (O/W)" y "agua en aceite (W/O)" no son aplicables a estos sistemas. Cuando las cantidades de aceite y agua en el sistema son comparables, hay una interpenetración de dominios de estructuras bicontinuas en equilibrio, produciendo estructuras más complicadas. Las microemulsiones son transparentes, tienen baja viscosidad, estabilidad termodinámica y la capacidad de formarse espontáneamente, sin la necesidad de proporcionar energía mecánica, y sus microestructuras son independientes del orden de adición de los excipientes. Se han utilizado diversas teorías para explicar la formación y estabilidad termodinámica de microemulsiones, sin embargo, su explicación excede los objetivos de la presente tesis donde el sistema de interés y objeto de estudio son las nanoemulsiones<sup>43</sup>.

El término nanoemulsión también se refiere a emulsiones nanométricas, pero se considera que su tamaño puede variar entre los 100-500 nm. Entrando en detalles, aquí encontramos también la denominación de miniemulsión (ME), que se considera un tipo de nanoemulsión, y que contempla dispersiones con partículas en el rango de 100 nm hasta < 1  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, estos términos suelen utilizarse de manera indistinta en la literatura, dado que la formulación de nanoemulsiones y miniemulsiones no presenta diferencias. En ambos casos se requieren métodos de alta energía (de fuerza mecánica) para su formación a diferencia de las microemulsiones que se forman espontáneamente.

Finalmente, como lo afirma *Steven Abbot*<sup>38</sup>, se debe aceptar que la situación es confusa y paradójica, dado que las microemulsiones son de tamaño nanométrico y

termodinámicamente estables, que las nanoemulsiones son pequeñas emulsiones que son cinéticamente estables por tiempos muy prolongados en condiciones adecuadas (pH, T, fuerza iónica, etc), que algunas personas llaman miniemulsiones a las nanoemulsiones y que las macroemulsiones son las únicas que se encuentran en el rango de los micrómetros y también son termodinámicamente inestables. Por lo tanto, para no crear al lector conflictos con estos términos, es importante aclarar que en esta tesis el concepto de miniemulsión (ME) será considerado un sinónimo de nanoemulsión (NE) y se usarán indistintamente.

## **I.4.2. Parámetros de estabilidad**

La noción de estabilidad de un sistema nanoemulsionado es por supuesto relativa, pero se refiere a la ausencia de cambios durante un período de tiempo suficientemente largo para el propósito de la aplicación práctica, lo cual puede variar de algunos minutos a algunos años. En ausencia de surfactante, la dispersión líquido-líquido coalesce rápidamente. En cambio, en presencia de un agente emulsionante, la emulsión puede presentar una cierta segregación gravitacional pero la coalescencia de las gotas es notablemente retardada.

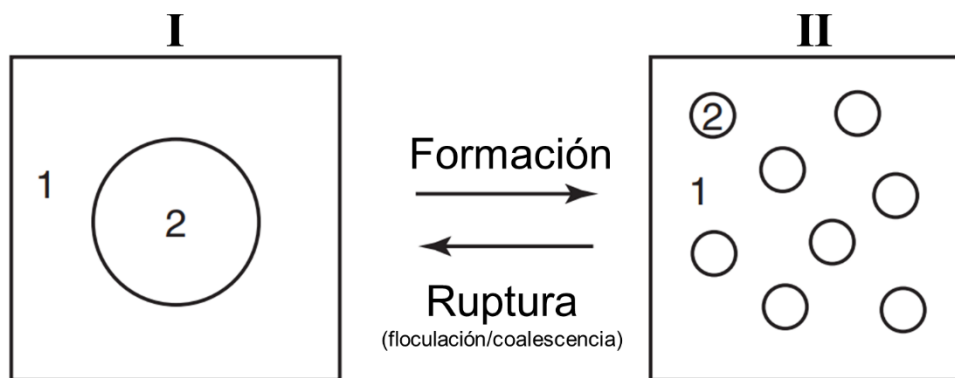
La estabilidad termodinámica de un estado particular (en este caso de una dispersión coloidal) está determinada por la diferencia de energía libre entre éste y un estado de referencia apropiado (en este caso las fases separadas de aceite y agua). Un sistema siempre tenderá a volver al estado con la energía libre más baja en algunas condiciones específicas (por ejemplo, composición, temperatura). Sin embargo, un sistema persistirá en un estado metaestable durante un período de tiempo considerable si es "cinéticamente estable". En general, la estabilidad cinética de un estado metaestable es gobernado por dos factores principales:

i) Barreras de energía: si hay barreras de energía (energías de activación) que separan los dos estados, esto ralentizará la conversión de un estado a otro.

ii) Fenómenos de transporte de masa: la velocidad a la que un sistema cambia de un estado a otro está determinada por la velocidad a la que los materiales presentes pueden reorganizarse en la nueva configuración. Esta reorganización estructural del sistema depende de los procesos de difusión y convección que determinan qué tan rápido se pueden mover los componentes.

Una nanoemulsión es un sistema termodinámicamente inestable, por lo que siempre se descompondrá si se le da el tiempo suficiente. La tasa de esta ruptura depende de la magnitud de la barrera energética entre la nanoemulsión y los estados separados, así como de los procesos específicos de transporte de masa involucrados. La altura de la barrera energética de activación determinará la estabilidad cinética de una nanoemulsión: cuanto mayor sea la barrera energética, más tiempo persistirá la nanoemulsión<sup>44</sup>.

En una primera aproximación, si se considera un sistema que existe en equilibrio entre una dispersión coloidal (nanoemulsión) y sus fases separadas (aceite y una solución acuosa de tensioactivo). Donde el aceite está representado por una gran gota 2 de área  $A_1$  sumergida en un líquido 1, que ahora se subdivide en una gran cantidad de gotas más pequeñas con un área total  $A_2$  ( $A_2 \gg A_1$ ); representado en la Figura 4. Se puede describir que el cambio de energía libre asociado a la formación de una dispersión coloidal ( $\Delta G^{\text{form}}$ ) involucra un término de energía libre interfasial ( $\Delta G_I$ ) y un término de entropía configuracional ( $T\Delta S^{\text{conf}}$ )<sup>45</sup>. A temperatura, presión y potencial químico interfasial constantes, el término de energía libre interfasial es igual al aumento del área de contacto entre las fases oleosa y acuosa ( $\Delta A$ ) multiplicado por la tensión interfasial ( $\gamma$ ) en la interfase agua/aceite ( $\Delta G_I = \gamma_{12}\Delta A$ ) \*.



**Figura 4. Esquema representativo de la formación y ruptura de una emulsión.**

Estado I: el aceite está representado por una gran gota 2 de área  $A_1$  sumergida en un líquido 1. Estado II: la gota de aceite se subdivide en una gran cantidad de gotas más pequeñas con un área total  $A_2$  sumergidas en el líquido 1. Figura adaptada de ref. 48.

\* El análisis anterior supone que la tensión interfasial de una monocapa de tensioactivo alrededor de una gota de aceite es la misma que en una interfase plana aceite/agua. Sin embargo, se sabe que la tensión interfasial depende de la curvatura de la monocapa de tensioactivo, disminuyendo a medida que la monocapa se acerca a su curvatura óptima, la cual depende de la geometría molecular de las moléculas de tensioactivo presentes<sup>46-47</sup>.



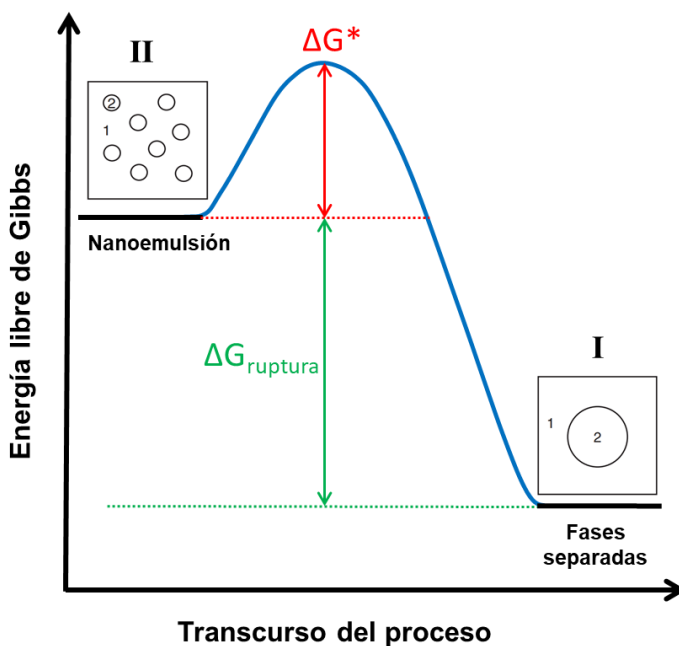
Por lo tanto, a partir de la segunda ley de la termodinámica, la energía libre involucrada en el proceso de formación de una emulsión puede definirse como el cambio de energía libre de formación al pasar del estado I al estado II a partir de dos contribuciones:

- i) Un término de energía interfasial (positivo) que es igual a  $\Delta A\gamma_{12}$  (donde  $\Delta A = A_2 - A_1$ ).
- ii) Un término entrópico de la dispersión que también es positivo (ya que la producción de una gran cantidad de gotas va acompañada de un aumento de la entropía configuracional), el cual es igual a  $T\Delta S^{conf}$ . Como se muestra en la Ec. (2):

$$\Delta G^{form} = \Delta A\gamma_{12} - T\Delta S^{conf} \quad (2)$$

En la mayoría de los casos,  $\Delta A\gamma_{12} \gg T\Delta S^{conf}$ , lo que significa que  $\Delta G^{form}$  es positivo, esto implica que la formación de emulsiones no es espontánea y el sistema es termodinámicamente inestable. En ausencia de cualquier mecanismo de estabilización, la emulsión se romperá o desestabilizará por floculación, coalescencia, maduración de Ostwald o por la combinación de todos estos procesos que serán explicados más adelante<sup>48</sup>.

En presencia de un estabilizador (tensioactivo), se crea una barrera de energía entre las gotas y, por lo tanto, la inversión del estado II al estado I se vuelve poco probable como resultado de la presencia de estas barreras de energía. Esto se ilustra en la Figura 5, donde en presencia de una energía de activación lo suficientemente alta entre ambos estados, el sistema se vuelve cinéticamente metaestable por tiempos prolongados, aunque termodinámicamente sea inestable.



**Figura 5. Esquema ilustrativo del perfil de energía libre de una nanoemulsión**

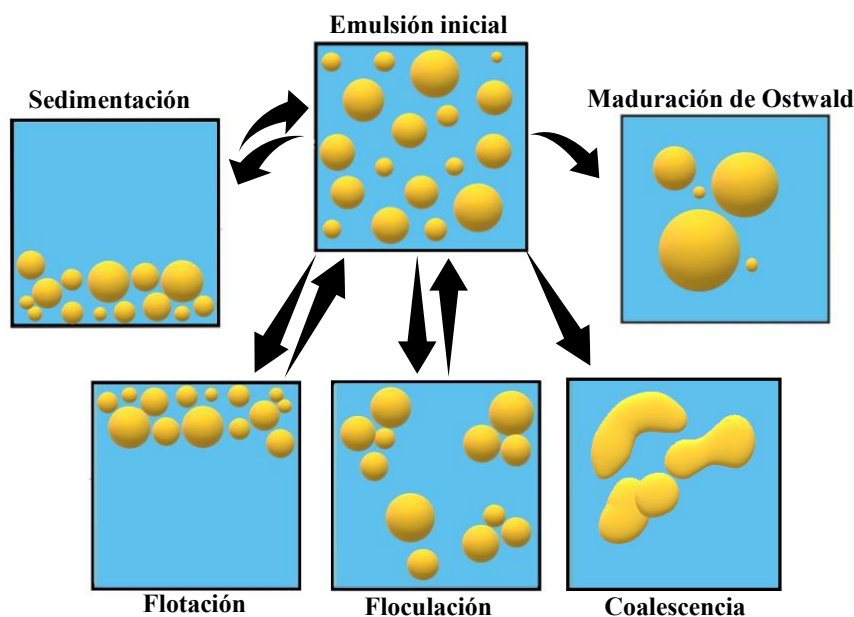
Las NE tienen mayor energía libre como dispersión que en el estado de separación de fases. En presencia de un agente emulsificante los dos estados están separados por una energía de activación  $\Delta G^*$  lo suficientemente alta como para conferirle al sistema una estabilidad cinética por tiempos prolongados. Si se analiza la coordenada del proceso del estado II (nanoemulsión) al estado I (fases separadas) la diferencia de energía libre entre ambos estados corresponde al proceso de ruptura o desestabilización de la emulsión ( $\Delta G_{ruptura}$ ).

Cuando se discute la estabilidad de un sistema emulsionado, es importante tener una idea clara de la condición física de los componentes y de la terminología empleada. El surfactante minimizará o evitará la separación de la emulsión en sus fases, o al menos la retardará aumentando su estabilidad cinética. De su formulación fisicoquímica dependerán los mecanismos de estabilización interfásica, tales como, la repulsión electrostática, la repulsión estérica, el potencial de flujo y la viscosidad interfásica. Sin embargo, la inestabilización de las emulsiones puede ocurrir debido a cuatro mecanismos o su combinación representados en la Figura 6: la sedimentación/flotación, la floculación, la coalescencia y la maduración de Ostwald<sup>49</sup>.

La **sedimentación** es un proceso causado por la diferencia de densidad entre las fases, donde las gotas se concentran sin variar su distribución de tamaño. Es un proceso reversible y puede recuperarse por agitación. Se considera sedimentación cuando las partículas se depositan en la parte inferior del recipiente contenedor (mayor densidad de la fase dispersa) y se denomina **flotación (o cremado)** cuando la fase dispersa se acumula en la superficie (mayor densidad de la fase continua).

La **floculación** es el proceso en el cual las gotas de emulsión se agregan/adhieren entre sí, pero no se fusionan debido a que su interfase permanece estabilizada por la monocapa de surfactante. Este fenómeno está controlado por un equilibrio global entre las fuerzas de atracción electrostáticas de van der Waals, y las repulsivas de tipo estéricas y de hidratación. Se observa un aumento aparente del tamaño de las partículas, pero no hay separación irreversible de fases. Por el contrario, la **coalescencia** es un proceso en el cual dos o más partículas de emulsión se fusionan para formar una gota más grande, hay ruptura y reorganización de la interfase líquido/líquido lo que conlleva a una separación de fases irreversible.

En las nanoemulsiones el mecanismo de inestabilidad predominante es la **maduración de Ostwald**, que se debe al crecimiento de las gotas más grandes a costa de las más pequeñas hasta que éstas últimas prácticamente desaparecen. Es un proceso irreversible y ocurre a una velocidad que depende de la solubilidad de la fase dispersa en la fase continua y de la temperatura<sup>38, 48</sup>.



**Figura 6. Mecanismos de desestabilización de emulsiones.**

Se ilustra como ejemplo una emulsión O/W y los posibles mecanismos que pueden afectar su estabilidad de manera reversible o irreversible produciendo separación de fases.

Para constatar la estabilidad de estos sistemas nanoemulsionados se pueden realizar mediciones del diámetro hidrodinámico ( $D_h$ ) de las partículas en función del tiempo y de su índice de polidispersidad (PDI), el cual es una medida del grado de variación en intensidad y volumen de las poblaciones de partículas presentes en la dispersión. Ambos parámetros se obtienen mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS) descrita en el Capítulo II, Sección II.2.5.3.1.

### **I.4.3. Formulación y preparación de emulsiones**

La formulación de emulsiones implica la selección de variables de composición y fisicoquímicas. En las primeras se hace referencia a las proporciones relativas de los constituyentes principales de un sistema: el surfactante, el agua y el aceite. Mientras que, en las segundas se incluyen los parámetros físicos (temperatura, presión) o químicos (naturaleza de los constituyentes principales y aditivos) susceptibles de influir sobre el sistema. Aquí se incluyen al menos tres componentes: la fase acuosa, la fase oleosa y el(los) surfactante(s).

Es importante considerar que la naturaleza química del surfactante seleccionado favorezca el tipo de emulsión que se pretende preparar (O/W o W/O). Además, se deben determinar las condiciones adecuadas de pH y fuerza iónica de la fase acuosa, como así

también el tipo de fase oleosa, que frecuentemente es el componente más difícil de describir de forma química. Esta tarea es especialmente dificultosa cuando se utilizan aceites industriales como los derivados de petróleo, petróleo crudo, aceites esenciales, aceites vegetales, etc. Como estos son mezclas muy diversas de hidrocarburos, se torna complejo describir el tipo y longitud de los hidrocarburos constituyentes y la presencia eventual de grupos funcionales. Asimismo, se debe establecer la concentración de la fase dispersa en el volumen total de la emulsión, la temperatura y la presión hidrostática de trabajo <sup>42</sup>.

En cuanto a la preparación de emulsiones, se puede considerar que el proceso de emulsificación incluye dos pasos mecánicos: primero, la deformación y ruptura de las gotas, que aumentan el área específica de la emulsión, y segundo, la estabilización de estas interfases recién formadas por los tensioactivos <sup>50</sup>. En general, su preparación requiere de energía mecánica, donde un aumento de la energía aplicada produce una disminución en el tamaño de la gota. Esto se encuentra asociado a un aumento de viscosidad de la emulsión y de sus propiedades reológicas, lo que se traduce en una mayor estabilidad. En este punto, la duración del proceso también es un factor de importancia, incrementar el tiempo de emulsificación implica un aumento de la energía total suministrada al sistema por lo que se produce una disminución del tamaño de la partícula, así como de la polidispersión en la distribución. Sin embargo, existe un límite donde aumentar el tiempo (sin variar la potencia aplicada al sistema) no produce mejoras significativas en la disminución del diámetro de las gotas y sólo aumenta el costo del proceso.

Se han desarrollado diversas técnicas de emulsificación para producir gotas desde una escala micrométrica a nanométrica y que se pueden utilizar para llevar a cabo una reacción interfásial. El control sobre el tamaño y la forma de la gota formada, además de la velocidad de formación, son los criterios principales para preferir una técnica sobre la otra <sup>51</sup>. En el caso de la síntesis de gotas a escala micrométrica, las técnicas más utilizadas para su formación son membranas, microcanales y dispositivos de microfluidización <sup>52</sup>. Por el contrario, las nanoemulsiones generalmente se forman mediante la aplicación de altas fuerzas de cizallamiento, a través de ultrasonificación <sup>53</sup> u homogeneización a alta presión <sup>54</sup>, pero también se puede aplicar la formación espontánea (efecto Ouzo <sup>55</sup> y fenómeno de inversión de fase <sup>56</sup>).

#### **I.4.4. Desafíos vigentes en la formulación de emulsiones**

A pesar de que las emulsiones han estado en uso durante miles de años (incluso más tiempo si se consideran las emulsiones naturales), aún no se ha desarrollado una teoría integral que cuantitativamente pueda describir y predecir las complejas características de las emulsiones en lo referente a su formulación, formación y estabilización. Excepto en áreas muy limitadas y especializadas, la predicción precisa de aspectos referentes a la preparación de emulsiones tales como el tamaño de gota, su distribución, su estabilidad, entre otros, queda relegada más al campo de lo empírico que de la ciencia<sup>49</sup>.

Para conseguir una completa descripción teórica de las emulsiones, una teoría debería ser capaz de explicar y predecir de manera fehaciente todos los aspectos de la formación y estabilidad de los distintos tipos de emulsión (O/W o W/O). Entre ellos pueden nombrarse la influencia de los factores ambientales (temperatura y presión), el papel de los emulsionantes y estabilizantes y sus estructuras químicas, el rol de las estructuras químicas de las fases inmiscibles, y los efectos de los aditivos en cada fase, entre otros. Sin embargo, este objetivo representa aún una meta muy inalcanzable, como lo ilustra el hecho de que a pesar de que se disponen de grandes cantidades de datos experimentales relacionados con cada uno de estos aspectos, aún no ha aparecido una teoría general aplicable.

Como consecuencia, invertir recursos en técnicas que permitan obtener información respecto a los fenómenos interfasiales que ocurren en una partícula de emulsión, así como indagar desde una perspectiva biofísicoquímica los parámetros que están involucrados en su formulación y estabilidad es de gran interés. El proceso de preparación de ME es muy complejo y presenta muchas variables asociadas, debido a esto es necesario utilizar un modelo de estudio que proporcione una visión simplificada de la realidad con variables que puedan ser controlables y de cuyo análisis puedan obtenerse datos significativos para su posterior utilización en un sistema más complejo. En este sentido, un modelo muy valioso pero que no ha sido suficientemente utilizado son las monocapas de Langmuir en la interfase líquido/líquido y agua/aire, cuya importancia y fundamento se explica a continuación.

## I.5. Filmes de Langmuir como modelos de estudio

### I.5.1. Importancia histórica

Las propiedades físicas y funcionales de sistemas tridimensionales como lo son emulsiones, biomembranas y liposomas se encuentran íntimamente relacionadas con el empaquetamiento y la estructura molecular. En este contexto, las monocapas de Langmuir (LF, por su denominación en inglés “*Langmuir films*”), constituyen uno de los modelos más importantes en el área de la Biofísica para el estudio de interfases fluidas. Cuando los lípidos anfipáticos son disueltos en un solvente volátil y luego sembrados sobre una interfase agua/aire (A/W) o en una interfase agua/aceite (O/W), los mismos se esparcen ocupando toda el área disponible y se autoensamblan formando una capa monomolecular plana. Así, el filme resultante (de una molécula de espesor) nos permite obtener información detallada para evaluar las interacciones laterales entre diferentes lípidos controlando su empaquetamiento molecular en su nivel más fundamental.

Las monocapas de Langmuir en la interfase A/W son un modelo muy conveniente para estudiar, entre otras cosas, las interacciones de empaquetamiento lateral de los lípidos en cada hemicapa de una membrana biológica<sup>10</sup>. Mientras que, cuando los lípidos son sembrados en una interfase O/W, se obtiene un sistema modelo de utilidad para el estudio de emulsiones.

Como breve reseña histórica, la técnica de monocapas en la interfase agua/aire fue implementada originalmente por la científica alemana Agnes Pockels, quien diseñó la cuba que se emplea actualmente. Sin embargo, no fue hasta 1891 que logró, con la ayuda de Lord Rayleigh, publicar en la revista *Nature* sus experimentos sobre tensión superficial que llevaba a cabo en su hogar con los elementos que tenía a su alcance<sup>57</sup>. Posteriormente, en 1917 Irving Langmuir que se encontraba trabajando en la empresa General Electric e investigaba sobre química de superficies, perfeccionó esta técnica y en 1932 fue galardonado con el Premio Nobel. La cuba que se utiliza actualmente se denomina cuba o balanza de Langmuir y a los filmes lipídicos insolubles en la interfase agua/aire, monocapas de Langmuir (LF<sub>A/W</sub>) en honor a sus valiosas contribuciones en el área de la química interfasial.

Desde esa época, como resultado de muchas investigaciones, particularmente de Langmuir, Adam, Rideal y colaboradores<sup>58</sup>, se conocieron con cierto detalle las propiedades

fisicoquímicas y estructurales de los filmes insolubles en la interfase A/W. Posteriormente, gracias al avance de la tecnología y al desarrollo de nuevas técnicas microscópicas se adquirió más conocimiento sobre este sistema<sup>59,60</sup>. A pesar de ello, es destacable que no se realizaron esfuerzos suficientes para aplicar la metodología de monocapas en la interfase O/W<sup>61-63</sup> y progresar en su estudio, debido a las amplias dificultades experimentales que implica. Se deben tomar estrictas precauciones para obtener presiones interfasiales precisas<sup>64</sup> y una buena reproducibilidad, además de que el proceso de difusión molecular en esta interfase presenta complejos problemas<sup>65,66</sup>. Sin embargo, en el contexto científico-tecnológico actual y en pleno auge de la Nanobiotecnología, surge la oportunidad de revalorizar esta técnica y sus aplicaciones<sup>67</sup>.

## I.5.2. Fundamentos teóricos

Como se detalló en la sección I.2, una molécula anfipática presenta una región hidrofóbica y una región hidrofílica o cabeza polar y dependiendo de la estructura de su cabeza polar, el surfactante puede ser no-iónico, aniónico, catiónico o zwitteriónico<sup>68</sup>. Brevemente, el fundamento de la técnica de LF se basa en la optimización energética de estas moléculas anfipáticas en la interfase agua/aire ( $LF_{A/W}$ ) o en la interfase agua/aceite ( $LF_{O/W}$ ), donde las mismas orientan sus cadenas hidrocarbonadas hacia el aire (o hacia el aceite) y sus grupos polares al medio acuoso. Este fundamento básico es válido tanto para los  $LF_{A/W}$  como para los  $LF_{O/W}$ , no obstante, se debe considerar que, al tratarse de sistemas diferentes, el instrumental y la metodología experimental aplicada es disímil. Estas diferencias serán explicadas detalladamente en el Capítulo II y en esta sección se explicarán de manera general los fundamentos teóricos que validan a ambos sistemas. Debido a que el modelo de  $LF_{A/W}$  presenta menor complejidad, se utilizará para ejemplificar los conceptos teóricos.

Para comprender este modelo físico, se debe recordar que al ubicarse en una interfase agua/aire, los lípidos se comportan como surfactantes al producir una disminución de la energía libre de superficie, la cual puede cuantificarse mediante medidas de tensión superficial,  $\gamma$ . La tensión superficial es la fuerza, debida a la atracción molecular no balanceada, que tiende a empujar las moléculas al interior de una fase líquida para minimizar el área de superficie expuesta. Si se considera un líquido, en equilibrio con su vapor, puede determinarse que existe una región donde la densidad de la materia, energía y entropía,

experimentan una transición. Esta zona se conoce como región interfásial y esta situación puede analizarse mediante la introducción de una superficie divisoria imaginaria matemáticamente<sup>69</sup>.

Cuando la interfase es plana, y la superficie divisoria se ubica en la posición conocida como “superficie de tensión” puede ser demostrado que para cualquier variación del equilibrio es válida la Ecuación (3):

$$\gamma = \left. \frac{\partial G}{\partial A} \right|_{T,P,n_i} \quad (3)$$

donde la tensión superficial ( $\gamma$ ) es la derivada parcial de la energía libre de Gibbs del sistema con respecto al área interfásial cuando la temperatura, la presión y las cantidades molares de todos los componentes en el sistema son constantes.

Cuando se estudian monocapas insolubles sobre superficies líquidas, al igual que filmes adsorbidos, lo que puede medirse experimentalmente es la diferencia de la tensión superficial de la interfase limpia con respecto a la superficie con el filme lipídico. Esto permite introducir el concepto de presión superficial como la fuerza ejercida por el filme, permitiendo la simple interpretación de la tensión superficial en términos de fuerzas intermoleculares. Por lo que la presión superficial,  $\pi$ , puede considerarse como la reducción de la tensión superficial del líquido puro (interfase limpia) producida por la presencia del filme, según la Ecuación (4):

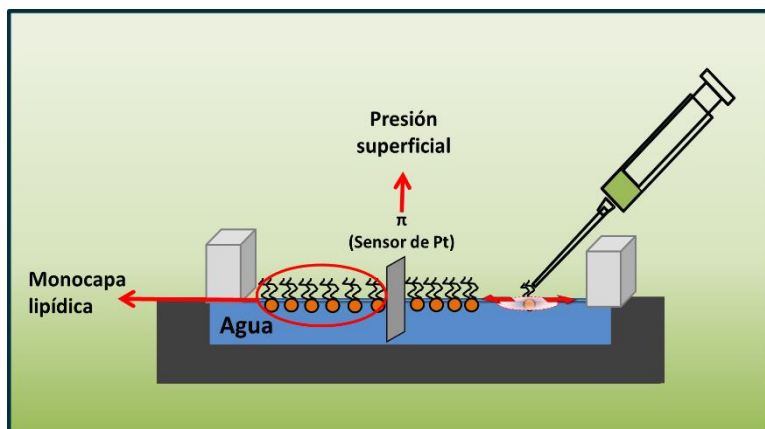
$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (4)$$

donde  $\gamma_0$  y  $\gamma$  representan la tensión superficial o interfásial en ausencia o en presencia de una monocapa, respectivamente<sup>70</sup>. En el caso de una interfase A/W,  $\pi$  se define como presión superficial, mientras que en una interfase O/W como presión interfásial.

En su configuración más básica, la balanza de Langmuir permite controlar el área superficial de la monocapa mediante la utilización de un sistema de barreras que varía su posición relativa para disminuir (comprimir) o incrementar (descomprimir) el área disponible de la cuba. Durante este proceso de compresión o descompresión y en función del área disponible para una cantidad conocida de moléculas de lípidos, el equipo permite medir la presión superficial mediante el método de la placa de Wilhelmy. La medición se realiza a temperatura constante, y el gráfico obtenido se denomina isoterma de presión



superficial vs. área molecular promedio ( $\pi$ -MMA). De manera ilustrativa en la Figura 7 puede observarse la configuración tradicional de este equipo cuando se estudian monocapas en la interfase A/W.

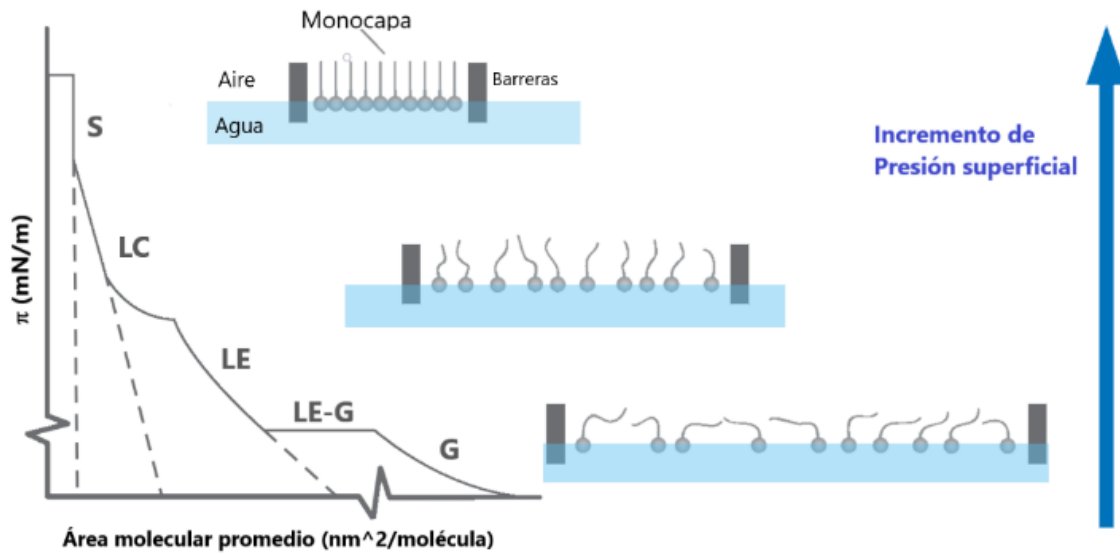


**Figura 7. Monocapas en la interfase agua/aire.**

Representación gráfica de la balanza de Langmuir, indicando la orientación de los lípidos anfipáticos en la interfase A/W al formar una monocapa. Los mismos son sembrados mediante una microjeringa a partir de una solución en un solvente volátil.

Cuando el área disponible para la monocapa es grande, las interacciones entre las moléculas de fosfolípidos son débiles, debido a la gran distancia existente entre ellas. En estas condiciones, la monocapa puede ser considerada como un gas en dos dimensiones, y el efecto producido sobre la tensión superficial del agua es leve. Sin embargo, al reducir el área superficial disponible, se produce un aumento en la concentración de las moléculas por unidad de área, lo que se traduce en una disminución de la energía libre de superficie (tensión superficial) y se evidencia por un incremento en la presión superficial.

Es importante destacar que, durante la compresión, la isoterma  $\pi$ -MMA de monocapas mezcla de lípidos con otras moléculas, puede presentar cambios relativamente suaves en la pendiente o discontinuidades que pueden indicar la exclusión<sup>71-72</sup> o la desorción<sup>73-74</sup> de moléculas desde la interfase o un colapso parcial de componentes de la monocapa. Pero, en monocapas de lípidos puros, como se ejemplifica en la Figura 8<sup>75</sup>, estos cambios indican transiciones de fases (dependientes de la  $T^\circ$ ) con distintos empaquetamientos laterales, permitiendo la existencia de cuatro estados diferentes: gaseoso (G), líquido expandido (LE), y dos estados condensados de distinta compresibilidad, el líquido condensado (LC) y el sólido (S). Eventualmente, la monocapa alcanza un punto de colapso, en el que se forman estructuras tridimensionales, y que se caracteriza por una rápida disminución de la presión superficial o un quiebre horizontal de la isoterma<sup>76</sup>.

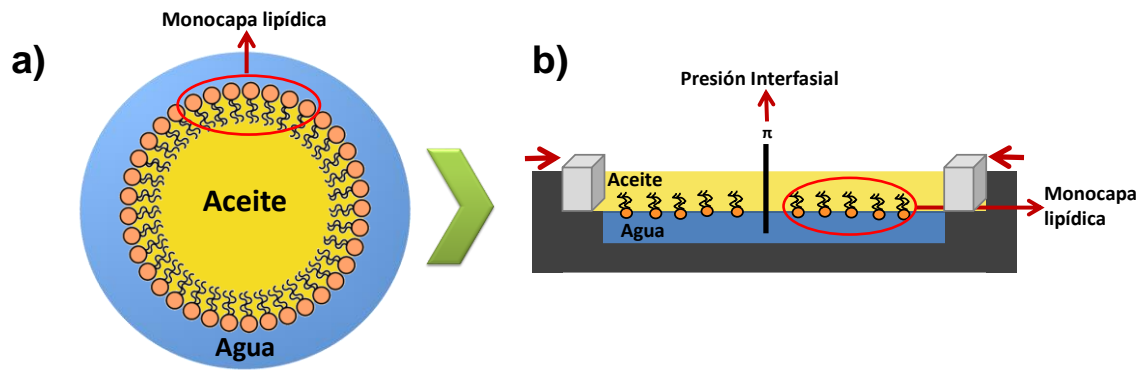


**Figura 8. Esquema de una isoterma de presión superficial vs. MMA.**

Esquema ilustrativo de los distintos estados de fase que pueden presentarse a medida que  $\pi$  aumenta: gaseoso, líquido-expandido, líquido-condensado y sólido (adaptada de ref. 75).

### I.5.3. Monocapas de Langmuir en la interfase agua/aceite

Como se expuso en la sección I.4, las miniemulsiones de lípidos son dispersiones de aceite en agua estabilizadas por una capa interfasial de un tensioactivo y son sistemas comúnmente utilizados para encapsular, mantener y liberar moléculas de interés farmacológico. En este contexto, los filmes monomoleculares de Langmuir en la interfase líquido/líquido ( $\text{LF}_{\text{O/W}}$ ) se podrían utilizar como modelos experimentales para investigar el comportamiento dinámico de los tensioactivos en la interfase agua/aceite en una ME (ver Figura 9) y así aportar valiosa información para su diseño racional. La información obtenida a partir de  $\text{LF}_{\text{O/W}}$  nos permitiría definir parámetros tales como la densidad molecular máxima de los tensioactivos, la composición molecular, la solubilidad mutua de los componentes en la interfase y el área molecular media de los componentes en función de la presión lateral interfasial.



**Figura 9. Modelo de estudio de la interfase O/W en una partícula de emulsión.**

En (a) puede observarse un dibujo ilustrativo de una partícula de emulsión dónde se destaca la interfase agua/aceite, que puede ser estudiada mediante (b), la técnica de monocapas de Langmuir en la interfase agua/aceite.

### I.5.4. Técnicas asociadas a monocapas de Langmuir

Las monocapas de Langmuir, se conocen desde hace 100 años aproximadamente, pero hasta hace unos 30 años sólo podían ser utilizadas para la medición directa de interacciones laterales de lípidos mediante el estudio de las isothermas  $\pi$ -MMA y diferencia de potencial eléctrico ( $\Delta V$ ) vs. MMA. Esto permitió muchas discusiones sobre la estructura, la termodinámica y la orientación dipolar de las moléculas y sus grupos funcionales en la interfase; sin embargo, el área de la Biofísica encontró un gran avance en la década de los ochenta a través del desarrollo de nuevos métodos para caracterizar estos sistemas. Entre ellos se encuentran: diversas microscopias<sup>77-80</sup>, espectroscopias<sup>81-82</sup>, técnicas de dispersión de luz<sup>83-85</sup> y la transferencia de filmes a soportes sólidos<sup>86-88</sup>, entre otros. De este modo las balanzas de Langmuir se convirtieron en plataformas versátiles que pueden acoplarse a otras técnicas experimentales para permitir una caracterización más detallada del objeto de estudio, siendo herramientas útiles en muchas áreas de la ciencia y la ingeniería<sup>89</sup>.

Algunas de las técnicas más utilizadas y que serán explicadas con mayor detalle en el Capítulo II son:

1. Microscopía de Ángulo de Brewster (BAM): esta técnica se basa en las propiedades de reflectividad de la luz en interfaces. Su empleo permite el estudio de la topografía de los anfifilos en la interfase A/W *in situ* sin requerir del uso de sondas fluorescentes, además se pueden observar transiciones de fase en función de su diferencia de espesor y/o índice de refracción.

2. Microscopía de Epifluorescencia (EFM): mediante la inclusión de una baja proporción (0,5-1 % mol/mol) de un lípido que contiene un grupo fluoróforo en una mezcla de lípidos de interés, se puede observar la coexistencia de fases en una monocapa de Langmuir. Estas sondas fluorescentes anfipáticas generalmente poseen grupos fluoróforos voluminosos por lo que tienden a particionar preferencialmente en la fase más expandida. Así, se puede distinguir entre fases expandidas que se observan más brillantes y fases más compactas o condensadas que se visualizan como zonas oscuras.
3. Microscopía de Epifluorescencia Confocal Espectral: su fundamento se basa en la técnica de EFM, pero la ventaja de este tipo de microscopía es la posibilidad de realizar espectros de emisión de fluorescencia excitando la sonda fluorescente presente en la mezcla lipídica a distintas longitudes de onda. Esta información es de importancia cuando se utilizan sondas fluorescentes solvatocrómicas, cuyo espectro de emisión puede variar según el entorno (polar o apolar) en el que se encuentren estas moléculas.
4. Monocapas/bicapas soportadas: una monocapa obtenida en una balanza de Langmuir puede ser transferida a un soporte sólido cuya superficie puede ser hidrofílica o hidrofóbica, para así obtener monocapas o multicapas altamente organizadas del anfifilo. Los métodos de transferencia más utilizados son Langmuir-Blodgett (LB) o Langmuir-Schaefer (LS).

Si la monocapa se encuentra a una presión superficial tal que las moléculas están suficientemente cercanas unas de otras, y la superficie del soporte sólido es adecuada, la monocapa puede transferirse cuantitativamente al sólido. Estos filmes depositados en una superficie permiten su posterior estudio mediante distintos tipos de microscopías, por ejemplo, microscopía de fuerza atómica (AFM) o microscopía de epifluorescencia (EFM) si la mezcla lipídica incluye una sonda fluorescente.

## **I.6. Nanoemulsiones como plataformas para la encapsulación de drogas y enzimas**

En el contexto de la Nanobiotecnología, se ha impulsado el rápido desarrollo de técnicas que permiten la preparación de nanoportadores para aplicaciones que requieren de una encapsulación de alta eficiencia y del suministro controlado de medicamentos, colorantes, enzimas, entre otros<sup>90</sup>. Asimismo, el diseño de nanoportadores bio-sensibles que

puedan liberar fármacos en respuesta a estímulos del medio, como variaciones en el pH o potencial redox<sup>91</sup> ha adquirido una gran importancia. En este sentido, la formulación de miniemulsiones (ME) ha ganado un creciente interés debido a que las características del sistema pueden ser modificadas de acuerdo con los requerimientos de la molécula a transportar y además pueden ser utilizadas como plataformas para llevar a cabo otras reacciones químicas<sup>92</sup>.

En particular, la alta estabilidad de las gotas, garantizada por la combinación adecuada de fase acuosa, oleosa y surfactante, permite que cada una de estas gotitas sea considerada como un nanoreactor individual con potencial suficiente para que se realicen una gran variedad de reacciones de polimerización<sup>50, 93</sup>. Los ejemplos encontrados en la literatura van desde la polimerización radical controlada, la polimerización aniónica o catiónica, la polimerización enzimática y la reacción en cadena de la polimerasa hasta reacciones de poliadición y policondensación<sup>94</sup>. Este tipo de reacciones en la interfase líquido/líquido son de gran potencial en el área de la química sintética y se han convertido en plataformas importantes para la química moderna, ya que en la mayoría de los casos las técnicas de formulación permiten el uso del agua como segunda fase<sup>51</sup>. Esto es una gran ventaja debido a la creciente preocupación medioambiental que demanda el uso de solventes y de productos químicos amigables con el medio ambiente<sup>95</sup>.

Si las condiciones son apropiadas, las partículas de emulsión iniciales funcionarán como moldes para dar origen a un sistema coloidal formado por partículas con un núcleo líquido y una cubierta polimérica. Estas partículas se denominan comúnmente como Nanocápsulas (NCs) y pueden sintetizarse a partir de polímeros sintéticos o naturales. En este contexto, la versatilidad que ofrece la química del silicato como precursor polimérico ha permitido la obtención de diversos nanoportadores funcionales mediante la modificación de las propiedades de su superficie externa. Esto se logra con derivados de silano funcionales que dan lugar a superficies reactivas que permiten una mayor conjugación química con ligandos de direccionamiento, así como variaciones en sus cargas superficiales y en su polaridad. Dado que es posible fusionar varias funcionalidades en un solo transportador, los materiales a base de sílice son muy buenas opciones para aplicaciones biomédicas<sup>96</sup>.

Un caso que destaca la versatilidad de estos sistemas poliméricos son las estrategias basadas en la incorporación de puentes disulfuro. Las mismas han adquirido importancia en los últimos años debido a que el enlace disulfuro es un grupo funcional extremadamente

valioso en una variedad de procesos químicos y biológicos <sup>97-99</sup>. Además, aquellos sistemas que incorporan este tipo de estrategia han demostrado un mayor rendimiento terapéutico, biocompatibilidad, estabilidad en el torrente sanguíneo y una alta eficiencia, ya que pueden llegar a su sitio de acción adecuadamente y el fármaco puede acumularse en concentraciones más altas en el tejido blanco <sup>100</sup>.

A causa de sus prometedores efectos terapéuticos, los nanoportadores para la administración dirigida de moléculas de interés farmacológico son un campo activo de investigación. Se espera que puedan llegar de manera específica a las células blanco, liberando controladamente la carga asignada y protegiéndola al mismo tiempo durante su camino al sitio de acción <sup>101-102</sup>. Sin embargo, para este tipo de aplicaciones, el nanoportador debe cumplir con importantes propiedades funcionales: necesita una gran capacidad de carga para aumentar el efecto terapéutico, debe evitar la absorción celular inespecífica y debe exhibir una adecuada vida media en circulación sanguínea para lograr una alta actividad específica en el tejido blanco. Además, el nanocontenedor debe ser biodegradable, pero sólo después de la absorción y liberación de las moléculas bioactivas en el sitio deseado <sup>103</sup>.

Teniendo en cuenta todos estos requisitos, se puede considerar que las emulsiones son sistemas con gran potencial para convertirse en excelentes plataformas de liberación, pero su formulación no podrá ser perfeccionada si no se conocen suficientemente los fundamentos biofísicoquímicos que las regulan, y tampoco si no se presta atención a sus posibles aplicaciones en distintas áreas (biomédica, cosmética, alimentaria). Debido a esto, en el presente trabajo de tesis, se consideró oportuno demostrar también cómo un sistema nanoemulsionado puede ser de gran utilidad en el área de la biomedicina cuando es utilizado como una plataforma molde que sirve para la vehiculización de un fármaco modelo y a su vez para el diseño, la síntesis y la funcionalización de nanocápsulas de sílica.

## **I.7. Hipótesis**

“En micro y nanopartículas de base lipídica, la relación estructura/composición condiciona su estabilidad frente a las condiciones fisicoquímicas de su entorno y les confiere una dinámica que se puede modelar mediante estudios en filmes de Langmuir”.

## **I.8. Objetivos**

### **I.8.1. Objetivo general**

A partir de conceptos sobre dinámica de la organización supramolecular de mezclas constituidas por fosfolípidos y aceites, evaluar su capacidad, para formar nanopartículas que permitan encapsular, mantener y liberar controladamente moléculas de interés farmacológico.

### **I.8.2. Objetivos específicos**

1. Evaluar el comportamiento termodinámico y reológico de fosfolípidos en la interfase aceite mineral/agua.
2. Definir condiciones en las que mezclas aceite mineral-agua en la interfase agua/aire permitan observar y analizar termodinámicamente la emergencia de la interfase líquido/líquido y su evolución espacial.
3. Correlacionar las propiedades moleculares de monocapas en la interfase líquido/líquido con el comportamiento de partículas de emulsión de aceite mineral estabilizadas con fosfolípidos, dispersas en agua.
4. Formular partículas de emulsión, capaces de funcionar como microreactores para la síntesis interfasial de silicatos, destinadas a la fabricación de nanocápsulas sólidas, con corazón hidrofílico o hidrofóbico.
5. Evaluar la capacidad de las nanocápsulas para atrapar moléculas y liberarlas en respuesta a un estímulo externo.

*“Estamos siempre al borde de lo desconocido, y tratando de entender lo que no se puede entender.”  
Isaac Asimov (Las bóvedas de acero).*

# Capítulo II

## *Materiales y Métodos*

### II.1. Materiales

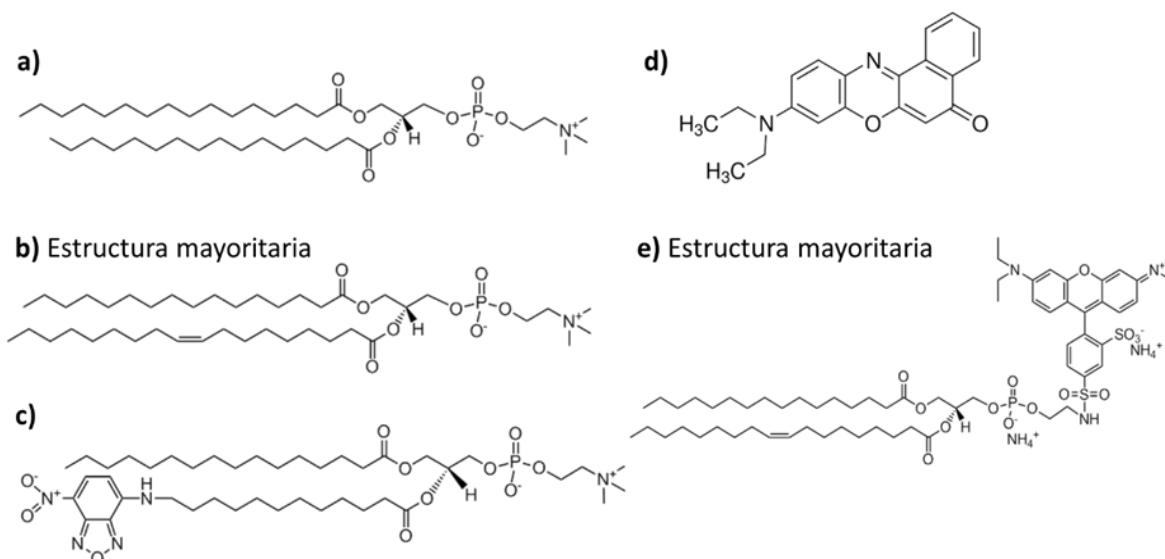
#### II.1.1. Monocapas de Langmuir en interfase O/W y A/W

Los fosfolípidos 1,2-Dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPPC), L- $\alpha$ -fosfatidilcolina de huevo (EPC) y los lípidos fluorescentes 1-palmitoil-2-12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (NBD-PC) y L- $\alpha$ -fosfatidiletanolamina-N-(lisamina rodamina B sulfonil) (Sal de amonio, transfosforilada de huevo de gallina; Rhod-PE) fueron adquiridos de Avanti Polar Lipids (Alabama, USA). Mientras que la sonda fluorescente 5H-benzo [ $\alpha$ ] fenoxazin-5-ona, 9- (dietilamina), Rojo de Nilo (NR) fue adquirida de Sigma-Aldrich (ver Figura 10a - e).

Las soluciones de lípidos puros y mezclas utilizadas en esta tesis se solubilizaron en cloroformo a una concentración de aproximadamente 1mM. Los solventes utilizados fueron de grado analítico (99% puros) y utilizados sin una purificación adicional. El agua se purificó mediante un sistema de doble deionización para producir un producto con una conductancia de  $\sim 0,0 \pm 0,1 \mu\text{S/cm}$ .

El aceite mineral (Vaselina, VAS), conocido comercialmente como Petrolato Líquido de grado técnico de viscosidad 70/80 SSU (o 10/15 cP), fue adquirido de VASEPLUS S.A. (Buenos Aires, Argentina) con una composición no informada por el fabricante. Por este motivo, se realizó su análisis mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-MS), espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN - DEPT 135° cuyos resultados se detallan en el Capítulo III. Pudo determinarse que el stock de aceite mineral utilizado estaba compuesto por alcanos saturados con una longitud de cadena entre 19 y 29 átomos de carbono ( $25 \pm 3 \text{ C}$ ) y una masa molecular media de  $347 \pm 9 \text{ g/mol}$ .





**Figura 10. Estructura de lípidos y sondas fluorescentes.**

a) DPPC. b) EPC. Al ser una mezcla en las que el largo y la insaturación de las cadenas puede variar, se muestra la estructura mayoritaria. c) NBD-PC. d) Rojo de Nilo (NR). e) Rhod-PE, se muestra la estructura que predomina mayoritariamente.

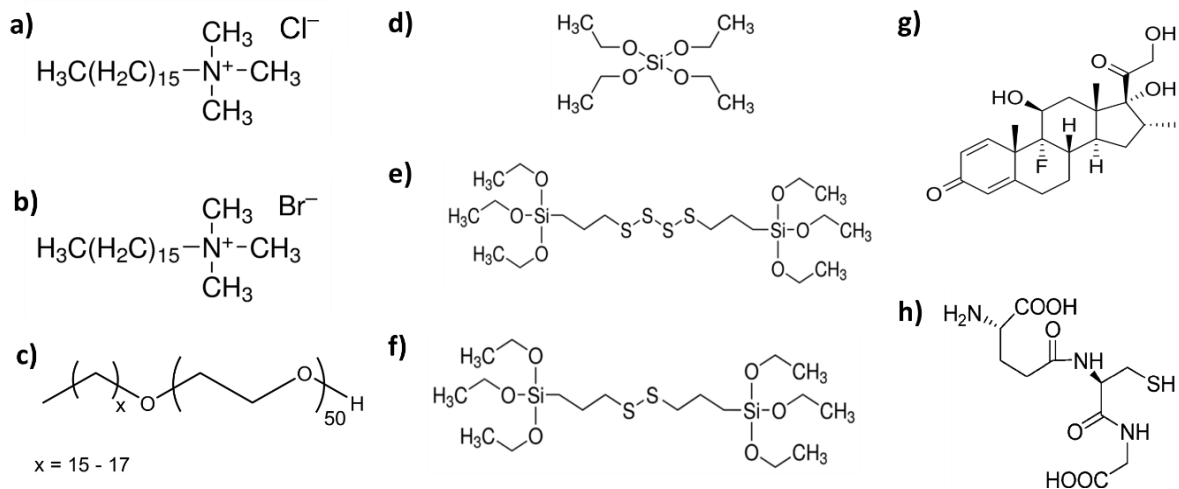
## II.1.2. Nanoemulsiones y Nanocápsulas

Para la preparación de la fase oleosa, se utilizaron distintas sustancias: cloroformo (Sigma-Aldrich,  $\geq 99\%$ ), diclorometano (Sigma-Aldrich,  $\geq 99.8\%$ ), vaselina (VASEPLUS S.A), hexadecano (HD, Sigma-Aldrich, 99%), aceite de oliva (Sigma Aldrich, altamente refinado, de baja acidez), ciclohexano (Sigma-Aldrich, 99.5%).

Para el proceso de síntesis y purificación de nanoemulsiones y nanocápsulas de sílica, el medio acuoso empleado fue agua desionizada con resistividad de  $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$  (a  $25^\circ \text{C}$ ) obtenida de un purificador Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore). Los surfactantes utilizados incluyen: 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfocolina (DPPC, Avanti Polar Lipids), cloruro de cetiltrimetilamonio (CTMA-Cl, Acros Organics, 99%), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB, Cicarelli) y Lutensol AT50 (BASF) \*. Sus estructuras químicas se presentan en la Figura 11 a-c.

\* El Lutensol AT50 es un tensioactivo no iónico. La familia de compuestos está constituida por éteres de alquil- polietilenglicol formados a partir de un alcohol de C16-C18 saturado lineal. Se ajustan a la siguiente fórmula general:  $\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x\text{H}$ , donde R = alcohol C16-C18 saturado lineal,  $x = 11, 13, 18, 25, 50$  u 80. El número en el código alfanumérico indica el grado nominal de etoxilación.

Los precursores utilizados para la síntesis de nanocápsulas fueron: Tetraetoxisilano (TEOS, Alfa Aesar, 98%), Bis[3-(trietoxisilil)propil] tetrasulfuro (TESPT, Sigma-Aldrich, 90%), Bis[3-(trietoxisilil)propil]disulfuro (TESPD, Gelest, 90%). Como droga modelo para estudiar su encapsulación se utilizó Dexametasona (DXM, Sigma-Aldrich,  $\geq 98\%$ ), y como agente reductor se escogió L- Glutación (GSH, Appli Chem,  $\geq 97\%$ ). Sus estructuras químicas se ilustran en la Figura 11 d-h.



**Figura 11. Estructuras químicas de las sustancias utilizadas en la preparación de emulsiones.**

Se ilustran las estructuras químicas, de los surfactantes: a) CTMA-Cl. b) CTAB. c) Lutensol AT50. De los precursores de sílica: d) TEOS e) TESPT. f) TESPd. De la droga modelo: g) DXM. Del agente reductor: h) GSH.

## II.2. Métodos

### II.2.1. Determinación de la composición de Vaselina (VAS)

#### II.2.1.1. *Análisis espectroscópico mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN)*

Todos los materiales de partida se encontraron disponibles comercialmente, los disolventes se destilaron y se secaron antes de su uso. Las soluciones para los experimentos de RMN se prepararon disolviendo muestras de VAS en cloroformo deuterado ( $\text{CCl}_3\text{D}$ ).

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y DEPT  $135^\circ$  se registraron en un espectrómetro Bruker Advance II-400 ( $^1\text{H}$  a 400,13 MHz y  $^{13}\text{C}$  a 100,03 MHz), dónde los desplazamientos

químicos se reportan en partes por millón (ppm) a partir de la señal de referencia correspondiente al Tetrametilsilano (TMS).

### **II.2.1.2. *Análisis mediante cromatografía de gases-espectrometría de masa (CG-MS)***

El aceite mineral utilizado también se caracterizó por espectrometría de masa (Varian Saturn 2200) con un cromatógrafo de gases CP3800. La columna utilizada fue HP-5MS, de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno, 0,25  $\mu\text{m}$  film. El gas utilizado fue Helio, con un flujo constante de 1,0 mL/min. La temperatura del inyector fue de 300 °C. El analizador de masas fue una trampa de iones, a una corriente de ionización de 5  $\mu\text{A}$  y con un rango de escaneo  $m/z$  de 10 a 650. La temperatura de la trampa de iones fue de 200 °C y la línea de transferencia se estableció a 250 °C.

## **II.2.2. Experimentos en Filmes de Langmuir y Langmuir-Blodgett**

En el presente trabajo, los filmes monomoleculares fueron preparados y monitoreados cómo se ha descrito anteriormente <sup>67, 104</sup> utilizando un equipo Minitrough II (KSV Instruments Ltd., Finland). La configuración experimental incluyó cubas de Teflon <sup>TM</sup> y barreras de Delrin <sup>TM</sup> con diseños acordes al tipo de filme a ser estudiado; en la interfase agua/aire (A/W) o en la interfase aceite/agua (O/W).

Las monocapas se comprimieron isométricamente a una velocidad de 2  $\text{Å}^2 \cdot \text{molécula}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  ( $\sim 4$  mm/min) hasta alcanzar una determinada presión. Adicionalmente, se probó una velocidad de compresión menor de 1  $\text{Å}^2 \cdot \text{molécula}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  (2 mm/min) y se obtuvieron resultados idénticos.

La señal correspondiente al área de superficie (determinada de acuerdo con la posición relativa de las dos barreras de compresión) y a la presión lateral superficial ( $\pi$ ) determinada mediante el método de la placa de Wilhelmy (lámina de Pt de 5 mm de ancho x 20 mm de largo x 0,025 mm de espesor) fueron medidas automáticamente por el equipo y registradas utilizando un software específico. La reproducibilidad del método se encuentra

entre  $\pm 0,1 \text{ nm}^2$  y  $\pm 1 \text{ mN/m}$  para el área molecular y la presión de superficie, respectivamente.

Antes de cada experimento la cuba se limpió repetidas veces con Etanol 96% y se enjuagó con agua bidestilada. La ausencia de impurezas tensioactivas en los solventes puros y en la solución de subfase (agua bidestilada) se verificó antes de cada experimento reduciendo el área de superficie disponible a menos del 10% de su valor original. Este control se realizó siempre después de haber esperado un tiempo prudencial para que las posibles impurezas que podrían haber estado presentes en cantidades traza se adsorbieran a la interfase.

Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente, controlando que la misma fuera de  $24 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ . Por el contrario, cuando se realizaron isotermas en función de la temperatura, se utilizó un baño con circulación (Julabo GmbH) acoplado al equipo de monocapas, donde la temperatura fue regulada entre  $15,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $35,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### **II.2.2.1. *Monocapas en la interfase agua/aire (A/W)***

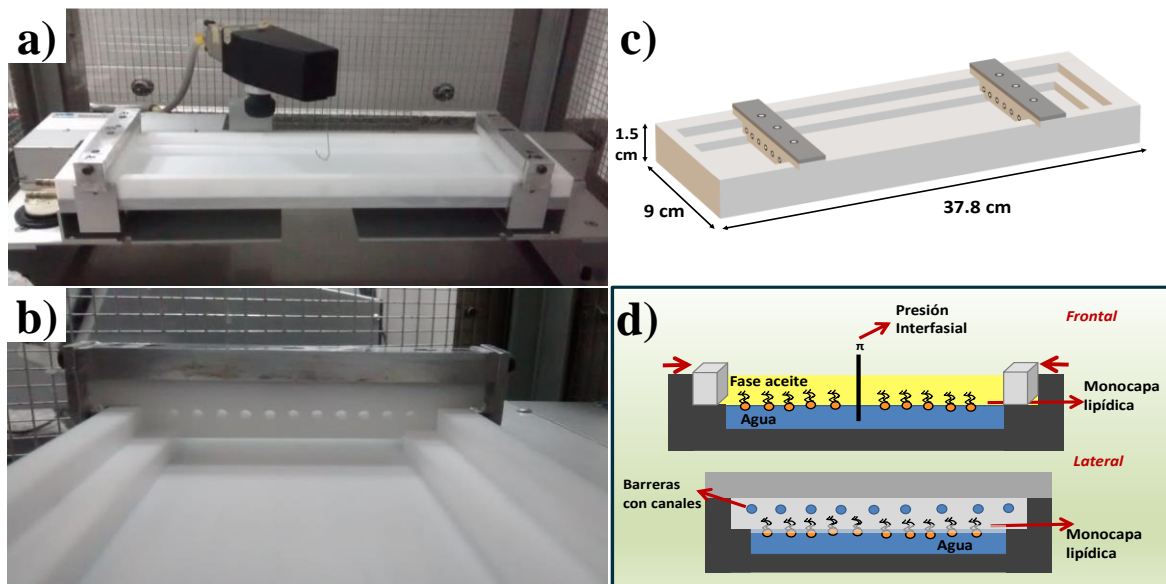
En los experimentos con monocapas en la interfase A/W<sup>104</sup>, se utilizó una cuba rectangular con un área total de  $274 \text{ cm}^2$  (36,5 cm de longitud, 7,5 cm de ancho y 0,75 cm de profundidad), con dos barreras móviles colocadas en el borde superior de la cuba. Entre 5 y 60  $\mu\text{l}$  de una solución clorofórmica de lípidos se sembró sobre una subfase de agua deionizada. Se esperó aproximadamente 5 minutos para la evaporación del solvente antes de comenzar la compresión (ver Figura 7, Capítulo I, Sección I.5.2).

### **II.2.2.2. *Monocapas en la interfase aceite/agua (O/W)***

En el caso de los experimentos con monocapas en la interfase O/W, se utilizó una cuba rectangular especialmente diseñada y adaptada para el equipo de monocapas disponible en nuestro laboratorio. El diseño de esta cuba fue un desafío muy importante en esta tesis, ya que hasta nuestro conocimiento no hay ningún equipo como éste disponible en Argentina<sup>67</sup>. Este diseño fue de mi autoría y se basó principalmente en las características de la cuba descrita por Zhang et al.<sup>63</sup>.

En la Figura 12, pueden observarse sus dimensiones y características únicas para permitir el estudio adecuado de monocapas en la interfase líquido-líquido. Su área total es de  $231 \text{ cm}^2$ , (31,2 cm de largo y 7,4 cm de ancho) con un escalón interno de 0,5 cm para asentar las dos barreras y marcar el límite de altura de la fase inferior. Las barreras fueron construidas con canales espaciados cada 0,5 cm para permitir que la fase superior fluya libremente y el proceso de compresión transcurra correctamente <sup>105</sup>.

Es importante destacar que en la interfase O/W, la placa de Wilhelmy suspendida de la microbalanza se encuentra parcialmente sumergida en la fase acuosa y en la fase aceite <sup>64</sup>. Por lo tanto, para garantizar mediciones estables la placa de Pt debe humedecerse previamente en el solvente más denso.



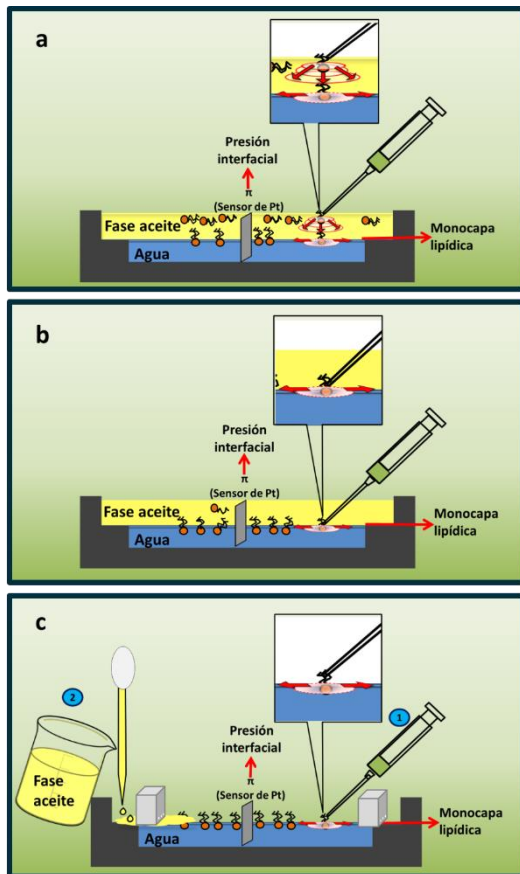
**Figura 12. Cuba de Langmuir para interfases líquido/líquido.**

(a) Fotografía de la cuba diseñada y adaptada para el equipo de monocapas de nuestro laboratorio. (b) Fotografía donde se observa en detalle las barreras y su posición. (c) Esquema gráfico de la cuba indicando sus dimensiones. (d) Representación del sistema experimental, indicando la ubicación de la monocapa lipídica en la interfase aceite/agua.

En la preparación de monocapas lipídicas se evaluaron diferentes técnicas de siembra, para obtener monocapas adsorbidas (AM) o esparcidas (SM, por su denominación en inglés “*spread monolayers*”) <sup>106</sup>.

Las AM se prepararon sembrando una disolución de fosfolípidos en la interfase aceite/aire ( $AM_{A/O}$ ) o en la interfase aceite/agua previamente formada ( $AM_{O/W}$ ) (ver Figura 13 a, b). Por el contrario, para formar monocapas tipo SM, primero se sembró la disolución

en la interfase A/W y luego de una espera de 10 minutos, para permitir la evaporación del solvente, se colocó el aceite cuidadosamente utilizando una pipeta Pasteur para obtener la interfase O/W (Figura 13c). Es importante destacar que en el método  $AM_{A/O}$ , el surfactante anfipático sembrado sobre la fase superior no debería ser estable en la interfase aceite/aire y debería ser insoluble en la fase aceite para asegurar que todas las moléculas depositadas puedan alcanzar la interfase O/W.



**Figura 13. Preparación de monocapas con diferentes métodos de siembra.**

Preparación de monocapas adsorbidas (AM) (a, b) y esparcidas (SM) (c) en la interfase O/W. La solución lipídica se depositó sobre la fase superior (a), en la interfase O/W después de preparar el sistema bifásico líquido-líquido (b) o se extendió sobre la interfase A/W antes de verter el aceite para obtener la interfase O/W (c). Inserciones: (a) las moléculas de fosfolípido difunden radialmente tanto en el volumen de la fase aceite como a lo largo de la interfase O/W; (b) y (c) la difusión radial se produce bidimensionalmente a lo largo de las interfaces O/W o A/W, respectivamente.

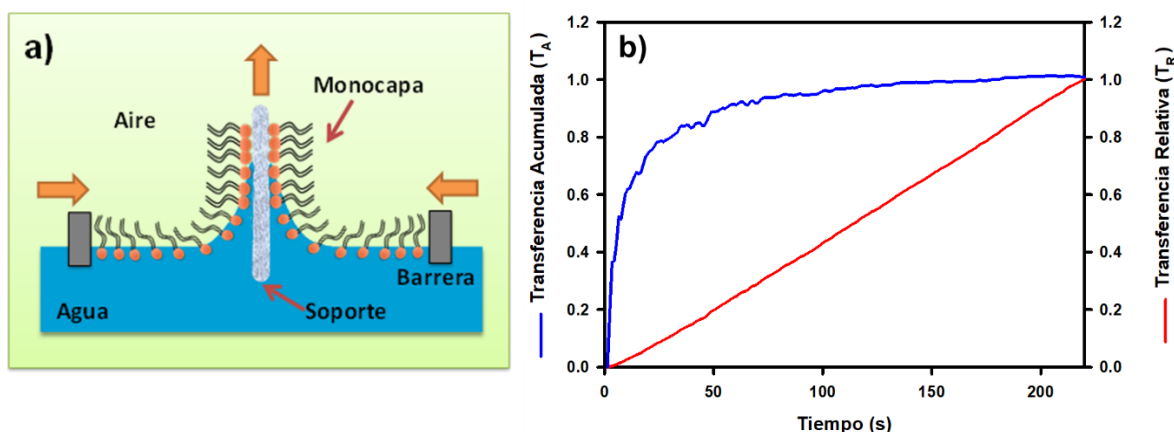
### II.2.2.3. *Filmes de Langmuir-Blodgett (LB)*

Una ventaja muy útil de las monocapas de Langmuir es que pueden ser transferidas cuantitativamente a soportes sólidos, esto permite una mejor visualización de la topografía de la monocapa mediante diversas técnicas de microscopía, así como, la posibilidad de preparar multicapas altamente organizadas del anfifilo para otros fines.

En particular, la técnica de Langmuir-Blodgett es una de las más utilizadas y fue introducida por primera vez por Irving Langmuir en 1920, donde describió el proceso de transferencia de una monocapa a una superficie sólida, sin embargo, su aplicación y completa descripción fue posible gracias a la contribución de su colaboradora Katharine

Blodgett, con quien trabajaba<sup>107</sup>. Esta técnica puede aplicarse a sustratos hidrofílicos o hidrofóbicos<sup>108-109</sup>, y permite la obtención de monocapas transferidas que son estables en contacto con el aire como se esquematiza en la Figura 14a.

La presión superficial y la temperatura de la monocapa deben ser controladas para asegurar que el filme se encuentre en un estado estable y condensado, ya que la organización molecular resultante del filme de Langmuir-Blodgett (LB) dependerá de las condiciones iniciales. La cantidad y calidad de la monocapa depositada sobre un soporte sólido puede aproximarse mediante el cálculo de la Transferencia Acumulada ( $T_A$ ) que se define como el cociente entre el área de monocapa transferida (medida como la disminución del área de la monocapa comprendida entre las barreras, necesaria para mantener la  $\pi$  constante) y el área total del sustrato. Por otro lado, la Transferencia relativa ( $T_R$ ) informa sobre el movimiento de las barreras y está representada por una línea recta con valores de ordenadas que van de 0 a 1<sup>110</sup>. De modo que, para una Transferencia total ideal,  $T_R = 1$ . Esta relación puede observarse en la Figura 14b, donde se presenta un ejemplo de los resultados obtenidos de una transferencia en función del tiempo.



**Figura 14. Técnica de Langmuir-Blodgett.**

a) Esquematización del método de transferencia de Langmuir-Blodgett. b) Gráfico de transferencia relativa (rojo) y transferencia acumulada (azul) en función del tiempo. La transferencia se lleva a cabo a presión constante y el software permite constatar la eficacia de la transferencia.

En el presente trabajo, los experimentos se realizaron con monocapas mezclas de DPPC/VAS<sub>0.2x</sub> conteniendo una de las sondas fluorescentes, Nile Red o NBD-PC, al 1% mol/mol para su posterior visualización por Microscopía de Epifluorescencia. Las transferencias se realizaron a soportes de vidrio tipo cubre objeto de 20 x 20 mm de lado. Los mismos fueron previamente tratados con una solución sulfonítrica por 12h. con el

objetivo de asegurar la eliminación de residuos orgánicos e incrementar su hidrofiliidad. La temperatura de trabajo fue de  $24 \pm 1$  °C, la presión lateral de transferencia se mantuvo constante a  $15,0 \pm 0,1$  mN/m y la velocidad de compresión fue de  $2 \text{ \AA}^2 \cdot \text{molécula}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  ( $\sim 4$  mm/min).

## II.2.3. Análisis teóricos

### II.2.3.1. Área molecular promedio y presión superficial o interfasial

Las isotermas de compresión fueron informadas en gráficos de presión superficial o interfasial ( $\pi$ ) vs. área molecular promedio (MMA). Donde la MMA de los fosfolípidos a distintas presiones superficiales se calculó dividiendo el área de la cuba confinada entre las dos barreras por el número de moléculas sembradas en la interfase.

En el caso de las isotermas en la interfase O/W, como se discutirá en los siguientes capítulos, los valores de MMA no pueden calcularse de un modo preciso debido a que la monocapa de fosfolípidos debe considerarse una mezcla pseudo-binaria de fosfolípido y vaselina. Debido a esto, los valores se informan como áreas moleculares promedio aparentes ( $\text{MMA}_{\text{ap}}$ ).

Los cálculos de  $\pi$ , son obtenidos automáticamente por el software del equipo de monocapas, sin embargo los valores iniciales de tensión superficial o interfasial ( $\gamma_0$ ) son a  $25^\circ\text{C}$ :  $\gamma_{0,\text{A/W}} = 71,9 \pm 0,4$  mN/m para la interfase limpia A/W<sup>111</sup> y  $\gamma_{0,\text{O/W}} = 37 \pm 2$  mN/m para la interfase limpia O/W donde O es el aceite mineral, VAS en el presente trabajo.

### II.2.3.2. Módulo de compresibilidad ( $K$ )

Las monocapas lipídicas pueden existir en diferentes estados de fase dependiendo de la temperatura y del grado de empaquetamiento molecular asociado a la presión superficial a la que se encuentren. Distintos estados de fase implican diferentes grados de libertad u orden molecular debido a las fuerzas intermoleculares presentes en el filme y entre el filme y la subfase. Es por ello que, para poder analizar el comportamiento de fase de los filmes, se calculó el módulo de compresibilidad ( $K$ ) según<sup>58</sup>:

$$K = -A \left( \frac{d\pi}{dA} \right)_T \quad (5)$$



Donde  $A$  representa el área total de la monocapa, y la  $d\pi/dA$  fue obtenida a partir de los datos de los experimentos regulares de compresión para isothermas de Langmuir.

Este parámetro es un elemento importante para estimar el estado de fase de las monocapas lipídicas. Si se considera un estado de fase condensado (LC) donde las moléculas se encuentran acomodadas con un alto grado de empaquetamiento, se registra un alto módulo de compresibilidad; es decir que el filme reacciona a la compresión con un gran aumento de presión. Por el contrario, en un estado tipo líquido expandido (LE), donde las moléculas que forman el filme presentan menor interacción molecular y mayor fluidez, el módulo de compresibilidad determinado es bajo, ya que se producen cambios moderados en la presión superficial a medida que el área molecular disminuye.

Es importante tener en cuenta que en el caso de monocapas de EPC<sub>O/W</sub> o DPPC<sub>O/W</sub>, así como en las mezclas pseudo-binarias EPC/VAS<sub>A/W</sub> o DPPC/VAS<sub>A/W</sub>, los cálculos se realizaron considerando una MMA aparente, por lo que  $K$  se considerará también como un módulo de compresibilidad aparente.

### II.2.3.3. *Análisis termodinámico*

La energía libre de compresión ( $\Delta G_{comp}$ ) representa operativamente el trabajo bidimensional involucrado en reunir las moléculas formadoras del film desde un estado de bajo empaquetamiento (por ejemplo,  $\pi \sim 2$  mN/m) hasta una determinada condición de empaquetamiento molecular<sup>112</sup>. Por lo que,  $\Delta G_{comp}$  puede calcularse como:

$$\Delta G_{comp} = - \int_{A_0}^{A_i} \pi \delta A \quad (6)$$

El área molecular ( $A$ ) se puede utilizar como MMA y, por lo tanto, el  $\Delta G_{comp}$  se puede calcular como el área bajo la curva de la isoterma de compresión comprendida entre ciertos límites. En el presente trabajo, se tomó  $A_0$  y  $A_i$  como el MMA a 2 y 20 mN/m, respectivamente. En el caso de monocapas de DPPC donde se observó una transición de fase a lo largo de la compresión, el valor de  $\Delta G_{comp}$  se calculó mediante la Ec. (6) integrando entre 83 a 105 y 55 a 76 Å<sup>2</sup> /molécula para monocapas DPPC en VAS/W y A/W, respectivamente.

### II.2.3.4. *Cinética de difusión de los fosfolípidos (PL) en la interfase O/W*

Después de agregar una determinada cantidad de moléculas de PL en la interfase O/W, la  $\pi$  sigue una evolución temporal ( $\pi(t)$ ) desde un valor inicial  $\pi_0$  a tiempo  $t = 0$  hasta alcanzar un valor de equilibrio  $\pi_{eq}$  o  $\pi_{max}$  cuando  $t \rightarrow \infty$ . Resultando en un incremento máximo en  $\pi$  ( $\Delta\pi_{max}$ ), como se describe en la Ec. (7):

$$\pi(t) = \pi_0 + \Delta\pi_{max} \cdot (1 - e^{-kt}) \quad (7)$$

El perfil de  $\pi(t)$  dependerá de la cantidad de moléculas de PL que alcancen la interfase y sean detectadas por la placa de Wilhelmy. Por lo tanto, el perfil de  $\pi(t)$  se verá afectado por la magnitud de los coeficientes de difusión bidimensionales de los PL a lo largo de la interfase correspondiente: la interfase O/W en el caso del método de preparación para AM<sub>O/W</sub> y para ambas interfaces A/O y O/W, en el caso del método utilizado para AM<sub>A/O</sub> (ver recuadros en Figura 13 a y b).

Si el método de preparación es AM<sub>A/O</sub> la velocidad de difusión de los PL ( $V_{PL}$ ) a través de la fase superior también debe tenerse en cuenta (Inserto en Figura 13a). La  $V_{PL}$  dependerá del coeficiente de difusión 3D de los PL en el aceite ( $D_{PL}$ ), del gradiente de concentración de los PL a través de la fase aceite ( $\nabla[PL]_O$ ) y del espesor de dicha fase ( $h_O$ ).

$$V_{PL} = D_{PL} \cdot \frac{\nabla[PL]_O}{h_O} \quad (8)$$

En el caso de la difusión lateral en la interfase, el parámetro  $D_{PL}$  en la Ec.(8) se referirá al coeficiente de difusión 2D de las moléculas de lípidos ( $D_{O/W, PL}$ ), mientras que  $\nabla[PL]_O$  y  $h_O$  deben ser considerados como el gradiente de densidad molecular por unidad de superficie y la distancia desde el punto de siembra hasta el sensor, respectivamente.

La información sobre  $D$  y  $h_O$  se encuentra en el valor de la constante cinética  $k$  (Ec. (7)). Considerando la relación de Einstein,  $D = k_B T / \lambda$ , la difusión 2D entre dos fases líquidas puede definirse como  $D_{O/W, PL}$  la cual se encuentra relacionada a la viscosidad de ambas fases  $\eta_{agua}$  (1 cP) y  $\eta_{aceite}$  (1.9 cP para VAS)<sup>113</sup> a través de la ley definida por la Ec. (9)<sup>114</sup>:

$$D_{O/W,PL} \sim (\eta_{agua} + \eta_{aceite})^{-0.85} \quad (9)$$

Además, un término modificado para la resistencia hidrodinámica  $\lambda = 8(\eta_1 + \eta_2)r$  en la relación de Einstein se ha verificado experimentalmente como un modelo preciso para objetos lipídicos con radio  $r$  en una monocapa lipídica entre dos medios viscosos con viscosidades  $\eta_1$  y  $\eta_2$ <sup>115</sup>.

Cabe destacar, que la complejidad del fenómeno de la difusión de lípidos en la interfase líquido-líquido reside en el hecho de que  $\nabla[PL]_O$  y  $r$  cambian continuamente en la compresión, así como en la adsorción, dependiendo del tipo de experimento.

Teniendo en cuenta que  $1J = 10^{-3} \text{ cP} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$  y considerando la constante de Boltzmann  $k_B \approx 1,38064852 \times 10^{-23} \text{ J/K}$ ; T expresada en K,  $\eta$  en cP y R en Å se deduce que D resulta:

$$D \sim \frac{1.7258 \cdot 10^{-11} \times T}{[(\eta_1 + \eta_2) \cdot r]} \quad (\text{m}^2/\text{s}) \quad \text{o} \quad D \sim \frac{0.17258 \times T}{[(\eta_1 + \eta_2) \cdot r]} \quad (\mu\text{m}^2/\text{s})$$

### II.2.3.5. *Análisis de miscibilidad de componentes en monocapas*

Como se explicará más adelante, en el sistema de monocapas en la interfase líquido-líquido la monocapa de fosfolípidos puros sembrada en esta interfase se encuentra en contacto permanente con las moléculas del solvente de la fase superior. Por lo tanto, el comportamiento observado en las isothermas de  $\pi$  vs. MMA en este sistema se corresponde al de una monocapa mezcla, que presenta contribuciones debidas a más de un componente. Esta situación, conlleva el estudio obligatorio de mezclas pseudobinarias, en la interfase agua-aire, constituidas por diferentes fracciones molares del fosfolípido y del aceite utilizado como fase superior en los experimentos de líquido-líquido.

En cualquier caso, puede considerarse que las propiedades de una monocapa en la que dos componentes son inmiscibles reflejarán una suma proporcional de las propiedades de cada componente por separado. Se podría pensar al filme como si estuviera constituido por dos monocapas individuales, que deben estar en equilibrio entre ellas. De modo que el área ocupada por ambas monocapas combinadas debería ser equivalente a la suma ponderada de las áreas de los filmes individuales a una determinada presión superficial<sup>69</sup> según:

$$A_{12} = [x_1 A_1 + x_2 A_2]_{\pi} \quad (10)$$

donde  $A_{12}$  es el área molecular promedio de la monocapa de la mezcla lipídica,  $x_1$  y  $x_2$  son las fracciones molares de los componentes individuales, y  $A_1$  y  $A_2$  representan las áreas moleculares de los componentes puros 1 y 2 a la misma presión superficial.

Es importante destacar que si los componentes se mezclaran idealmente (interacciones en la mezcla iguales a las que existen en los sistemas puros, y entropía de mezcla ideal), el área de mezcla también puede explicarse a partir de la Ec. (10). De esta manera, si se grafica  $A_{12}$  en función de  $x_1$  para una mezcla ideal o para un sistema inmisible, se debería obtener una línea recta. Cualquier desviación de los valores experimentales de esta relación de idealidad, indica la mezcla parcial o total de los componentes con interacciones no ideales.

## II.2.4. Técnicas para la caracterización superficial y análisis de imágenes en filmes de Langmuir

### II.2.4.1. *Microscopía de ángulo de Brewster (BAM)*

La exploración de la estructura bidimensional de las monocapas de Langmuir se realizó utilizando microscopía de ángulo de Brewster (BAM). Esta técnica permite la visualización de films ultradelgados, en el orden de los nanómetros de espesor, basándose en las propiedades de reflectividad de la luz en interfaces <sup>116</sup>.

Debe considerarse que cuando un haz de luz incide en una interfase, una parte de esta es reflejada. De modo que, la reflectividad ( $R$ ) puede entenderse como la relación entre la fracción de radiación reflejada ( $I_R$ ) por una superficie con respecto a la radiación incidente ( $I_0$ ) según:

$$R = \frac{I_R}{I_0} \quad (11)$$

Para una interfase de Fresnel comprendida entre dos medios isotrópicos de diferente índice de refracción  $\eta_1$  y  $\eta_2$ , existe un ángulo donde el valor del coeficiente de reflexión se hace cero y una onda incidente polarizada verticalmente es totalmente refractada. Este ángulo, se denomina ángulo de Brewster y se define según:

$$\tan \theta_B = \frac{\eta_2}{\eta_1} \quad (12)$$

Donde  $\theta_B$  es el ángulo de Brewster,  $\eta_1$  es el índice de refracción del medio 1 (aire) y  $\eta_2$  el índice de refracción del medio 2 (agua). Así, la técnica de BAM se basa en el principio de reflectividad cero en la interfase agua/aire para un haz de luz linealmente polarizado cuyo ángulo de incidencia coincide con el de Brewster ( $\theta = 53^\circ$ ). En presencia de una monocapa en la superficie, el índice de refracción de los medios será diferente y la reflectividad será distinta de cero. Esto permite que la luz reflejada sea utilizada para formar una imagen de la estructura bidimensional de la monocapa, debido a la diferencia en el índice de refracción entre la monocapa y la subfase y a su vez entre las distintas fases lipídicas que pueden estar coexistiendo lateralmente en la monocapa (ver Figura 15a).

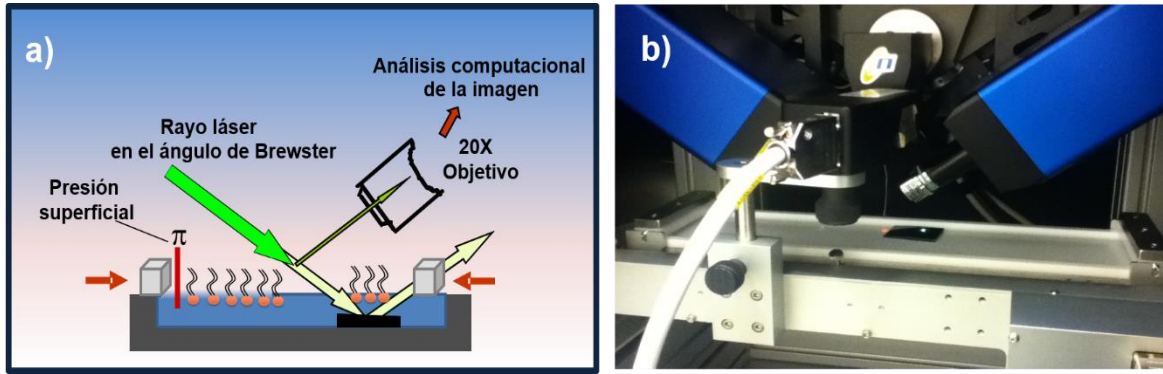
#### II.2.4.1.1. *Adquisición de la imagen*

Las monocapas de Langmuir fueron observadas por BAM durante la compresión y descompresión utilizando un Elipsómetro EP3<sup>†</sup> (Accurion, Goettingen, Germany) con un objetivo de 20X (Nikon, NA 0.35), como puede observarse en la Figura 15b. La reflexión mínima se estableció con un láser polarizado de 532 nm incidente sobre la superficie acuosa limpia en el ángulo de Brewster calibrado experimentalmente ( $\sim 53.1^\circ$ ). Para una mejor visualización, se seleccionó el nivel de gris de 0 a 70 (de la escala original de 0 a 255) para mantener la relación entre el nivel de gris y el espesor del filme. Para poder cuantificar la reflectividad de los puntos brillantes, el obturador láser y la ganancia de señal se ajustaron para lograr imágenes no saturadas.

La post-edición de las imágenes se realizó con el software Fiji (<http://fiji.sc/Fiji>, Biomedical Imaging Group, EPFL).

---

<sup>†</sup> Este microscopio pertenece al “Centro de Microscopía Óptica y Confocal Avanzada de Córdoba” (CEMINCO), integrado al “Sistema Nacional de Microscopía (SNM-MINCYT), Argentina.



**Figura 15. Microscopía de ángulo de Brewster.**

a) Representación gráfica de la técnica de BAM. b) Fotografía del equipo de monocapas utilizado acoplado a BAM.

### II.2.4.1.2. Cálculos de la altura ( $h$ ) de lentes observadas por BAM en monocapas EPC/VAS

Como se explicará en los Capítulos IV y V, durante la compresión de algunas mezclas pseudobinarias de lípido/vaselina se observó mediante BAM la aparición de puntos brillantes de alta reflectividad, a los cuales se hace referencia en esta tesis como lentes o gotas.

La altura de las gotas ( $h$ ) es un parámetro que puede ofrecer información útil para describir su comportamiento y evolución durante ciclos de compresión-descompresión. Para realizar esta medición se analizaron imágenes de BAM obtenidas de monocapas constituidas por mezclas de distintas composiciones de lipido y vaselina. Las imágenes se tomaron a diferentes  $\pi$  a lo largo de dos ciclos de compresión-descompresión dentro del rango de 1-20 mN/m. De cada imagen de BAM se seleccionaron al menos 5 lentes distribuidas al azar y se midieron sus valores de reflectividad.

El cálculo de  $h$  se basó en el procedimiento descrito por *Mercado et. al*<sup>117</sup>. A partir del valor de reflectividad ( $R_p$ ) de la luz incidente con  $\lambda = 530$  nm sobre una sola lente, y de acuerdo con la Ec. (13), donde  $\eta$ ,  $\eta_1$  y  $\eta_2$  corresponden a los índices de refracción de la lente (1.47), del aire (1) y de la subfase (1.33), respectivamente, y  $\theta_B$  es el ángulo de Brewster experimental.

$$h = \frac{\sqrt{R_p}}{\sin(2\theta_B - 90)} \left( \frac{\pi \sqrt{\eta_1^2 + \eta_2^2(\eta_1^2 - \eta^2)(\eta_2^2 - \eta^2)}}{\lambda(\eta_1^2 - \eta_2^2)\eta^2} \right)^{-1} \quad (13)$$

### II.2.4.2. *Microscopía de Epifluorescencia (EFM)*

La estructura lateral y organización de monocapas lipídicas en la interfase agua-aire también puede ser estudiada por otras técnicas, como la microscopía de fluorescencia. Esta última permite el estudio de la estructura lateral (fases condensadas y líquido expandidas) de la monocapa en escalas submicrométricas. A diferencia de la técnica de BAM, para realizar estos experimentos debemos introducir en nuestro sistema una fracción de moléculas fluorescentes, que generalmente consisten en una molécula de lípido marcado covalentemente con un fluoróforo de carácter anfifílico. Estas sondas fluorescentes se insertan en la monocapa y muestran una partición favorable hacia alguna de las fases que coexisten en la monocapa, brindando diferentes mecanismos de contraste necesarios para visualizar y caracterizar los dominios en el plano lateral de la monocapa<sup>10</sup>.

En este trabajo se utilizaron filmes de LB de la mezcla DPPC/VAS<sub>0.2x, A/W</sub> con las sondas fluorescentes Rojo de Nilo o NBD-PC al 1% mol/mol. La sonda NR es solvatocrómica, esto significa que sus espectros de excitación y de emisión cambian dependiendo de la polaridad del medio. Mientras que, la sonda NBD-PC ( $\lambda^{\max}_{exc} = 464$  nm,  $\lambda^{\max}_{em} = 531$  nm) particiona preferentemente en la fase más expandida, esto conlleva que las fases condensadas se visualicen más oscuras en contraste con un fondo más brillante debido a que la sonda fluorescente muestra una partición favorable en la fase líquido-expandida.

Además, se realizaron experimentos de EFM en monocapas de DPPC pura en la interfase A/W y O/W. Para ello, se montó un equipo de monocapas (KSV Mini-systems) sobre la plataforma de un microscopio invertido y se sembraron mezclas de DPPC con 0,3% de Rhod-PE o con 0,5% de NBD-PC. La sonda fluorescente Rhod-PE ( $\lambda^{\max}_{exc} = 560$  nm,  $\lambda^{\max}_{em} = 583$  nm) también es anfipática, posee un grupo fluoróforo voluminoso y particiona preferentemente en la fase más expandida de una monocapa. El área de las cubas de Langmuir utilizadas para la interfase A/W y O/W fueron de 99,45 cm<sup>2</sup> y 109,62 cm<sup>2</sup> respectivamente. Además, ambas tenían una ventana de cuarzo de 35 mm de diámetro en su base, lo que permitió la observación de la monocapa<sup>72</sup>. Las imágenes se tomaron a  $\pi$  constante (5, 10, 15, 25 o 35 mN/m) mediante la aplicación de un mecanismo automático continuo de compensación de  $\pi$  que permitió el control del área durante el registro de las isotermas.

El equipo utilizado fue un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse TE2000-U (Tokyo, Japan), con un objetivo de 40x en el caso de la observación de filmes LB y con un objetivo de 20x de larga distancia de trabajo para la observación de monocapas de Langmuir. La morfología de las monocapas se registró con una cámara color Nikon DS-5M con una resolución de hasta 2560–1920 pixeles en modo Captura. La post-edición de las imágenes se realizó con el software Fiji (<http://fiji.sc/Fiji>, Biomedical Imaging Group, EPFL).

### II.2.4.3. *Microscopía de Epifluorescencia Confocal Espectral*

Las monocapas de mezclas pseudobinarias DPPC/VAS o EPC/VAS (a una fracción molar  $x_{VAS} = 0,02$  o  $0,2$ ) con un 1% de la sonda fluorescente NR fueron sembradas en la interfase agua/aire hasta alcanzar una densidad molecular de superficie correspondiente a  $\sim 15\text{--}20$  mN/m. Luego, las monocapas fueron estudiadas con un microscopio confocal espectral Olympus FluoView™ FV1000 (Olympus Latin America)<sup>‡</sup>, equipado con un objetivo 10x y con las líneas de láser 488 nm y 543 nm.

Este equipo tiene la gran ventaja de que nos permite capturar imágenes a distintas longitudes de onda de emisión, de modo que a partir del análisis de cada imagen de la monocapa se pueden obtener manualmente los valores de intensidad de fluorescencia para las imágenes adquiridas a cada longitud de onda y posteriormente graficarlos como un espectro de emisión. Las imágenes se adquirieron y se procesaron con el software Olympus FluoView FV10-ASW 3.1, y la post-edición de las imágenes se realizó con el software Fiji (<http://fiji.sc/Fiji>, Biomedical Imaging Group, EPFL).

Para facilitar las comparaciones, se calculó el centro de masa espectral (CSM) para cada uno de los espectros de emisión de fluorescencia de acuerdo con la Ec. (14), donde  $I_i$  es la absorbancia o la intensidad de fluorescencia medida a la longitud de onda  $\lambda_i$ . Lo que se obtiene es un promedio ponderado de las intensidades, siendo  $\lambda_i$  el factor de ponderación.

$$CSM = \frac{\sum(\lambda_i \times I_i)}{\sum I_i} \quad (14)$$

---

<sup>‡</sup> Este microscopio pertenece al “Centro de Microscopía Óptica y Confocal Avanzada de Córdoba” (CEMINCO), integrado al “Sistema Nacional de Microscopía (SNM-MINCYT), Argentina.



## **II.2.5. Emulsiones y Nanocápsulas: preparación y caracterización**

### **II.2.5.1. *Síntesis de nanoemulsiones lipídicas***

A partir de los datos obtenidos en las isotermas de DPPC para la interfase VAS/W se realizaron distintas emulsiones con variaciones en la relación molar vaselina:fosfolípido, para obtener distintos tamaños de gota. El fundamento de la selección de estas relaciones molares será explicado en el Capítulo VI. En particular, las relaciones molares VAS:DPPC estudiadas fueron 16:1, 31:1, 47:1, 63:1, 94:1 y 126:1.

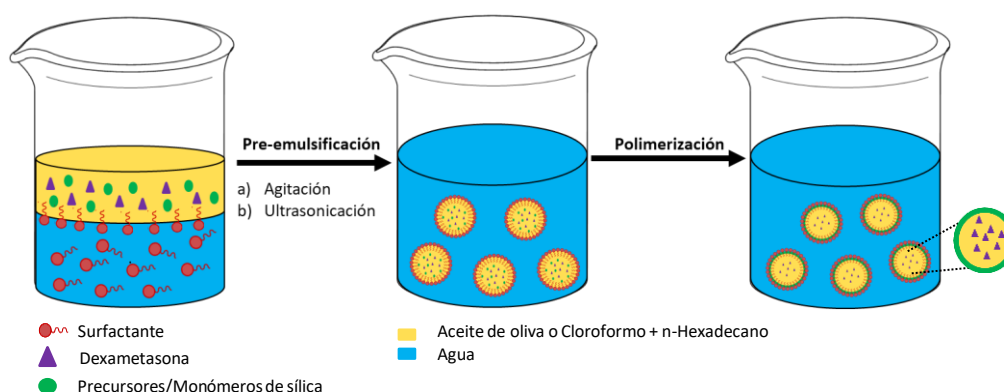
Para la preparación de la emulsión se utilizó una solución clorofórmica de DPPC, la misma se agregó gota a gota a 300 mL de agua MilliQ para obtener soluciones acuosas de DPPC con concentraciones 0,1 mM o 0,01 mM. Se realizó una agitación a 1000 rpm por 8hs para permitir la completa evaporación del solvente. Posteriormente, se colocó en un vial la cantidad necesaria de VAS, y luego bajo agitación a 1000 rpm se agregaron 30 mL de la fase acuosa correspondiente conteniendo DPPC. Luego, se permitió la pre-emulsificación del sistema con agitación a 1000 rpm por 1h. Finalmente, se realizó el proceso de ultrasonicación, en un equipo Branson de 450 W con una punta de 1/2" a 70% de amplitud durante 3 minutos, con pulsos de 30 s y 10 s de pausa.

### **II.2.5.2. *Preparación de nanocápsulas (NCs) a partir de emulsiones O/W***

Las nanocápsulas de sílica (NCs) se sintetizaron en una miniemulsión (ME) de aceite en agua utilizando la superficie de las gotas de ME como molde para la hidrólisis y condensación de alcoxisilanos, como se muestra en la Figura 16. Se utilizó tetraetoxisilano (TEOS) como precursor del silicato, mezclado con hexadecano y un disolvente orgánico (aceite de oliva o cloroformo) para formar la fase oleosa. Específicamente, 2 g (9,6 mmol) de TEOS se mezclaron inicialmente con 125 mg de hexadecano y 1g del solvente orgánico para formar la fase oleosa. Para el proceso de encapsulación se utilizaron 50 mg de Dexametasona (DXM, equivalente a 1,67 mg. mL<sup>-1</sup> en la dispersión), que fueron disueltos previamente en el solvente orgánico y subsecuentemente encapsulados en el corazón de las NCs.

En una segunda etapa, se agregó bajo agitación 30 mL de una solución  $0,77 \text{ mg. mL}^{-1}$  del surfactante Cloruro de cetiltrimetilamonio (CTMA-Cl) a la fase oleosa. Después de una etapa de pre-emulsificación agitando a 1000 rpm durante 1 h, la miniemulsión obtenida fue sometida a un proceso de ultrasonificación con enfriamiento constante en un equipo Branson de 450 W con una punta de 1/2" a 70% de amplitud por 180 s (30 s de sonicación, 10 s de pausa). La ME resultante se agitó a 1000 rpm durante 12 hs a temperatura ambiente para obtener una dispersión acuosa de NCs de silicato ( $\text{SiO}_2$ ).

En el caso de las NCs sintetizadas con cloroformo como fase orgánica y sólo para la obtención de las  $\text{NC}_{\text{Agua}}$  (Capítulo VII, Sección VII.2.3), las dispersiones se agitaron adicionalmente durante otras 12 h a 1000 rpm sin las tapas de los viales para evaporar el cloroformo y lograr el intercambio del solvente orgánico y agua en el interior de las NCs. Por otra parte, para la síntesis de NCs con enlaces di- o tetrasulfuro (Capítulo VII, Sección VII.2.4), se utilizaron distintas cantidades molares de TEOS combinado con los precursores TESPd (2S) o TESPT (4S), hasta completar el total de 9,6 mmol. Estos precursores son necesarios para obtener NCs con distintos porcentajes (25% y 50%) de enlaces di- o tetrasulfuro.



**Figura 16. Esquema ilustrativo de la síntesis de NCs.**

Puede observarse esquemáticamente los pasos requeridos para la obtención de nanocápsulas mediante la técnica de polimerización en miniemulsiones.

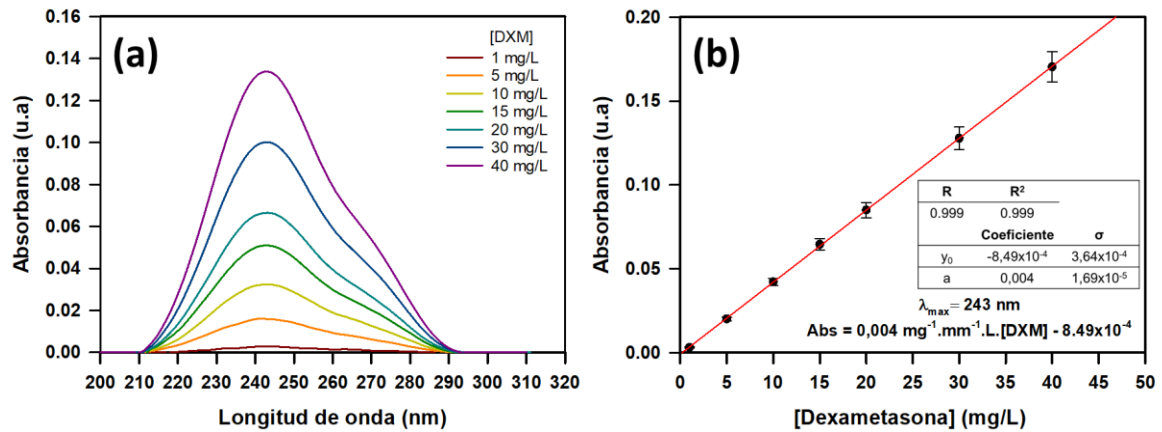
### II.2.5.2.1. Determinación de la eficiencia de encapsulación de dexametasona (DXM) en nanocápsulas.

En el Capítulo VII, Sección VII.2.4, las NCs de sílica fueron cubiertas con grupos PEG (polietilenglicol) mediante el intercambio del surfactante inicial CTMA-Cl por el surfactante no iónico Lutensol AT50. Específicamente, 35 mg de Lutensol AT50 se

adicionaron a 2 mL de la dispersión de NCs. La dispersión se agitó a 1000 rpm durante 2 h y luego se dializó contra agua mediante una membrana de diálisis con un límite de peso molecular (MWCO) de 1000 g/mol. En este caso, las moléculas de CTMA-Cl (MW = 320 g/mol) pueden difundir al medio acuoso a través de la membrana mientras que, las moléculas de Lutensol AT50 (MW = 2460 g/mol) permanecen en el interior. Para confirmar el correcto intercambio entre el surfactante catiónico y el no iónico, se midieron los valores de potencial  $\zeta$  antes y después del intercambio de surfactantes. Dado que el Lutensol AT50 es un tensioactivo no iónico, las cargas superficiales de las nanocápsulas deberían ser cercanas a cero ( $\zeta \approx 0$  mV). En comparación, las nanocápsulas estabilizadas por el tensioactivo catiónico CTMA-Cl se encontrarían cargadas positivamente ( $\zeta \geq 10$  mV). Estas diferencias en los valores de potencial  $\zeta$  resultan útiles para controlar y monitorear el proceso de intercambio.

Durante la diálisis, se determinó la eficiencia de encapsulación (EE) de la DXM en las NCs, para ello el medio de diálisis se cambió tres veces al día durante cuatro días hasta que no se detectó DXM en el medio circundante. Es decir, que la EE se calculó indirectamente cuantificando la DXM no encapsulada (la que dializa) respecto a la cantidad inicial utilizada para la síntesis de las NCs.

La concentración de DXM no encapsulada se determinó mediante espectroscopía UV-Vis ( $\lambda_{\text{max}} = 243$  nm)<sup>118</sup>, con un equipo Perkin Elmer Lambda 25 UV-Vis. Si bien pueden utilizarse otros métodos más precisos para cuantificar la DXM (como la cromatografía líquida de alta eficiencia, HPLC) no fue posible disponer de este tipo de técnicas al momento de realizar estos experimentos. La solubilidad de DXM en agua a 25 °C está reportada como 89 mg/L,<sup>119-120</sup> por lo que la curva de calibración se realizó en el rango de concentraciones de 1 a 40 mg/L como se exhibe en la Figura 17. Los valores de absorbancia finales de DXM se obtuvieron restando el blanco correspondiente en cada caso y fue realizado automáticamente por el equipo. El blanco utilizado fue una solución de agua MilliQ con concentraciones variables de CTMA-Cl. Es importante destacar que durante el proceso de diálisis la concentración de tensioactivo en el medio de diálisis irá variando a lo largo del tiempo y no es posible determinar exactamente su concentración a cada momento. Por este motivo se consideró oportuno utilizar como blanco una muestra de NCs vacías (sin DXM) que estuviera bajo las mismas condiciones experimentales de diálisis. De este modo se tomaron alícuotas de ambos sistemas (muestra problema y blanco) de manera paralela.



**Figura 17. Curva de calibración para determinar la concentración de DXM en agua a pH 7 mediante espectroscopia UV-Vis.**

En (a) se muestran los espectros de absorción obtenidos a distintas concentraciones de DXM en agua. Los valores máximos de absorbancia vs. [DXM] se graficaron en (b) para construir la curva de calibración. Se incluyen como insertos la ecuación obtenida y la tabla con los valores correspondientes al ajuste de una función lineal. Los valores de absorbancia son la media  $\pm$  S.E.M. de al menos dos experimentos independientes.

### II.2.5.2.2. Ensayos de liberación de dexametasona a partir de NCs

En el caso de nanocápsulas de sílica con puentes di- o tetra- sulfuro presentes en su estructura, se realizaron ensayos de liberación del fármaco encapsulado mediante experimentos de diálisis. Se utilizó un agente reductor que permitiera la liberación de la droga al incrementar la porosidad de la NC debido a la reducción de los puentes di- o tetra-sulfuro. Para ello, se colocaron 0,3 mL de la dispersión de NCs y 0,7 mL de agua en una membrana de diálisis (MWCO de 14 kDa), la cual se sumergió en un medio acuoso conteniendo 30 mL de una solución 10 mM de L-Glutatión (GSH), el agente reductor seleccionado. Mientras que, como medio acuoso control se utilizó agua de calidad Milli-Q, en donde no debería detectarse la presencia de DXM al no estar presente el agente reductor que permita su liberación.

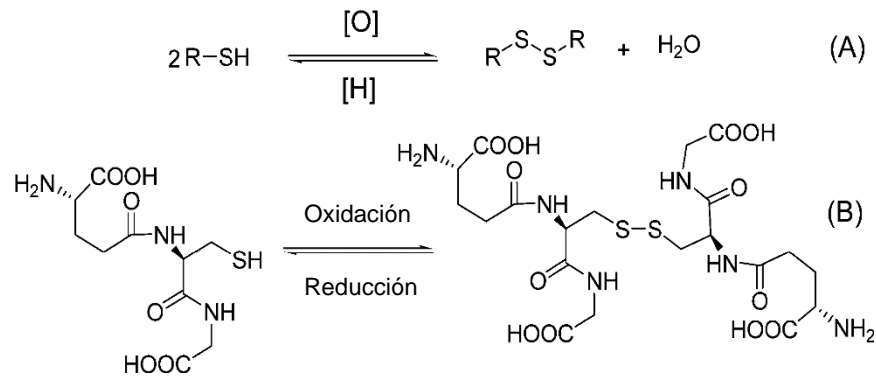
Brevemente, el GSH es un tripéptido constituido por tres aminoácidos: glutamato, cisteína y glicina. Se seleccionó como agente reductor porque es el principal antioxidante presente en el medio intracelular (en concentraciones de 2 a 10 mM), mientras que su concentración es significativamente menor en el medio extracelular (entre 2 y 20  $\mu$ M). El GSH reduce cualquier enlace disulfuro formado dentro de proteínas citoplasmáticas al actuar como un donante de electrones. En el proceso, el glutatión se convierte en su forma oxidada,

denominada disulfuro de glutatión (GSSG). En las células, el L-glutatión se encuentra principalmente en su estado reducido (GSH) y, en mucha menor proporción, en su estado oxidado (GSSG)<sup>100</sup>. Su estructura oxidada y reducida se ilustran en la Figura 18.

Posteriormente, el sistema de diálisis se incubó a 37 °C en un agitador con control térmico (MKR 23, Pforzheim, Germany). La concentración de DXM liberada fue determinada mediante espectroscopía UV-Vis (PerkinElmer Lambda 25 UV-Vis) tomando una alícuota de 0,5 mL del medio de incubación por día durante 16 días. El perfil de liberación de DXM se calculó como el porcentaje acumulado del fármaco liberado en comparación con la cantidad inicial de DXM encapsulada; en los cálculos se tuvo en cuenta el efecto del cambio de volumen. Estos experimentos se realizaron por triplicado para cada muestra. Los valores de absorbancia finales de DXM se obtuvieron restando el blanco correspondiente en cada caso, lo que fue realizado automáticamente por el equipo. Se utilizaron dos blancos distintos según el tipo de experimento como se detalla a continuación:

Experimento control: NCs con DXM encapsulada y con puentes di- o tetrasulfuro inmersas en un medio acuoso (agua MilliQ) sin agente reductor. Sin GSH presente en el medio no debería haber liberación del fármaco. Blanco utilizado: NCs sin DXM encapsulada con puentes di- o tetrasulfuro inmersas en un medio acuoso (agua MilliQ) sin agente reductor y bajo las mismas condiciones de incubación (37 °C por 16 días). La alícuota a medir por UV-Vis se toma del medio de diálisis al mismo tiempo para el blanco y la muestra problema.

Experimento de liberación: NCs con DXM encapsulada y con puentes di- o tetrasulfuro inmersas en una solución 10 mM del agente reductor. Con GSH presente en el medio debería detectarse la liberación del fármaco. Blanco utilizado: NCs sin DXM encapsulada con puentes di- o tetrasulfuro inmersas en una solución 10 mM del agente reductor bajo las mismas condiciones de incubación (37 °C por 16 días). Es importante destacar que durante el proceso de incubación la concentración de GSH-GSSG en el medio de diálisis irá variando a lo largo del tiempo y no es posible determinar su concentración. Por este motivo se consideró oportuno tomar alícuotas de ambos sistemas (muestra problema y blanco) de manera paralela, para que cada muestra tenga su correspondiente blanco en cada medición realizada.



**Figura 18. Estructura molecular del L-glutatión (GSH) y del disulfuro de glutatión (GSSG).**

(A) Cambios reversibles entre las formas tiol y disulfuro; (B) glutatión (GSH) y disulfuro de glutatión (GSSG). Figura adaptada de la ref. 100

### II.2.5.3. *Técnicas para la caracterización de miniemulsiones (ME) y nanocápsulas (NCs)*

#### II.2.5.3.1. *Análisis por dispersión dinámica de la luz (DLS)*

Los diámetros hidrodinámicos y la distribución poblacional de las partículas de emulsión del sistema DPPC/VAS, así como de las NCs obtenidas en la Sección II.2.5, fueron medidos mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS, por su denominación en inglés “*dynamic light scattering*”) utilizando un equipo Nicomp (Modelo 380, PSS, Santa Barbara, CA) a un ángulo fijo de dispersión de  $90^\circ$ .

Brevemente, esta técnica consiste en irradiar la suspensión con un láser de  $\lambda = 500$  nm, donde el movimiento Browniano de las partículas o moléculas en suspensión hace que la luz láser se disperse. La frecuencia de las fluctuaciones generadas en la intensidad de la luz dispersada en una dirección definida depende del tamaño de las partículas (las fluctuaciones son de mayor frecuencia para partículas más pequeñas que se mueven rápidamente), por lo que mediante un análisis de autocorrelación se puede calcular el coeficiente de difusión traslacional ( $D_T$ ). Por su parte  $D_T$  es inversamente proporcional al radio hidrodinámico ( $R_H$ ) de la partícula según la relación de Stokes- Einstein:

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_T} \quad (15)$$

Donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura absoluta,  $\eta$  es la viscosidad del fluido y  $D_T$  es el coeficiente de difusión traslacional<sup>121</sup>.

### **II.2.5.3.2. Análisis por técnicas de microscopía electrónica**

Para caracterizar la morfología de las NCs obtenidas, se utilizó la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM, por *Transmission Electron Microscopy*) utilizando un equipo Jeol 1400 (Jeol Ltd, Tokyo, Japón) operando a un voltaje de aceleración de 120 kV y la técnica de microscopía electrónica de barrido (MEB o SEM, por *Scanning Electron Microscope*), mediante un equipo Gemini 1530 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemania) operando a 0.35 kV. Pertenecientes al Max Planck Institute for Polymer Research (MPIP) de Mainz, Alemania. Las muestras de nanocápsulas para SEM y TEM se prepararon colocando una gota de una dilución 1:100 de la dispersión original, sobre láminas de silicio o grillas de cobre recubiertas con una capa de carbono, respectivamente.

La edición de imágenes se llevó a cabo utilizando el software Fiji (<http://fiji.sc/Fiji>, Biomedical Imaging Group, EPFL), para las determinaciones del espesor de las nanocápsulas ( $d$ ) se midieron al menos tres imágenes calibradas.

### **II.2.5.3.3. Análisis del área superficial mediante el método de Brunauer - Emmett - Teller (BET)**

El método B.E.T., desarrollado por Brunauer, Emmett y Teller, permite determinar el área superficial de un sólido basándose en la adsorción de un gas inerte, generalmente N<sub>2</sub>, a bajas temperaturas. Se puede calcular el número de moléculas de adsorbato, en este caso nitrógeno, necesarias para cubrir completamente la pared de la partícula con una monocapa. Al ponerse en contacto un gas con la superficie de un sólido se produce un equilibrio entre las moléculas adsorbidas y las moléculas en fase gaseosa, el cual depende de la presión del gas y de la temperatura. La relación entre las moléculas adsorbidas y la presión a temperatura constante se puede registrar en una isoterma de adsorción. Estas isotermas de adsorción-desorción permiten obtener directamente el volumen adsorbido a una determinada presión y así calcular el área superficial de una partícula, así como, el tamaño y la distribución de sus poros.

La técnica de BET resulta de gran utilidad en el caso de las nanocápsulas, ya que se encuentran formadas por un material mesoporoso como lo es la sílica. Brevemente, el área superficial de las nanocápsulas se determinó a partir de experimentos de adsorción-desorción de N<sub>2</sub> llevados a cabo en un analizador Quantachrome Autosorb-1 (Boynton Beach, FL) a

77,3 K. Las dispersiones de NCs se dializaron contra agua Milli-Q durante 3 días para eliminar los restos de tensioactivos. Luego, las dispersiones dializadas se liofilizaron durante 48 h y se desgasificaron a 70 ° C en vacío durante al menos 12 h antes de las mediciones.

El área de superficie específica se calculó utilizando la ecuación Brunauer-Emmett-Teller (BET)<sup>122-123</sup> basada en la ecuación de Kelvin (16).

$$\ln\left(\frac{P}{P_0}\right) = \frac{2 \cdot \gamma \cdot V_m \cdot \cos\theta}{R \cdot T \cdot r_m} \quad (16)$$

donde  $P/P_0$ , es la presión de vapor relativa ( $P_0$  es la presión de vapor del adsorbato,  $N_2$ , a la temperatura,  $T$ , del experimento que es la temperatura del  $N_2$  líquido),  $\gamma$  es la tensión superficial líquido/vapor, ( $\gamma = 0,00885 \text{ J/m}^2$  para  $N_2$  a 77,4 K),  $V_m$  es el volumen molar del líquido a la temperatura  $T$  ( $34,68 \times 10^{-6} \text{ m}^3/\text{mol}$  para  $N_2$  a 77,4 K),  $\theta$  es el ángulo de contacto, tomado como cero para el  $N_2$  a 77,4 K y  $R$  es la constante universal de los gases. Los datos experimentales se obtuvieron a valores de presión relativa comprendidos entre  $0 < P/P_0 < 0,25$ .

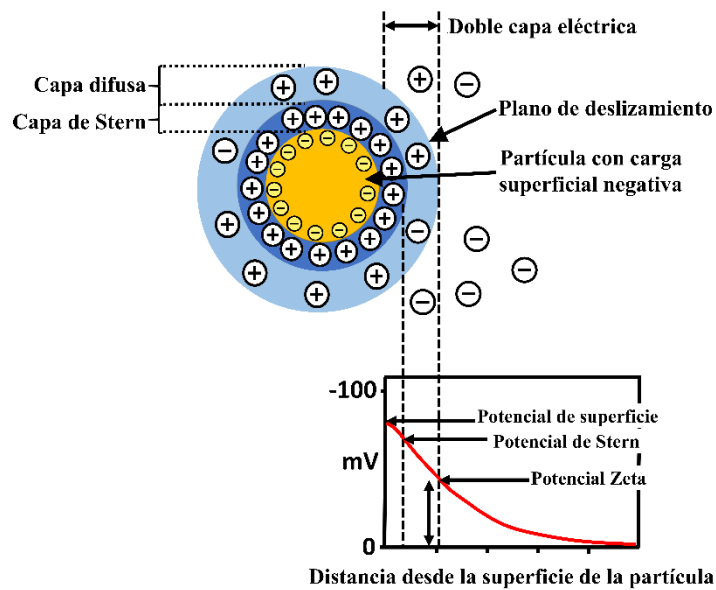
#### II.2.5.3.4. Mediciones de potencial zeta ( $\zeta$ )

La doble capa eléctrica de una partícula en solución está formada por una capa interna de contraiones fijos denominada capa de Stern y una capa difusa que combina iones / moléculas tanto de carga opuesta (que predominan) como de igual carga a la de la partícula en cuestión que, al menos en parte, pueden moverse bajo la influencia de una tensión tangencial. Desde un punto de vista teórico, el potencial zeta ( $\zeta$ ) es el potencial eléctrico en la doble capa interfásica en el plano de deslizamiento que separa el fluido móvil del fluido que permanece adherido a la superficie, como se observa en la Figura 19. Para medir  $\zeta$  se requiere aplicar un campo eléctrico a la muestra. En esta instancia las partículas se moverán al electrodo opuesto deslizándose en este plano hipotético que actúa como la interfase entre las partículas en movimiento y el medio circundante<sup>124</sup>.

Es importante destacar que el potencial  $\zeta$  es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática (o de carga) entre las partículas, y por ello es uno de los parámetros fundamentales que describe la estabilidad de un sistema coloidal en un medio acuoso. Además, aporta información referida al tipo de interacciones, transitorias, permanentes y de asociación o disociación, que pueden establecerse entre las partículas



coloidales y las especies químicas en solución<sup>125</sup>. Además, el potencial  $\zeta$  es uno de los parámetros relevantes en la determinación de la biocompatibilidad *in vivo* e *in vitro* de biomateriales con aplicación en la salud humana, según lo establecido por organismos internacionales de regulación del área de la salud, como la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, por su denominación en inglés “U.S. Food and Drug Administration”) en conjunto con la Liga Nacional de Consumidores (NCL, del inglés “National Consumers League”)<sup>126</sup>.



**Figura 19. Esquema representativo del fundamento teórico del potencial zeta**

Puede observarse esquemáticamente la doble capa eléctrica que rodea una partícula (con carga negativa) en un medio acuoso y la posición del plano de deslizamiento, donde se indica que el potencial zeta es el potencial eléctrico en este plano. La partícula representa una nanocápsula de sílica, cuya carga superficial es negativa, por lo que la primera capa (potencial de Stern) estará principalmente compuesta por contraiones cargados positivamente. La segunda capa (difusa) presentará contraiones, así como iones de igual carga a la partícula que se encuentra en contacto con el medio acuoso.

En el presente trabajo de tesis las mediciones de  $\zeta$  se aplicaron a la caracterización de las nanocápsulas de silicato sintetizadas como se describirá en el Capítulo VII. Para ello, las NCs se suspendieron en una solución de cloruro de potasio  $10^{-3}$  M a pH 6,8 y 25 °C y se midieron en un equipo Malvern Zeta (Malvern Instruments, Reino Unido). Para concentraciones de sales menores a 0,5 mol/L, el potencial zeta se calcula según la Ec. (17):

$$\zeta = 0,008 + 0,026 \log(C) \quad (17)$$

siendo C la concentración de sales del electrolito en mol/L, y  $\zeta$  el potencial zeta en volts. El contenido sólido de la dispersión de nanocápsulas se midió gravimétricamente.

*“Un científico en su laboratorio no es un mero técnico: también es un niño que se enfrenta a fenómenos naturales que le impresionan como si fueran cuentos de hadas”.*  
Maria Skłodowska-Curie.

## **Capítulo III**

### ***Composición química y definición de la Vaselina***

#### **III.1. Introducción**

La Vaselina (también denominada aceite mineral liviano o petrolato líquido) es por definición una mezcla de hidrocarburos saturados (ramificados o lineales) de fórmula general  $C_nH_{2n+2}$  obtenidos a partir del petróleo y es ampliamente utilizada en la industria farmacéutica<sup>127</sup>. Dependiendo de su composición química, en especial del largo de cadena de los hidrocarburos que la componen, puede encontrarse en estado líquido o semi-sólido. Se utiliza principalmente, como excipiente en formulaciones farmacéuticas tópicas donde sus propiedades emolientes son aprovechadas en bases de ungüentos<sup>128-130</sup>, en gotas oftalmológicas<sup>131</sup>, emulsiones O/W de polietilenglicol/glicerol<sup>132</sup> y como medio oleoso en la microencapsulación de diversas drogas<sup>133,134</sup>. Está reconocida internacionalmente como un producto de venta libre por la Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU. (FDA) y en Argentina por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), el ente regulador que garantiza que los productos para la salud sean eficaces, seguros y de calidad. Estas autorizaciones son importantes y se tuvieron en cuenta al momento de escogerla como fase orgánica en los experimentos del sistema líquido-líquido que serán detallados en los próximos capítulos. Es una materia prima que puede conseguirse con facilidad, a un bajo costo y en las cantidades necesarias para el trabajo experimental permitiendo su uso a largo plazo.

La Vaselina (VAS) debe cumplir con algunas especificaciones generales, entre ellas ser un líquido oleoso, transparente e incoloro, libre de fluorescencia; inodoro e insípido. Debe ser soluble en aceites volátiles y solventes orgánicos como cloroformo, éter, éter de

petróleo, sulfuro de carbono, entre otros<sup>135-136</sup>. Sin embargo, aunque se cumplan estas características, el producto final puede variar en su viscosidad y composición de hidrocarburos dependiendo de la clase de petróleo y del procedimiento de refinado utilizado, así como si su uso final será cosmético o medicinal.

Las monocapas de Langmuir en la interfase líquido/líquido requieren que tanto la fase acuosa como la fase superior no presenten impurezas tensioactivas que puedan interferir con las mediciones. Para obtener datos significativos y reproducibles se deben aplicar las precauciones que sean necesarias para evitar la contaminación de todos los materiales utilizados y se deben elegir los solventes con el mayor grado de pureza disponible<sup>137</sup>. Por lo tanto, considerando que VAS es una mezcla muy compleja y que el fabricante no brindó información referida a su peso molecular promedio y composición de hidrocarburos se utilizaron distintas técnicas espectroscópicas y analíticas para caracterizar el stock del producto comercialmente adquirido.

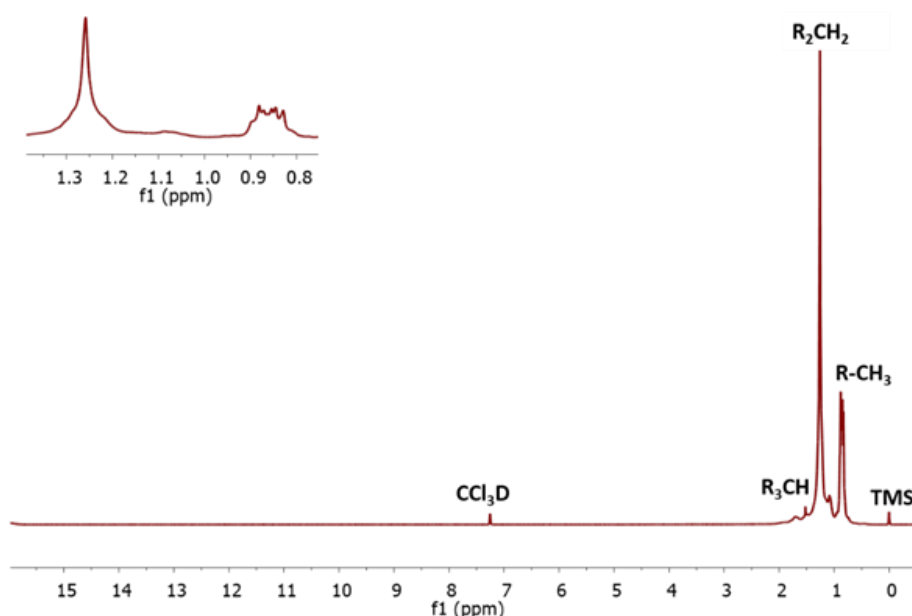
Es importante destacar que la bibliografía relacionada a la composición química de VAS es muy escasa y no se encuentran datos espectroscópicos disponibles. Esto puede deberse principalmente a que en las aplicaciones dónde es utilizada no se requiere una información detallada de su composición y sólo se evalúa que cumpla con ciertos estándares para su uso comercial (ver Figura A.1). Por consiguiente, invertir esfuerzos en realizar esta caracterización química fue de gran importancia para obtener, luego, datos cuantitativamente significativos en los experimentos de monocapas y emulsiones que se discutirán en los capítulos subsiguientes.

## **III.2. Caracterización química de VAS por <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN**

La espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una de las herramientas más útiles para elucidar estructuras moleculares, ya sea de moléculas orgánicas, organometálicas o biológicas. Considerando que la naturaleza química de las moléculas presentes en VAS es muy variada, esta técnica se aplicó con el objetivo de determinar principalmente si la muestra se compone sólo de alcanos (lineales, ramificados o cíclicos), si estos son saturados o insaturados y si hay presencia de compuestos orgánicos con otros grupos funcionales. Existen distintos tipos de experimentos que pueden realizarse

según la información que se necesite obtener. Para el análisis de VAS, se realizó un análisis cualitativo por  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN-DEPT 135 ° (ver Figura 20 y Figura 21).

Los espectros monodimensionales de  $^1\text{H}$ -RMN brindan información referida al número y tipos de hidrógenos diferentes que hay en las moléculas. La posición de los picos en el espectro definida por las variaciones en las frecuencias de absorción (desplazamiento químico,  $\delta$ ) respecto a una referencia, comúnmente una molécula con una distribución electrónica poco deformada (en este caso tetrametilsilano) permite determinar cómo es el entorno químico del núcleo y provee información de grupos funcionales a los que pertenecen estos hidrógenos o a los que se encuentran cercanos. Las señales observadas en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (ver Figura 20) entre 0,8 y 1,5 ppm corresponden sólo a alcanos saturados con cadenas ramificadas o no ramificadas ( $\text{R-CH}_3$ ,  $\text{R}_2\text{-CH}_2$ ,  $\text{R}_3\text{-CH}$ ), descartando así la presencia de protones olefínicos (que aparecen en el rango de  $\delta = 5,0 - 6,5$  ppm) y de protones aromáticos (en la región de  $\delta = 7,0 - 8,5$  ppm) <sup>138</sup>.



**Figura 20. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN de la Vaselina**

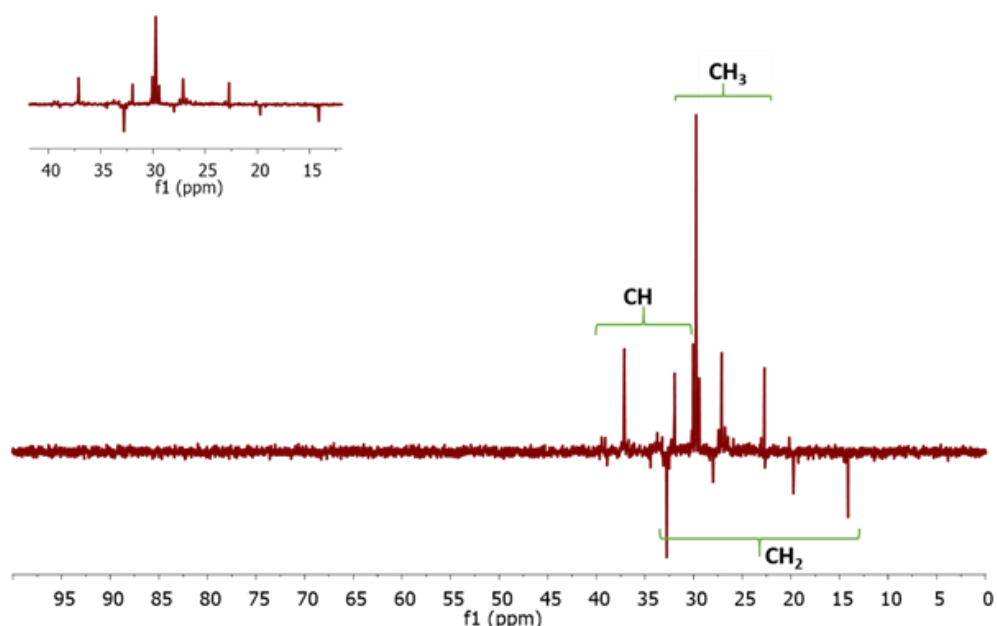
Adquirido inmediatamente después de la preparación de la solución. Solvente:  $\text{CCl}_3\text{D}$ , 400,13 MHz.

Por otra parte, la resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  es complementaria a la de  $^1\text{H}$  y determina el entorno magnético de los átomos de carbono. Sin embargo, es menos sensible que la  $^1\text{H}$ -RMN debido a que sólo el 1% de los átomos de carbono corresponden al isótopo activo  $^{13}\text{C}$ . Esto se debe a que aproximadamente el 99% de los átomos de carbono en una muestra natural son del isótopo  $^{12}\text{C}$  el cual no tiene spin magnético (posee un número par de protones y un número par de neutrones) y no puede dar lugar a señales de resonancia

magnética nuclear. Es por ello que sólo los átomos restantes que correspondan al isótopo de  $^{13}\text{C}$  (que tiene un número impar de neutrones) presentarán señal <sup>139,140</sup>.

El espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN obtenido (no mostrado) resultó ser muy complejo presentando una gran cantidad de señales que no podían ser asignadas. Debido a esto se realizó un *análisis de mejoramiento sin distorsión por transferencia de polarización* (DEPT, del inglés **D**istortionless **E**nhancement by **P**olarization **T**ransfer). El objetivo de este análisis es obtener señales correspondientes a los grupos metilo ( $\text{CH}_3$ ), metileno ( $\text{CH}_2$ ) y metino ( $\text{CH}$ ) presentes en la muestra. Además, al ser una técnica que implica la transferencia de la polarización de un núcleo excitado a otro (protón-carbono), da como resultado una mejora de la sensibilidad con respecto a los espectros de carbono estándar ( $^{13}\text{C}$ -RMN)<sup>141, 142</sup>.

Las señales mostradas en el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN - DEPT  $135^\circ$  (ver Figura 21) revelan la sustitución de los átomos de carbono (las señales de  $-\text{CH}_2$  son negativas, mientras que las señales de  $-\text{CH}$  y  $-\text{CH}_3$  son positivas) y confirman la existencia de hibridización tipo  $\text{sp}^3$ , dado que los átomos de carbono que presentan este tipo de hibridización resuenan entre 10 y 45 ppm. Además, no hay señales que indiquen la presencia de átomos de carbono con hibridización tipo  $\text{sp}$  y/o  $\text{sp}^2$ , que se encuentran normalmente en un rango de 60 y 95 ppm o entre 100 y 150 ppm (para carbonos olefínicos), respectivamente <sup>143</sup>. Asimismo, no hay presencia de carbonos carbonílicos con hidridización tipo  $\text{sp}^2$ , cuyas señales aparecen habitualmente entre 160 y 220 ppm.



**Figura 21. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN-DEPT  $135^\circ$  de la Vaselina.**

Adquirido inmediatamente después de la preparación de la solución. Solvente:  $\text{CCl}_3\text{D}$ , 100,03 MHz.

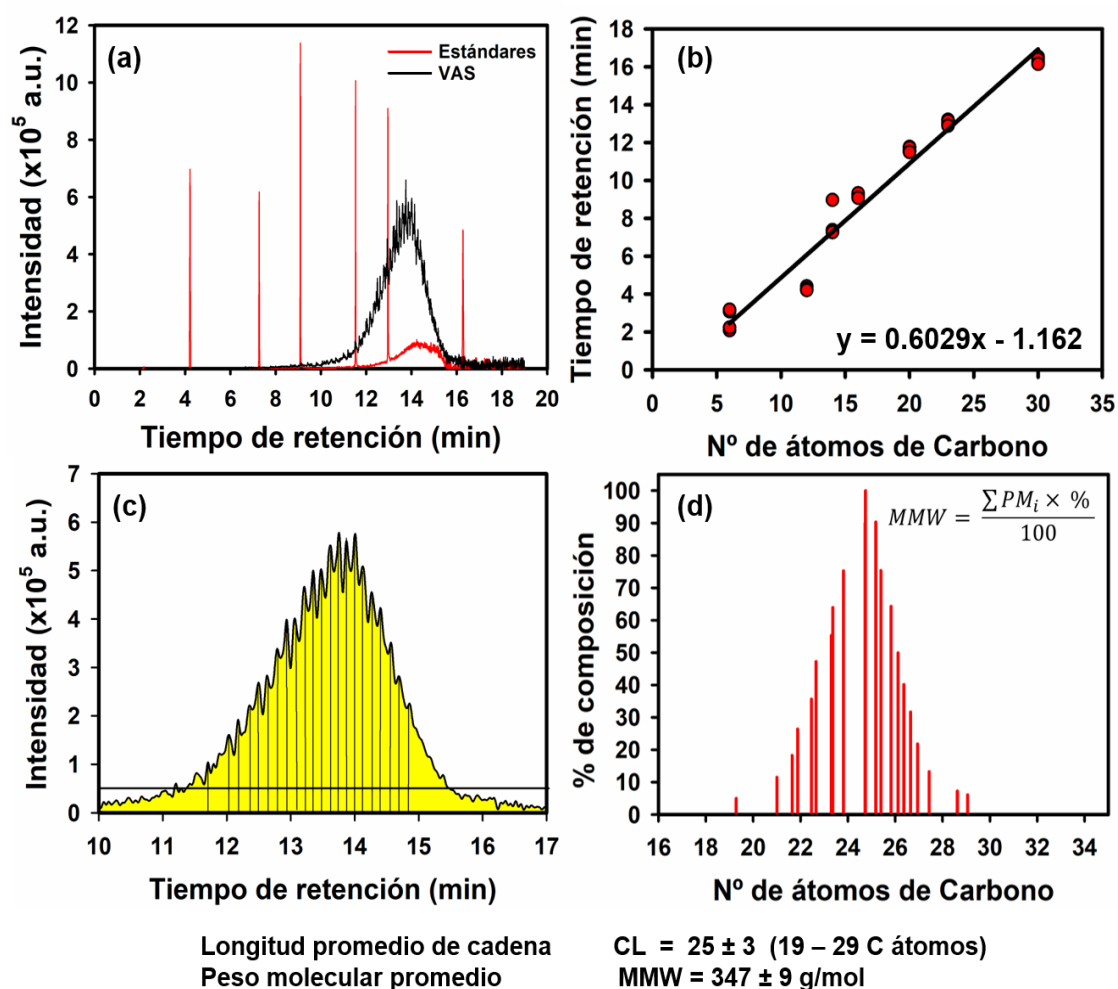
### III.3. Análisis de VAS por CG-MS

La metodología analítica de cromatografía gaseosa (CG) acoplada a la espectrometría de masas (MS) permite la detección y cuantificación de moléculas orgánicas en solución líquida o en fase gaseosa. Comúnmente, mediante la búsqueda en una base de datos y por comparación con el cromatograma o espectro de masas generado, se puede realizar una identificación tentativa de los componentes presentes en la muestra. En particular, en el equipo utilizado para analizar la muestra de VAS la separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna capilar con flujo de helio y la detección se realizó por espectrometría de masas usando una trampa de iones. Sin embargo, la fuente de ionización del equipo era de impacto electrónico y produjo una gran cantidad de fragmentos con distintas relaciones masa/carga. Considerando que la VAS es una mezcla muy compleja los espectros de masas obtenidos debieron ser desestimados, ya que a partir de ellos no se pudieron identificar iones moleculares ni otras señales que aportaran información relevante de nuestra muestra.

Por otra parte, el cromatograma que se obtuvo presentó una gran cantidad de señales, pero resultó de utilidad para dilucidar datos de importancia como lo son el peso molecular promedio (MMW) y la longitud promedio de las cadenas hidrocarbonadas (CL) presentes en las moléculas que componen la VAS. Sin embargo, como se esperaba, los sistemas de identificación de señales por comparación con cromatogramas registrados en bases de datos no fueron exitosos. Es por ello que se buscaron muestras de estándares de hidrocarburos de distintos largos de cadena para poder construir una curva de calibración.

Los estándares que se utilizaron fueron hidrocarburos saturados: *n*-hexano (C6), *n*-dodecano (C12), *n*-tetradecano (C14), *n*-hexadecano (C16), *n*-eicosano (C20), *n*-tricosano (C23) y *n*-triacontano (C30). Primero se los evaluó individualmente para verificar su nivel de pureza y tiempos de retención. Luego se realizó una mezcla de todos los estándares y se analizó por CG. El cromatograma obtenido para VAS y para la mezcla de los alcanos estándares puede observarse en la Figura 22a. A partir de este gráfico pudo determinarse que la señal de VAS era muy amplia, y que el pico ancho observado claramente era el resultado de la combinación de las múltiples señales de distintas moléculas. A pesar de ello, los estándares obtenidos resultaron ser representativos para realizar una curva de calibración, ya

que no se detectaron señales de algún componente presente en VAS que tuviera un tiempo de retención mayor al hidrocarburo estándar de mayor longitud de cadena (C30).



**Figura 22. Análisis cromatográfico de la composición de VAS**

(a) Intensidad vs. tiempo de retención del patrón de picos de alcanos con diferentes longitudes de cadena (estándares, líneas rojas) y de VAS (líneas negras), separados por cromatografía CG-MS. (b) Curva de calibración obtenida a partir del tiempo de retención de los estándares analizados en (a) en función del número de átomos de C. (c) El cromatograma correspondiente a VAS obtenido en (a) se amplificó y, para cada pico, se identificó el valor del tiempo de retención medio, interpolando luego el valor en la curva de calibración (b) para asignar el número de átomos de C. (d) La intensidad relativa de los picos separados en la muestra de VAS se representó en función del número correspondiente de átomos de carbono.

Los datos de tiempos de retención para la curva de calibración se recolectaron a partir de 5 o 6 cromatogramas obtenidos en experimentos independientes.

Posteriormente, se graficaron los tiempos de retención obtenidos para cada estándar en función de su número de carbonos. De este modo se construyó una curva de calibración (ver Figura 22b) que fue utilizada para interpolar los datos de los tiempos de retención obtenidos para las señales de los componentes de VAS detalladamente en un

cromatograma amplificado (ver Figura 22c). Finalmente, la masa molecular promedio (MMW) de la muestra de VAS se calculó como el promedio ponderado de las masas moleculares de cada componente identificado en VAS, donde el factor de ponderación fue abundancia relativa de cada pico (ver Figura 22d). Una vez calculada esta composición y considerando los pesos molares de los componentes identificados se pudo determinar el MMW de VAS que resultó  $347 \pm 9$  g/mol

### III.4. Conclusiones

Las técnicas de RMN y CG-MS utilizadas para determinar la composición y la naturaleza química de las moléculas presentes en VAS resultaron ser adecuadas y aportaron los datos necesarios para que los experimentos detallados en los próximos capítulos pudieran realizarse correctamente.

En primer lugar, el análisis cualitativo realizado mediante  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN - DEPT 135 ° demostró que la VAS estaba constituida por hidrocarburos saturados lineales y ramificados. Se descartó la presencia de otros grupos funcionales, así como la de alquenos o alquinos dado que la única hibridización observada para los átomos de C fue  $\text{sp}^3$ .

En segundo lugar, los experimentos de CG-MS permitieron determinar y nuevamente verificar que la VAS utilizada está compuesta por alcanos saturados con longitudes de cadena que varían entre los 19 y 29 átomos de carbono ( $25 \pm 3$  C) y cuya masa molecular promedio es de  $347 \pm 9$  g / mol.



## **Capítulo IV**

### ***Filmes de Langmuir en la interfase líquido/líquido***

#### **IV.1. Introducción**

Las monocapas de Langmuir construidas en la interfase entre dos solventes inmiscibles (interfase líquido/líquido) son un sistema modelo muy apropiado para investigar la estructura y la estabilidad de nano-emulsiones a nivel molecular. Este conocimiento es relevante en muchos fenómenos que son cruciales en áreas tan diversas como las ciencias de la vida, las ciencias ambientales y la tecnología. La variedad de estudios encontrados en la literatura incluye no sólo monocapas de tensioactivos de diferente naturaleza química (por ejemplo, lípidos<sup>61, 144-145</sup>, asfaltenos<sup>106</sup>, proteínas<sup>62, 146</sup> y polímeros<sup>147</sup>) sino también de partículas sólidas (nanopartículas, partículas en el rango de tamaño coloidal y mayores)<sup>148-149</sup>. Para la fase inferior (la de mayor densidad) uno de los líquidos más utilizados suele ser agua, mientras que para la otra fase líquida pueden escogerse solventes volátiles (como cloroformo, tolueno<sup>106</sup>, benceno<sup>150</sup>), alcanos de diferente largo de cadena<sup>61</sup> o triglicéridos de aceites naturales<sup>151</sup>. Aunque una interfase líquida puede ser pensada como una región que segrega dos líquidos, no impide la transferencia de masa y energía entre ellos. Por lo tanto, dependiendo de la composición química de los surfactantes utilizados y de la fase líquida hidrofóbica las monocapas pueden comportarse como filmes insolubles o solubles<sup>152</sup>.

A pesar del inmenso interés en monocapas mixtas en la interfase aceite/agua, se dispone de muy poca información sobre el uso de la técnica de filmes de Langmuir en la interfase líquido/líquido. Esto se debe principalmente a las dificultades experimentales y a los desafíos que conlleva su aplicación, los cuales no se encuentran detallados o revelados en la literatura disponible. La mayoría de los experimentos realizados para obtener datos de

presión interfasial vs. área molecular ( $\pi$  - MMA) se han desarrollado mediante la técnica de la gota pendiente<sup>153</sup> y también mediante el uso de cubas rectangulares con diferentes diseños<sup>106, 154-155</sup>. El material del sensor (placa de Wilhelmy) utilizado para las mediciones de  $\pi$  varía en los distintos trabajos publicados desde Teflón<sup>TM</sup> 154, platino platinizado<sup>64</sup>, carbon<sup>156</sup>, papel de filtro<sup>106</sup> hasta mica hidrofóbica recubierta con carbón negro de una llama de butano/aire<sup>155</sup>. La elección de un material adecuado para la placa Wilhelmy es crucial para satisfacer la condición de ángulo de contacto cero ( $\theta = 0^\circ$ ) entre el sensor y los líquidos<sup>64, 157</sup>. Este detalle técnico es muy importante y generalmente no se lo destaca suficiente, pero el incumplimiento de  $\theta = 0^\circ$  puede tener consecuencias no siempre evidentes, principalmente cuando la combinación de surfactante y fases líquidas es un sistema que no ha sido estudiado anteriormente. Es importante destacar la escasez de información bibliográfica respecto a las monocapas en la interfase aceite/agua (O/W). Ni la razón detrás de los métodos aplicados para construir las ni el análisis de sus límites de estabilidad han recibido suficiente atención en los últimos años.

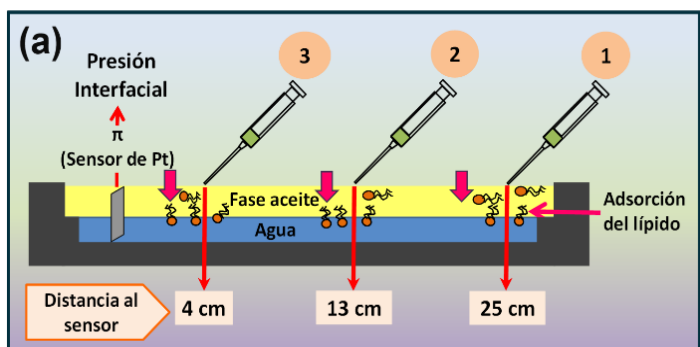
En el presente capítulo, se realizó un detallado análisis comparativo de diferentes técnicas utilizadas para la preparación de filmes de Langmuir en la interfase O/W utilizando fosfatidilcolina de huevo (EPC) como fosfolípido modelo y Vaselina (VAS) como fase aceite. Mediante este modelo experimental, se evaluó el comportamiento dinámico y la estabilidad del fosfolípido en la interfase O/W y se calcularon parámetros moleculares, reológicos y termodinámicos a partir de isothermas de compresión. En la interfase O/W, las moléculas de agua de la fase acuosa pueden estructurarse alrededor de los grupos de las cabezas polares de EPC y las moléculas de la fase aceite pueden insertarse entre las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos. Por lo tanto, una monocapa de EPC en la interfase O/W puede considerarse como una mezcla pseudo-binaria de fosfolípido y VAS. Para comprender este fenómeno, se realizaron también estudios de monocapas mezcla de EPC con VAS a distintas fracciones molares en la interfase agua/aire (A/W). En los capítulos subsiguientes se profundizará más al respecto de este tipo de experimentos, pero utilizando otro fosfolípido modelo.

## IV.2. Resultados y Discusión

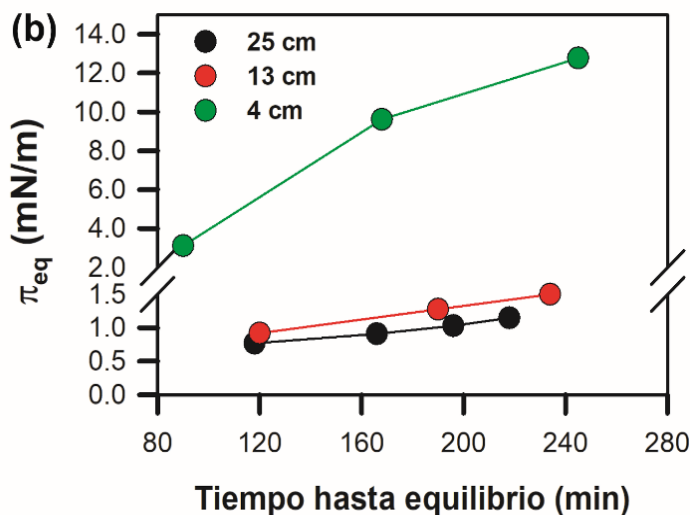
Como se mencionó anteriormente, existen distintos métodos para formar filmes de Langmuir en la interfase O/W. Debido a esto primero se analizaron distintas condiciones para formar este tipo de monocapas.

### IV.2.1. Monocapas adsorbidas (AM)

En un primer experimento, un volumen fijo (1  $\mu\text{l}$ ) de una solución 10 mM de EPC en cloroformo se sembró repetidas veces en la interfase aire/aceite (A/O). La presión interfacial de equilibrio ( $\pi_{\text{eq}}$ ) en la interfase O/W en función del tiempo requerido para lograr dicho valor de  $\pi$ , se representa en la Figura 23. Este procedimiento se realizó a diferentes distancias de la placa Wilhelmy (sensor de Pt) cuya posición se consideró como punto de referencia (0 cm) (Figura 23a). Como tendencia general, el valor de  $\pi$  aumentó en función del número de siembras. Los valores de  $\pi_{\text{eq}}$  alcanzados fueron significativamente más altos y se lograron en períodos de tiempo más cortos cuando el punto de siembra estaba más cerca de la placa de Wilhelmy (Figura 23b).



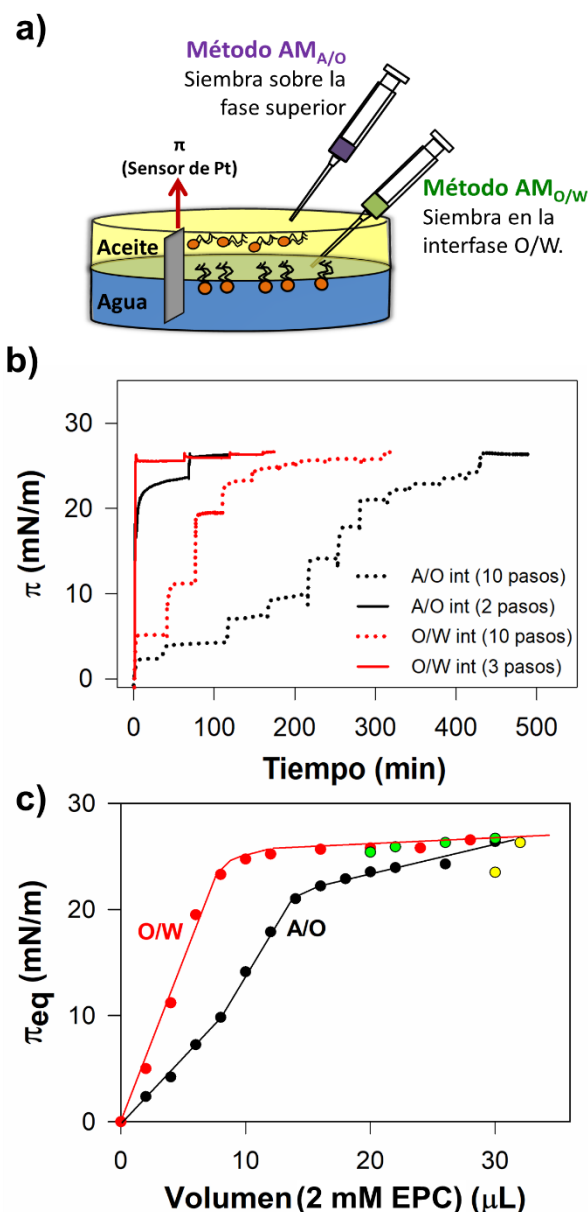
**Figura 23. Adiciones sucesivas de EPC a la interfase A/O, a distintas distancias de la placa de Wilhelmy.**



a) Representación gráfica de la configuración experimental.  
 b) Presión de equilibrio en la interfase O/W alcanzada después de adiciones sucesivas en la interfase A/O de 1  $\mu\text{l}$  de una solución 10 mM de EPC, en función del tiempo requerido para alcanzar cada equilibrio. Los números en el gráfico indican la distancia entre la placa Wilhelmy y el punto de siembra. Los datos corresponden a experimentos representativos.

Es de destacar que el proceso fue muy lento, ya que después de la primera siembra de 1  $\mu\text{L}$  de la solución de EPC, se necesitó un tiempo considerable (90 o 120 min) hasta que se alcanzó la  $\pi_{\text{eq}} = 3$  o 0,76 mN/m cuando la siembra se realizó a 4 o a 25 cm del sensor, respectivamente. Estos resultados reflejan claramente las restricciones difusionales de las moléculas de EPC, a las que contribuyen la difusión 3D a lo largo de la fase superior de vaselina y la difusión 2D en las interfaces O/W y A/O.

Para comparar el desempeño de los métodos  $\text{AM}_{\text{A/O}}$  y  $\text{AM}_{\text{O/W}}$ , se realizaron estudios de cinética de adsorción (Figura 24a). Para este experimento, la solución de EPC se sembró (en 2, 3 o 10 pasos) sobre la fase superior (Método  $\text{AM}_{\text{A/O}}$ ) o en la interfase O/W previamente formada (Método  $\text{AM}_{\text{O/W}}$ ) hasta alcanzar la presión de equilibrio de saturación ( $\pi_{\text{eq,sat}} \sim 26,4 \pm 0,1$  mN/m).



**Figura 24. Adsorción de EPC en la interfase VAS/W.**

(a) Esquema representativo del sistema experimental. Fase superior: VAS, volumen 12 mL; área total: 21,23  $\text{cm}^2$ .

(b) Gráfico de presión interfasial vs. tiempo, cuando la siembra se realiza mediante el método  $\text{AM}_{\text{A/O}}$  (— y ····) (en la interfase A/O) o por el método  $\text{AM}_{\text{O/W}}$  (— y ····) (en la interfase O/W), en 2 pasos (líneas sólidas) o en varios pasos consecutivos (líneas punteadas).

(c) Gráfico de presión interfasial de equilibrio vs. volumen de solución de EPC 2mM añadida, construido a partir de (b). Los puntos amarillos y verdes se corresponden a los experimentos con 2-4 pasos de siembra en las interfases A/O y O/W, respectivamente. Las curvas mostradas son de experimentos representativos que varían en menos de 2 mN/m con sus respectivas réplicas.  $T = 25 \pm 1$   $^{\circ}\text{C}$ .

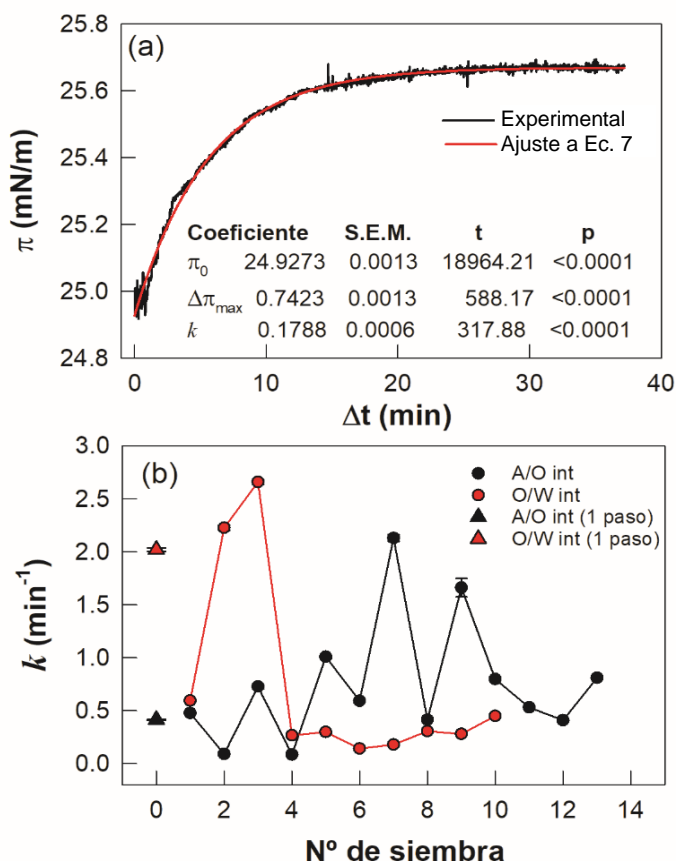
Cuando la adición de la solución de EPC se realizó en 2 o 3 pasos (Figura 24b, líneas solidas), hubo una diferencia de 4  $\mu\text{L}$  entre ambos métodos de adsorción para alcanzar la misma  $\pi_{\text{eq, sat}}$ . Mientras que para el método  $\text{AM}_{\text{A/O}}$  se necesitaron 34  $\mu\text{L}$  de una solución 2 mM de EPC para alcanzar la  $\pi_{\text{eq, sat}}$  (una siembra de 30  $\mu\text{L}$  para alcanzar 23,5 mN/m y 2 siembras de 2  $\mu\text{L}$  hasta completar el proceso), en el método  $\text{AM}_{\text{O/W}}$  se requirieron sólo 30  $\mu\text{L}$  (20  $\mu\text{L}$  para alcanzar 25,6 mN/m, y 3 agregados más, uno de 2  $\mu\text{L}$  y 2 de 4  $\mu\text{L}$ ). Esta diferencia de volumen evidenció que con el método  $\text{AM}_{\text{A/O}}$  una fracción de las moléculas sembradas no puede alcanzar la interfase VAS/W, por lo que más moléculas fueron requeridas para obtener la misma  $\pi_{\text{eq, sat}}$  que en el método  $\text{AM}_{\text{O/W}}$ . Dado que las isothermas de compresión  $\pi$ -MMA indicaron que las moléculas de lípidos no son retenidas en la interfase A/VAS (ver isothermas en la Figura 26a) se deduce que la preparación de la monocapa  $\text{EPC}_{\text{O/W}}$  a través del método  $\text{AM}_{\text{A/O}}$  implica que un porcentaje de moléculas permanecen disueltas en la fase superior. Esto permitió estimar una solubilidad de EPC en vaselina de  $S_{\text{EPC, VAS}} = 0,66 \mu\text{M}$ .

Por otra parte, si se realiza un análisis adicional de los experimentos realizados mediante la adición de EPC en 10 pasos, donde se observa la variación de  $\pi$  vs. volumen agregado (Figura 24c) puede demostrarse que, en comparación con el método  $\text{AM}_{\text{A/O}}$ , en el método  $\text{AM}_{\text{O/W}}$  la presión interfásica crece más rápidamente, exhibiendo una mayor pendiente en el gráfico. Además, el plateau en el caso del método  $\text{AM}_{\text{O/W}}$  es alcanzado con un menor volumen de la solución 2 mM de EPC (12  $\mu\text{L}$ ) comparado con el método  $\text{AM}_{\text{A/O}}$  (28  $\mu\text{L}$ ). Sin embargo, considerando que la concentración de la solución de EPC es 2 mM, una alícuota de 12  $\mu\text{L}$  contendría  $1,44 \times 10^{16}$  moléculas. El área molecular promedio a la  $\pi_{\text{eq, sat}}$  es  $93 \pm 1 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$  (dato obtenido de la isoterma  $\text{EPC}_{\text{O/W}}$ , Figura 26a), por lo tanto, la cantidad de moléculas presentes en 12  $\mu\text{L}$  de solución podrían formar una monocapa con un área total de  $134 \text{ cm}^2$ , la cual es significativamente mayor que el área disponible de la placa de Petri utilizada en estos experimentos (área total =  $21 \text{ cm}^2$ ). En otras palabras, para lograr una capa monomolecular a la  $\pi_{\text{eq, sat}}$ , esta cantidad de moléculas debe empaquetarse a una densidad molecular superficial de  $15,8 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ , que es significativamente mayor de lo que se esperaría evaluando la isoterma  $\pi$ -MMA de  $\text{EPC}_{\text{O/W}}$ , entonces, o bien las moléculas no se encuentran organizadas en una capa monomolecular o están parcialmente distribuidas entre la monocapa y una o ambas de las fases líquidas. Aunque esta configuración no

permitió un control exhaustivo de la deposición molecular, proporcionó información semicuantitativa útil sobre el comportamiento diferencial de las técnicas  $AM_{A/O}$  y  $AM_{O/W}$ .

A partir de la Figura 24b se realizaron ajustes estadísticamente significativos de la cinética de adsorción en cada paso de siembra utilizando la Ec. (7) (ver Figura 25a) y se analizó la cinética de siembra mediante la constante de tiempo  $k$  de adsorción (Figura 25b).

La constante de tiempo obtenida para alcanzar la  $\pi_{eq}$  en un paso por la adsorción en la interfase A/O fue  $k_{A/O} = 0,48 \text{ min}^{-1}$ , cuyo valor es casi 4 veces menor que la constante alcanzada al preparar monocapas por la adsorción en la interfase O/W ( $k_{O/W} = 2 \text{ min}^{-1}$ ). Este fenómeno, puede explicarse considerando que el primer método ( $AM_{A/O}$ ) incluye un paso de difusión de las moléculas de EPC a lo largo de la fase superior, el cual está ausente en el segundo.



**Figura 25. Cinética de formación de la monocapa de EPC en la interfase VAS/W.**

(a) Ajuste representativo (—), por el método de mínimos cuadrados, de la Ec. 7 a los datos sin procesar (—) correspondientes a cada uno de los pasos de adsorción que se muestran en la Fig. 24b; También se incluyen los valores y la significación estadística de los parámetros. (b) Constante de tiempo  $k$  determinada en cada paso de siembra como se indica en (a). Las barras de error están dentro del tamaño de los símbolos.

Cuando la preparación de la monocapa se realizó en varios pasos a través del método  $AM_{O/W}$ , la adsorción en la interfase O/W, inicialmente, exhibió valores de  $k$  crecientes, hasta un valor máximo de  $k = 2,7 \text{ min}^{-1}$ , al alcanzar el 70% de la  $\pi_{eq}$ . A partir de ese momento, la velocidad de adsorción de las siguientes alícuotas de EPC añadidas disminuyó

significativamente con valores de  $k \sim 0,3 \text{ min}^{-1}$  y que permanecieron constantes hasta alcanzar la  $\pi_{\text{eq}}$ . Este fenómeno refleja la mayor energía de activación (menor coeficiente de difusión 2D) requerida por las nuevas moléculas adicionadas al sistema para ingresar a una interfase que ya se encuentra ocupada pero aún no saturada. Además, sugiere la aparición de un fenómeno cooperativo en las etapas iniciales de adsorción, donde las primeras moléculas adsorbidas estarían reduciendo el tiempo requerido para la detección de las moléculas adsorbidas posteriormente. Por el contrario, la adsorción en la interfase A/O ( $AM_{A/O}$ ) en varios pasos exhibió valores de  $k$  oscilantes con la adición de sucesivas alícuotas de EPC, esto sugiere una respuesta global no lineal, emergente de los fenómenos de difusión 2D y 3D combinados.

La difusión 2D entre dos fases líquidas se puede definir a partir de la ecuación de Einstein como  $D = k_B T / \lambda$  con un término de resistencia hidrodinámica modificado  $\lambda = 8(\eta_1 + \eta_2)r$  que depende de la viscosidad de cada líquido ( $\eta_1$  y  $\eta_2$ ) y del radio ( $r$ ) de la molécula que difunde y que predomina a bajas viscosidades interfaciales (revisar Sección II.2.3.4). Para  $\eta_{\text{agua}} = 1 \text{ cP}$  y  $\eta_{\text{VAS}} = 1,9 \text{ cP}$ <sup>113</sup>,  $T = 294 \text{ K}$  y  $MMA = 50 \text{ \AA}^2 / \text{molécula} \equiv r = 3,99 \text{ nm \AA}$ , se obtiene que  $D = 4,38 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  ( $\equiv 438 \text{ \mu m}^2/\text{s}$ ). Este valor se compara razonablemente con los datos informados por *Negishi, M., et al.*<sup>114</sup>. El valor determinado para el radio de la partícula que difunde es muy alto en relación con los valores que surgen de las isotermas de compresión  $\pi$ -MMA. Esto refleja el movimiento colectivo de las moléculas de fosfolípido con las moléculas del solvente de la fase superior.

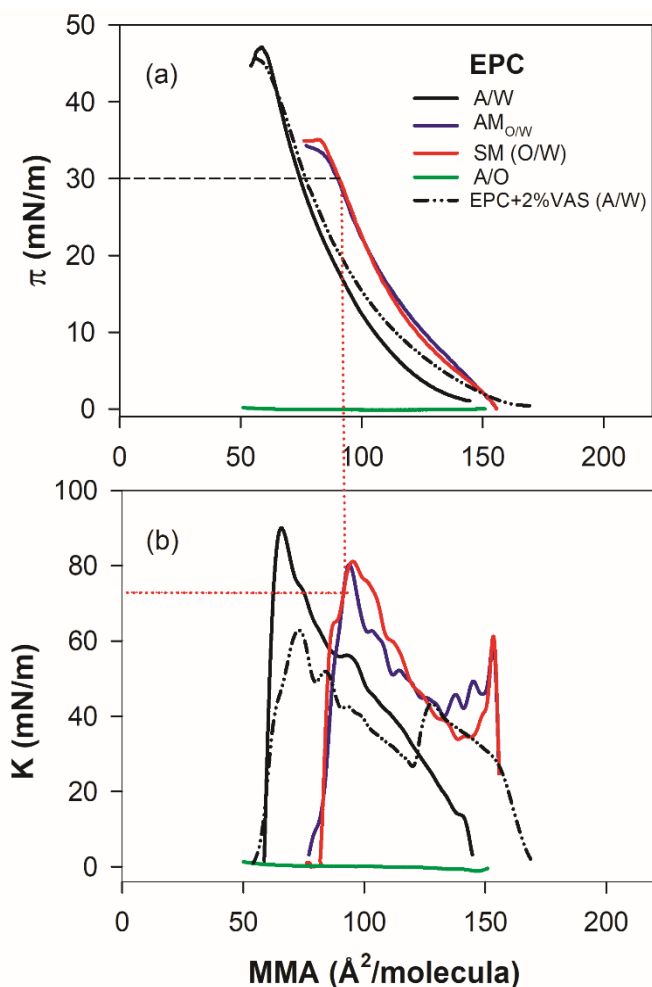
Además, en la interfase entre el agua y un solvente altamente viscoso, se ha sugerido que las moléculas exhiben una especie de mecanismo de difusión interfásial con un modo "saltatorio" (del término en inglés "*hopping*") que involucra estados de transición donde la molécula de adsorbato se desprende temporalmente de la superficie<sup>158</sup>. Estos antecedentes serían coherentes con la hipótesis sugerida más arriba respecto a la existencia de una organización de las moléculas de EPC en forma de no-monocapa en la interfase O/W a partir de las irregularidades observadas en la constante de velocidad de adsorción  $k$  de EPC a través del método  $AM_{A/O}$ . Por lo tanto, debido a la imposibilidad de asegurar una dispersión molecular cuantitativa y a la complejidad en su cinética de adsorción que dificultaría la obtención de parámetros moleculares confiables, tales como el área molecular media, el método de siembra  $AM_{A/O}$  fue descartado.

## IV.2.2. *Monocapas esparcidas y adsorbidas en la interfase O/W*

Cuando se utiliza la cuba de teflón, que presenta un área aproximadamente 10 veces mayor al sistema experimental mostrado anteriormente, se pueden obtener satisfactoriamente monocapas lipídicas con los métodos  $AM_{O/W}$  y SM, cuando la cantidad de moléculas sembradas conducen a una MMA inicial mayor al área de despegue (en inglés, “lift-off”) de la isoterma, la cual corresponde al área por molécula cuando se puede detectar la presión superficial, es decir,  $\pi \geq 1 \text{ mN/m}$ <sup>137</sup>. Si las monocapas se preparan mediante el método SM (siembra en la interfase A/W antes de la adición de la fase superior), se requiere de un cuidado considerable para evitar la alteración del filme formado y la migración de moléculas fuera de la interfase O/W. Teniendo en cuenta este problema y trabajando con precaución, se realizó un análisis comparativo de las técnicas  $AM_{O/W}$  y SM mediante isotermas de presión superficial vs. área molecular promedio ( $\pi$ -MMA) (Figura 26a). Es importante destacar que la monocapa en la interfase O/W incluye no sólo moléculas de EPC sino también moléculas de la fase superior, en consecuencia, la MMA de EPC calculada debe considerarse en este caso como una MMA aparente ( $MMA_{ap}$ ).

Por otra parte, se demostró que las moléculas de EPC no formaron una monocapa estable en la interfase A/O, lo que se observa en la isoterma de la Figura 26a (línea verde), donde la  $\pi$  permaneció constante en valores cercanos a cero indicando que las moléculas sembradas no se mantienen en la interfase durante la compresión. Esto implica que la EPC no particiona en la interfase A/O e indica que, cuando la monocapa se prepara mediante la técnica  $AM_{O/W}$ , toda la población de moléculas de EPC se distribuye entre la fase superior y la monocapa sobre la interfase líquido-líquido. Además, las isotermas de compresión  $\pi$ -MMA de los filmes en la interfase O/W preparados mediante las técnicas  $AM_{O/W}$  y SM fueron superponibles (Figura 26a, líneas azul y roja) demostrando que pueden ser utilizadas para la preparación de monocapas en la interfase O/W y que tienen una eficiencia de siembra similar. Dado que el método SM es más sencillo de realizar experimentalmente fue el método utilizado en los experimentos de compresión posteriores.



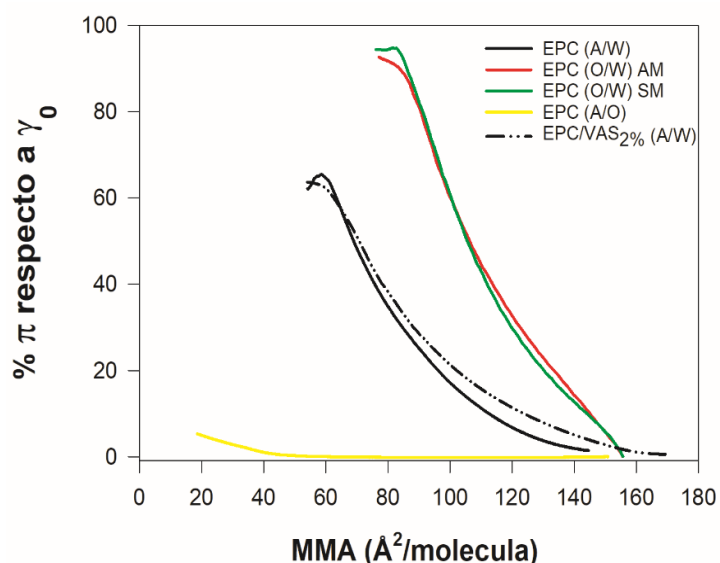


**Figura 26. Isothermas  $\pi$  vs. MMA o K vs. MMA para monocapas de EPC.**

Se pueden observar gráficos de presión superficial/interfasial en (a) y módulo de compresibilidad en (b) vs. MMA.

Se prepararon monocapas de EPC y de una mezcla pseudobinaria de EPC y VAS a una fracción molar de 0,02, en la interfase aire/agua (A/W) y/o en la interfase vaselina/agua (O/W). Las líneas rectas ilustran el procedimiento para obtener valores de K a 30 mN/m a partir de interpolaciones sucesivas en las isothermas de  $\pi$ -MMA y K-MMA, respectivamente, obtenidas en cada condición experimental.

Las monocapas en la interfase O/W exhibieron isothermas de compresión  $\pi$ -MMA más expandidas y con menor presión de colapso ( $\pi_c$ ) que las isothermas de las monocapas preparadas en la interfase A/W. Esto último podría interpretarse como una menor estabilidad del filme en la interfase O/W que en la interfase A/W, si se aplica la lógica habitual. Sin embargo, el límite superior de  $\pi$  que cualquier filme monomolecular puede alcanzar en una determinada interfase es la tensión superficial de dicha interfase limpia ( $\gamma_0$  en Ec. (4)). Para las interfaces A/W y VAS/W, los valores de  $\gamma_0$  son  $\gamma_{0, A/W} = 72$  y  $\gamma_{0, VAS/W} = 37$  mN/m y las presiones de colapso de EPC fueron  $\pi_{c, A/W} = 61$  y  $\pi_{c, VAS/W} = 34$  mN/m. Entonces,  $\pi_{c, A/W}$  y  $\pi_{c, VAS/W}$  representarían  $\sim 85\%$  y  $\sim 92\%$  de sus respectivos valores de  $\gamma_0$ , (ver Figura 27) lo que implica que una monocapa de EPC en la interfase O/W no sería menos estable que en la interfase A/W.



**Figura 27. Isothermas de presión superficial/interfasial vs. área molecular promedio normalizadas.**

Isothermas de compresión de presión superficial/interfasial vs. área molecular promedio de EPC pura en las interfaces A/W, A/O y O/W y de la mezcla pseudobinaria EPC/VAS<sub>0.02</sub> en la interfase A/W, normalizadas por la tensión superficial de la interfase limpia correspondiente ( $\gamma_0$ ).

El módulo de compresibilidad  $K$ , calculado a partir de la Ec. (5), se representa en función de MMA en la Figura 26b. Este parámetro refleja cualitativamente el estado físico de la monocapa y puede ayudar a identificar la presencia de transiciones de fase bidimensionales. Un alto valor de  $K$  (baja compresibilidad) significa que las moléculas están fuertemente compactadas y que las fuerzas cohesivas son considerables.  $K$  generalmente se emplea para clasificar el estado de las monocapas de Langmuir. Para monocapas en la interfase A/W, un valor de  $K$  de la misma magnitud que  $\pi$  está asociado con un estado gaseoso (G), mientras que para filmes en un estado líquido expandido (LE)  $K$  varía de 12,5 a 50 mN/m y para un estado líquido condensado (LC) se caracteriza por valores más altos (entre 100-250 mN/m), según Davies y Rideal<sup>58</sup>. Suponiendo que esta regla se aplica también a los filmes en la interfase O/W, se puede determinar que todas las monocapas estudiadas cambiaron de fase G a LE a lo largo de la isoterma de compresión.

En algunas de las isothermas obtenidas con la mezcla EPC/VAS<sub>0.02</sub> en la interfase A/W, se detectó algunas veces una irregularidad entre 9 y 12 mN/m (no mostrada) que se asemejaba a una transición que podría estar asociada con el inicio de la exclusión del exceso de VAS desde la monocapa hacia una fase líquida hidrofóbica. Este exceso de VAS debería crecer con la compresión y permanecer en equilibrio con una monocapa mezcla EPC/VAS<sub>A/W</sub> de composición constante. Esta hipótesis se confirmó posteriormente mediante estudios de microscopía (ver más adelante) y surge a partir del análisis presentado por Caruso *et al.*<sup>104</sup> del comportamiento de filmes mezcla de triglicéridos con fosfolípidos en diagramas de fase de  $\pi$ -composición.

En la Tabla 2 se muestra un resumen de los datos moleculares, termodinámicos y reológicos, a 20 y 30 mN/m, de todas las monocapas evaluadas en la Figura 26. En términos generales, en comparación con monocapas en la interfase A/W, los filmes de EPC en la interfase O/W a 20 mN/m se encuentran más expandidos (mayor MMA) y presentan un módulo de compresión similar ( $K$ ). A 30 mN/m, la diferencia en MMA fue menor, mientras que los valores de  $K$  permanecieron similares para ambas monocapas. Curiosamente, la mezcla EPC/VAS<sub>0.02; A/W</sub> exhibió el módulo compresional más bajo (compresibilidad más alta) a ambos valores de  $\pi$  analizados.

**Tabla 2. Análisis reológico y termodinámico de los filmes de Langmuir.**

Sistema	MMA	$K^{al}$	MMA	$K^{al}$	Estado de fase	$\Delta G_{comp}^{bl}$ (kJ/mol)
	(Å <sup>2</sup> /molec)	(mN/m)	(Å <sup>2</sup> /molec)	(mN/m)		
	20 mN/m		30 mN/m			
EPC <sub>A/W</sub>	87 ± 1	61 ± 3	74 ± 1	75 ± 4	LE	2,4 ± 0,2
EPC/VAS <sub>0.02A/W</sub>	91 ± 1	45 ± 3	75 ± 2	58 ± 3	LE	3,6 ± 0,4
EPC <sub>O/W</sub> (AM)	104 ± 1	62 ± 1	90 ± 1	71 ± 3	LE	2,80 ± 0,2
EPC <sub>O/W</sub> (SM)	104 ± 1	68 ± 5	91 ± 1	73 ± 1	LE	2,70 ± 0,1

Los datos se tomaron de isotermas de compresión de monocapas de EPC pura o de la mezcla pseudo binaria de EPC y VAS a una fracción molar de 0,02, preparadas en la interfase A/W o en la interfase VAS/W. Los valores son la media ± S.E.M. de al menos dos experimentos independientes. T = 25 ± 1 ° C. <sup>al</sup> Calculado a partir de la Ec. 5. <sup>bl</sup> Calculado a partir de la Ec. 6 integrando isotermas de compresión entre 2 y 20 mN/m. La fracción molar de VAS en la mezcla EPC:VAS se indica como subíndice. Las fases VAS, W y A corresponden a vaselina, agua y aire, respectivamente.

El  $\Delta G_{comp}$  de una monocapa es un parámetro complejo que refleja no sólo el equilibrio energético entre las interacciones intermoleculares y la pérdida de entropía en la compresión, sino también la energía relacionada con las transiciones (no limitada a las transiciones de fase bidimensionales). El  $\Delta G_{comp}$  calculado para monocapas de EPC en la interfase O/W es mayor que en las interfaces A/W. Asumiendo que esta monocapa incluye moléculas de la fase superior, su  $\Delta G_{comp}$  posiblemente contiene un componente energético requerido para expulsar las moléculas de VAS desde la monocapa hacia la fase líquida hidrofóbica. A su vez, el  $\Delta G_{comp}$  para la monocapa EPC/VAS<sub>0.02, A/W</sub> es el más alto entre todas las monocapas estudiadas. Contendría un componente energético asociado a la transición identificada a través de la isoterma K-MMA, también debido a la expulsión de moléculas de VAS de la monocapa. Comparando las isotermas de EPC<sub>O/W</sub> y EPC/VAS<sub>0.02, A/W</sub>, resulta intrigante que siendo esta última la más compresible, al mismo tiempo requiere más energía para sufrir la misma compresión (entre 2 y 20 mN/m). Si en ambos casos el proceso de compresión implica

la exclusión de moléculas de VAS de la monocapa, parece que la presencia de la fase superior líquida (VAS) estaría aportando un efecto facilitador. Esto se analiza como mayor detalle en las siguientes secciones.

La estabilidad de las monocapas también se evaluó mediante ciclos de compresión-descompresión (C-D). Las monocapas de EPC en la interfase O/W exhibieron histéresis, generalmente positiva y a veces negativa, dependiendo del material de la placa Wilhelmy (papel, Pt, Pt platinizado), la velocidad de compresión y la  $\pi$  alcanzada antes de comenzar la descompresión. Se obtuvieron condiciones reproducibles utilizando Pt platinizado como sensor.

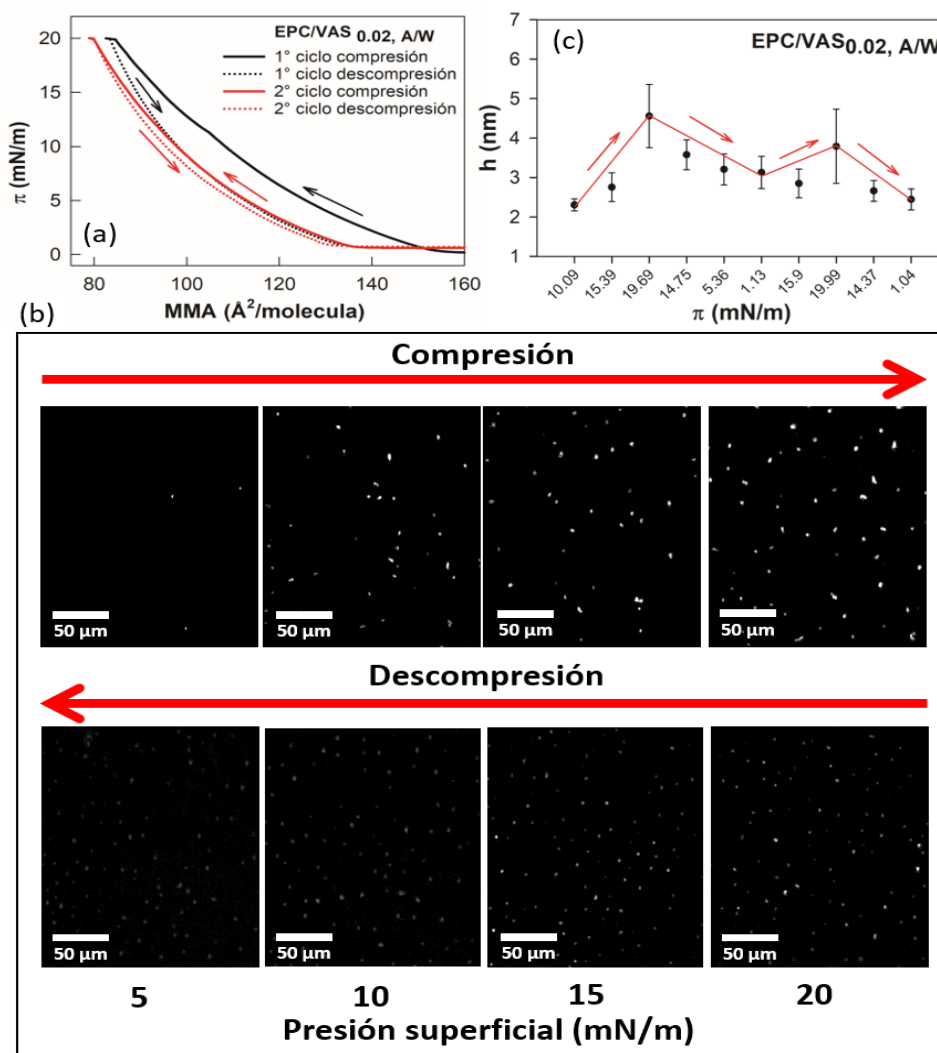
### ***IV.2.3. Filmes de Langmuir de EPC/VAS en la interfase agua/aire: un modelo experimental de monocapas de EPC en la interfase aceite/agua***

Suponiendo una composición tentativa de la monocapa de EPC en la interfase aceite/agua ( $EPC_{O/W}$ ), se realizó una mezcla de EPC con vaselina en una fracción molar  $X_{VAS} = 0,02$  ( $EPC/VAS_{0,02, A/W}$ ) y se estudió su comportamiento en la interfase A/W. La isoterma de compresión de esta mezcla se muestra en la Figura 26a (línea negra discontinua). A bajas  $\pi$ , se observó que la isoterma  $EPC/VAS_{0,02, A/W}$  se encuentra más expandida que la isoterma de EPC pura en la interfase A/W, lo que sugiere la permanencia de moléculas VAS en la monocapa.

En el primer ciclo de C-D, la isoterma de la monocapa  $EPC/VAS_{0,02, A/W}$ , exhibió una marcada histéresis negativa (Figura 28a). En la segunda compresión, la isoterma  $\pi$ -MMA siguió casi la misma trayectoria que la primera descompresión, por lo que aparece desplazada hacia áreas moleculares inferiores en comparación con la primera isoterma de compresión, lo que sugería que la monocapa ha perdido algunas moléculas en esta etapa. El segundo ciclo de C-D no mostró histéresis, lo que indica que después del primer ciclo de C-D se logró una estabilización.

Curiosamente, las imágenes obtenidas mediante BAM de la monocapa  $EPC/VAS_{0,02, A/W}$ , permiten observar la aparición de pequeños puntos brillantes de alta reflectividad (a partir de ahora denominados “lentes”), cuya densidad superficial aumentó tras el proceso de

compresión y no desaparecieron durante la descompresión (Figura 28b). La altura de las lentes (Figura 28c) se calculó a partir de los valores de reflectividad local de acuerdo con la Ec. (13) utilizando datos de las imágenes de BAM tomadas a diferentes presiones superficiales dentro de un ciclo de C-D. Los valores promedio correspondientes a varias lentes de una misma imagen se graficaron en función de la  $\pi$ . Estas estructuras exhibieron alturas dentro del rango nanométrico, aunque sus radios fueron micrométricos.



**Figura 28.** Análisis de los ciclos de C-D en monocapas de EPC/VAS  $0.02, A/W$ .

a) Isothermas  $\pi$ -MMA, b) Imágenes de BAM obtenidas a la  $\pi$  indicada. Las flechas indican el sentido del cambio de  $\pi$ . Las barras de escala representan 50  $\mu\text{m}$ . c) Altura ( $h$ ) de las lentes sobre el filme de EPC/VAS en la interfase A/W. Los datos son el promedio  $\pm$  SEM ( $n=5$ ). Los valores de  $h$  fueron calculados a partir de la Ec. 13 de acuerdo con la ref. 117. Se analizaron al menos 5 lentes por imagen de BAM. Las líneas y las flechas son para guiar la lectura.

En conjunto, estas observaciones sugieren que, durante la primera compresión, la monocapa sufre cambios irreversibles asociados con la pérdida de algunas moléculas, presumiblemente de VAS, que no se recuperan después de la descompresión. Estas

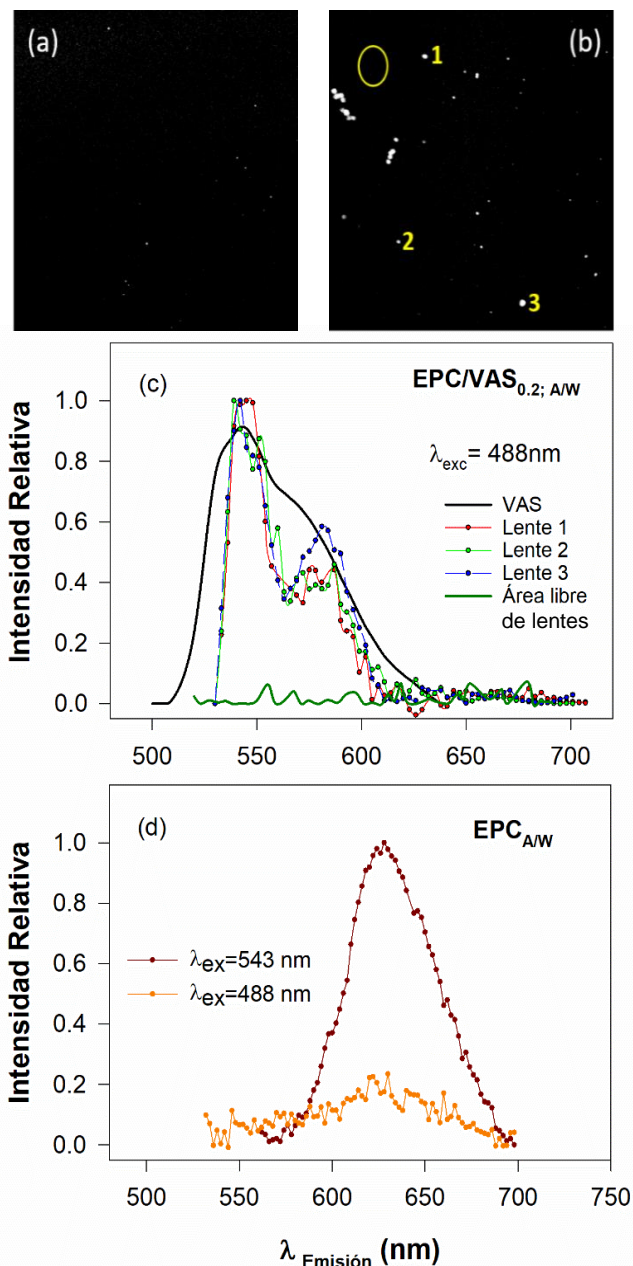
moléculas son expulsadas de la monocapa y se segregan sobre ella formando lentes que no coalescen tras la compresión.

Para evaluar si los puntos brillantes identificados a través de BAM correspondían a lentes líquidas de VAS, se utilizó microscopía confocal espectral mediante el análisis de monocapas de mezclas EPC/VAS con la sonda fluorescente Rojo de Nilo (NR), un sonda que es ampliamente utilizada debido a que puede particionar en fases hidrofóbicas y presenta un fuerte solvatocromismo<sup>159-160</sup>. Estas propiedades permiten evidenciar la coexistencia de dos fases con polaridades diferentes (un núcleo apolar de VAS y una monocapa mixta EPC/VAS menos apolar). Las micrografías (Figura 29a, b) mostraron claramente que la sonda NR estaba particionando en las lentes. Es importante destacar que si se comparan las imágenes de monocapas EPC/VAS con  $X_{VAS} = 0,02$  (Figura 29a) y  $X_{VAS} = 0,2$  (Figura 29b) se evidencia un mayor tamaño y una mayor densidad de superficie de las lentes observadas en  $X_{VAS} = 0,2$  con respecto a  $X_{VAS} = 0,02$  (coincidente con los patrones encontrados mediante BAM).

El análisis espectral del NR presente en estas estructuras (Figura 29c), después de la excitación a  $\lambda_{ex} = 488$  nm, presentó una banda de emisión de fluorescencia entre 500-670 nm con un máximo ( $\lambda_{max}$ ), ubicado a  $\sim 540$  nm, que es casi superponible con el  $\lambda_{max}$  observado para una solución de NR en VAS. Por el contrario, el análisis espectral de la imagen en regiones de monocapas EPC/VAS donde había ausencia de lentes (Figura 29c, línea verde oscura) mostró una intensidad de emisión insignificante dentro del rango de 500-670 nm tras la excitación a  $\lambda_{ex} = 488$  nm. Sin embargo, cuando monocapas de EPC pura (Figura 29d), se excitaron a  $\lambda_{ex} = 543$  nm o a 488 nm, se observó una banda en el espectro de emisión comprendida entre 565–700 nm con un  $\lambda_{max} = 628$  nm. Estos espectros desplazados hacia el rojo obtenidos en monocapas de EPC indicaron que las moléculas de NR que se encontraban fuera de las lentes, pero particionando entre las cadenas hidrocarbonadas de EPC podían detectar el efecto de un entorno más hidrofílico comparado al núcleo hidrofóbico de las lentes<sup>159</sup>.

Es importante tener en cuenta que los espectros de NR obtenidos de las lentes presentes en monocapas EPC/VAS que contienen  $X_{VAS} = 0,02$  o 0,2 fueron cualitativamente similares (compárense las Figura 29c y A.2), pero al obtenerse lentes más grandes con  $X_{VAS}=0.2$  la intensidad de la señal mejoró considerablemente y, por lo tanto, también mejoró la resolución del espectro. En conjunto, estos resultados sugirieron que la sonda NR se

encuentra distribuida en toda la monocapa; inserta entre las moléculas de fosfolípidos y también en el interior de las lentes. Como los espectros de emisión obtenidos se asemejan a los de VAS pura, pudo concluirse que las lentes detectadas mediante BAM se encuentran constituidas entonces por VAS segregada.



**Figura 29. Microscopía de Epifluorescencia Confocal Espectral de EPC/VAS en la interfase A/W.**

La  $\pi$  del sistema en todos los experimentos fue  $\sim 15\text{--}20$  mN/m y se utilizó como sonda fluorescente Rojo de Nilo (NR). En las imágenes se observan mezclas EPC/VAS con una fracción molar de 0,02 (a) y 0,2 (b) de VAS. En (c) se muestran los espectros de emisión obtenidos tras la excitación a 488 nm. Los espectros se construyeron a partir del análisis del área marcada (*lente o área libre de lentes*, indicada en (b) por los números o el círculo, respectivamente) en imágenes capturadas sucesivamente a diferentes  $\lambda_{em}$  dentro del rango de 500–700 nm. VAS (—) se corresponde a la disolución sólo de NR en VAS pura como solvente. En (d) se aprecia el espectro de emisión de una monocapa de EPC con NR, excitada a 488 o 543 nm, con un pico de emisión a  $\lambda_{max}=628$  nm.

Después de confirmar que estas estructuras altamente reflectantes estaban constituidas por VAS, se realizó un análisis basado en la dispersión de las moléculas de VAS sobre las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos. El coeficiente de dispersión (del inglés “*Spreading coefficient*”,  $S$ ) de un líquido sobre una superficie puede considerarse como la diferencia entre el trabajo de adhesión ( $W_a$ ) del líquido a la superficie y el trabajo de cohesión ( $W_c$ ) entre las moléculas de la sustancia líquida<sup>161-162</sup>. Dado que  $W_a = \gamma_{AW} + \gamma_{AO}$

-  $\gamma_{OW}$  y  $W_c = 2\gamma_{AO}$  entonces  $S = \gamma_{AW} - (\gamma_{AO} + \gamma_{OW})$ , donde  $\gamma_{AW}$ ,  $\gamma_{AO}$  y  $\gamma_{OW}$  representan las tensiones superficiales de las interfases agua/aire, aire/VAS y VAS/agua, respectivamente. La condición para que haya esparcimiento es que  $S > 0$ .

En el caso de las moléculas de VAS sobre una monocapa de EPC/VAS<sub>0.02,A/W</sub>, se deduce que  $S = \gamma_{film} - (\gamma_{AO} + \gamma_{OW})$ . A partir de la Ec. (4), a  $\pi \sim 15$  mN/m,  $\gamma_{film} = 57$  mN/m,  $\gamma_{AO} = 33$  mN/m y  $\gamma_{OW} = 37$  mN/m resulta  $S = -13$  mN/m. Este valor de  $S$  predice que las lentes de VAS permanecerán sobre la monocapa EPC/VAS<sub>0.02, A/W</sub> y no se extenderán sobre ella. Este fenómeno se confirmó en las imágenes de BAM que se muestran en la Figura 28b. En otras palabras, la formación de lentes de VAS implica un costo energético relacionado con la formación de tres fases en coexistencia. Sin embargo, si en lugar de aire, sobre la monocapa se encuentra una fase líquida de VAS (sistema líquido/líquido), las moléculas de VAS expulsadas de la monocapa se integrarían directamente en la fase superior, con un costo energético muy bajo o nulo. Esto explicaría el hecho de que se requiera menor energía libre de compresión para la monocapa EPC<sub>O/W</sub> en comparación con la monocapa EPC/VAS<sub>0.02, A/W</sub> (Tabla 2), lo cual implicaría que esta diferencia estaría relacionada con el estado final en el que se encuentre el exceso de VAS expulsado del filme en uno u otro sistema, formando lentes en la interfase A/W o bien integrándose a la fase superior en la O/W.

### IV.3. Conclusiones

En el presente capítulo, primero se analizaron tres procedimientos diferentes de acuerdo con lo descrito en literatura para la preparación de monocapas de surfactantes en la interfase O/W. En dos de ellos, el sistema bifásico debe ser preparado previamente y la incorporación de la solución lipídica se realiza en la interfase A/O o en la interfase O/W, obteniendo así monocapas adsorbidas AM<sub>A/O</sub> o AM<sub>O/W</sub>, respectivamente.

Los resultados obtenidos para la evolución de la constante de tiempo ( $k$ ) después de la adición sucesiva de alícuotas de solución lipídica resultó una herramienta muy útil no sólo para tomar una decisión racional sobre el mejor procedimiento a utilizar, sino que también proporcionó información valiosa sobre la dinámica temporal de la distribución de las moléculas tensioactivas. Así, se observó que la adsorción de surfactante directamente en la interfase O/W se caracterizó por un aumento inicial regular de  $k$  seguido de una disminución y una estabilización a valores bajos que tendían asintóticamente a cero. Esto se puede



imaginar como una interfase limpia que inicialmente se llena rápidamente y después de alcanzar una densidad molecular crítica aún acepta nuevas moléculas, pero requiere una mayor energía de activación hasta alcanzar la "presión de equilibrio". Por el contrario, el procedimiento que consiste en la deposición del tensioactivo en la interfase A/O exhibió valores de  $k$  que fluctúan de manera caótica. Por lo tanto,  $\pi$  nunca se estabiliza y conduce a isothermas de  $\pi$ -MMA no reproducibles. Empíricamente, este resultado fue suficiente para descartar este procedimiento para la preparación de filmes de Langmuir en la interfase O/W. Sin embargo, el mecanismo molecular involucrado en esta interesante e irregular fluctuación en su cinética de adsorción permanece como una pregunta abierta. Se propuso la hipótesis de que este complejo comportamiento surge de las dos dimensiones (2D y 3D) involucradas en el proceso de difusión asociado a este tipo de método de siembra. Esto conduciría a una especie de mecanismo de difusión interfasial en modo "saltatorio" con distintos estados de transición de las moléculas de fosfolípidos que se desprenden temporalmente de la superficie.

Por otra parte, el tercer procedimiento aplicado para la preparación de monocapas (SM) a través de la deposición en la interfase A/W y la posterior adición de la fase superior, realizado cuidadosamente, no introdujo perturbaciones irreversibles y condujo a la formación de filmes estables y reproducibles. Este hecho y la simplicidad en su preparación lo convirtieron en el método de elección para los experimentos subsiguientes. Contrariamente a la interfase A/W, en la interfase O/W, monocapas altamente empaquetadas y reproducibles sólo se pueden lograr comprimiendo una monocapa de baja densidad molecular y no mediante la adición sucesiva de moléculas de surfactante para incrementar su empaquetamiento.

Considerando los resultados obtenidos, se realizó entonces la formación de monocapas de EPC en la interfase O/W mediante el método SM con el objetivo de realizar isothermas de compresión  $\pi$ -MMA. Se obtuvieron exitosamente monocapas de Langmuir, con comportamientos reproducibles que permitieron su adecuada caracterización y posterior comparación en distintas interfaces. La diferencia energética requerida para comprimir las monocapas  $EPC_{O/W}$  y  $EPC_{A/W}$  a lo largo de la interfase correspondiente puede reflejar la diferencia en la viscosidad de la fase superior presente en cada caso y/o el requerimiento de un trabajo adicional para expulsar las moléculas VAS intercaladas entre las cadenas hidrocarbonadas de EPC, en el caso de monocapas  $EPC_{O/W}$ , que se encuentra ausente en el

caso de  $EPC_{A/W}$ . Entonces, para indagar sobre este problema, se estudió la mezcla  $EPC/VAS_{0.02}$  en la interfase  $A/W$ . Curiosamente, según los cálculos realizados a partir de las isothermas  $\pi$ -MMA, la monocapa  $EPC/VAS_{0.02}$  exhibió el valor más alto de energía de compresión y el módulo de compresibilidad  $K$  más bajo de todos los filmes estudiados. Esto puede pensarse como el resultado de dos fuerzas opuestas. Por un lado, la disminución de la solubilidad de  $VAS$  en la monocapa de  $EPC$  tras la compresión puede ser la fuerza impulsora que favorece la expulsión de las moléculas de  $VAS$  de la fase monocapa, lo cual se ve reflejado en la alta compresibilidad de la monocapa mezcla  $EPC/VAS_{0.02}$ . Al mismo tiempo, cuanto mayor sea la similitud fisicoquímica entre las moléculas expulsadas y los medios donde están inmersas, menor será la fuerza y menor el trabajo requerido para la compresión. Alternativamente, la diferencia puede explicarse por la energía que se requiere invertir para formar sitios de nucleación en la monocapa mezcla  $EPC/VAS_{0.02}$ .

El análisis realizado mediante BAM permitió comprobar que, durante la compresión, las moléculas de  $VAS$  se segregaban sobre la monocapa, formando lentes no coalescentes fuertemente reflectantes que permanecían incluso después de la descompresión y cuyo cambio de altura (aumento/disminución) acompañaba el ciclo de compresión/descompresión. Tomados en conjunto, estos resultados indicaron que, en  $EPC_{O/W}$ , las moléculas de  $VAS$  de la fase superior se insertan entre las cadenas hidrocarbonadas del fosfolípido. Algunas moléculas de  $VAS$  permanecieron en la interfase hasta el colapso, pero otras se excluyeron hacia la fase líquida de  $VAS$  con un requerimiento de energía menor que hacia el aire. Por lo tanto, las moléculas de  $VAS$  expulsadas de  $EPC/VAS_{0.02; A/W}$  no se extienden sobre la monocapa, tal como predice el coeficiente de dispersión  $S = -13 \text{ mN/m}$  y se demuestra mediante BAM.

Para concluir, en el presente capítulo se definió racionalmente el mejor procedimiento para preparar monocapas de fosfolípidos en la interfase  $O/W$ , se explicaron algunos aspectos moleculares responsables de los fenómenos observados en los métodos experimentales y se proporcionaron conocimientos que serán útiles a futuro para construir modelos experimentales que permitan diseñar y estudiar emulsiones, partículas y/o gotas de lípidos. Las primeras son de interés para el suministro de fármacos mientras que las últimas son factores que estabilizan diferentes estructuras relacionadas con partículas de importancia bioquímica, biológica y fisiológica, como lipoproteínas, leucoplastos, entre otros, tanto en células de origen animal como vegetal.

*“Si nos aventuramos en el conocimiento y en la ciencia, lo hacemos tan sólo para regresar mejor equipados para la vida”.  
Johann Wolfgang von Goethe*

# **Capítulo V**

## ***Mezclas pseudobinarias de lípido/vaselina en la interfase agua/aire***

### **V.1. Introducción**

Las monocapas en la interfase A/W han resultado modelos de gran utilidad para obtener información referida a la estructura, organización supramolecular, comportamiento termodinámico y reológico de moléculas anfifílicas como los fosfolípidos. Esto los convierte en excelentes candidatos para ser estudiados también mediante la metodología de filmes de Langmuir en la interfase líquido/líquido y así, evaluar comparativamente cómo es su comportamiento entre dos fases líquidas respecto al observado en la interfase A/W.

En el Capítulo IV se realizó un análisis detallado de la técnica de filmes de Langmuir en la interfase O/W, principalmente para conocer el sistema y así establecer protocolos para la preparación de monocapas. Con este fin se investigó el comportamiento de monocapas de EPC en la interfase agua/vaselina, así como de monocapas mixtas EPC/VAS en la interfase agua/aire. Sin embargo, es necesario recordar que la EPC no es una sustancia pura sino una mezcla de fosfatidilcolinas que contienen una diversidad de ácidos grasos esterificados al glicerol y, por su parte, la fase orgánica VAS está constituida por una diversidad de alcanos. Considerando la complejidad inherente al sistema líquido/líquido y la variabilidad que ofrecen el fosfolípido y la fase superior, era necesario utilizar una sustancia pura que permitiera realizar una comparación fehaciente de las monocapas en el sistema agua/aceite con respecto al sistema agua/aire.

Como consecuencia, en el presente capítulo se continuó utilizando esta metodología, pero se abordó el estudio de la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) como fosfolípido modelo. Esta elección resulta de interés porque este lípido presenta una transición de fase de un estado

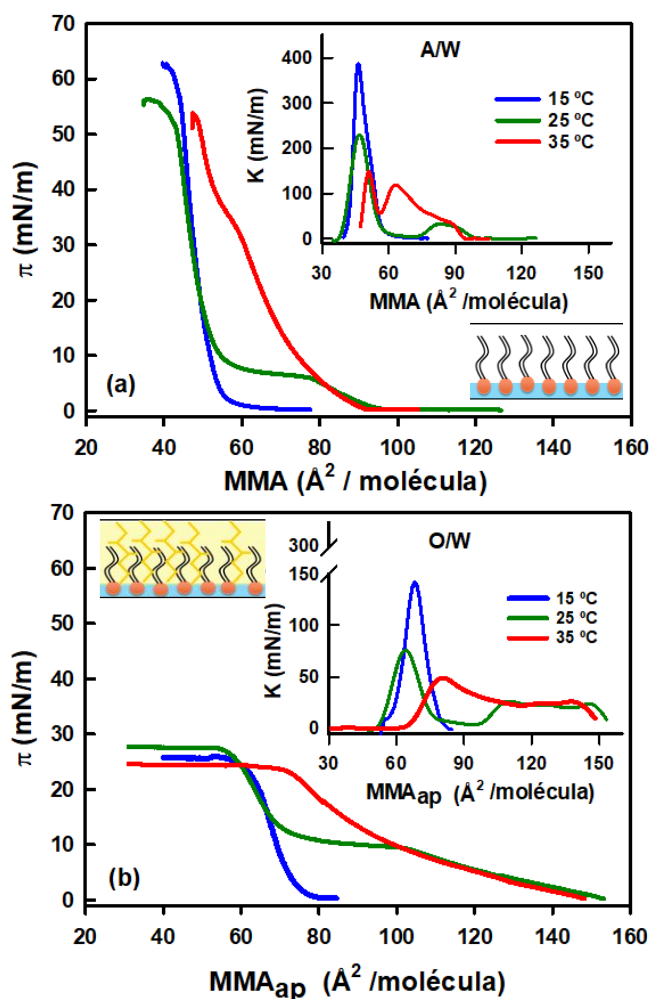
LE a LC que depende de la temperatura, por lo que a partir de isothermas de compresión  $\pi$ -MMA obtenidas a distintas temperaturas se pueden obtener diversos parámetros moleculares, reológicos y termodinámicos de interés.

Además, como se discutió en el capítulo anterior, una monocapa de fosfolípido en la interfase O/W puede considerarse como una mezcla pseudobinaria de fosfolípido y VAS. En este sentido, la DPPC es una sustancia pura que permitirá la adecuada preparación de mezclas de lípido/vaselina con diferentes relaciones molares. Mediante este tipo de estudio y gracias al uso de mezclas con composiciones determinadas se podrá definir cuáles son las condiciones en las que mezclas de aceite mineral-lípido en la interfase A/W permiten observar y analizar termodinámicamente la emergencia de la interfase líquido/líquido y su evolución espacial.

## V.2. Resultados y Discusión

### V.2.1. Monocapas de DPPC en la interfase O/W

A diferencia del estudio en monocapas de EPC, la DPPC presenta una transición de fase del estado LE al LC. La misma depende de la temperatura ( $T$ ), por lo que ocurrirá a distintos valores de  $\pi$  y de MMA según el estado que se encuentre más favorecido a una determinada  $T$ . En la Figura 30, se muestran isotermas de compresión de monocapas de DPPC en la interfase A/W (a) y en la interfase O/W (b) realizadas a distintas temperaturas. La isoterma de DPPC, en la interfase A/W a 25° C (Figura 30a) muestra un *plateau* a  $\pi \approx 5$  mN/m que corresponde a su transición bidimensional de fase líquido expandido (LE) a líquido condensado (LC). A 35°C la transición de fase aparece a una presión significativamente mayor ( $\sim 35$  mN/m) respecto a lo observado a temperatura ambiente, mientras que a 15° C la monocapa sólo presenta una fase de tipo LC.



**Figura 30. Efecto de la temperatura en monocapas de DPPC en la interfase A/W y O/W.**

Las isotermas de  $\pi$  vs. MMA en la interfase A/W (a) o en la interfase VAS/W (b) se registraron a 15, 25 y 35 °C. Como recuadro se observa en cada caso el módulo de compresibilidad en función del área molecular promedio ( $K$  vs. MMA). También se muestran como esquemas la orientación de las moléculas de fosfolípidos en cada interfase. En (b), los alcanos de la fase superior representados en amarillo se insertan entre las cadenas hidrocarbonadas del fosfolípido.

Por otro lado, en el caso de la DPPC en la interfase O/W (Figura 30b), a 25°C la transición de fase LE a LC ocurre a una  $\pi$  levemente mayor que la observada para el fosfolípido en la interfase A/W a la misma temperatura<sup>163-166</sup>. Además, a 15°C y 35°C las isothermas corresponden a fases únicas (sin transiciones) tipo LC y LE, respectivamente. Tal como se observó para el caso de monocapas de EPC, las áreas moleculares promedio medidas para DPPC en la interfase O/W fueron mayores que las obtenidas en la interfase A/W a las mismas T y  $\pi$ .

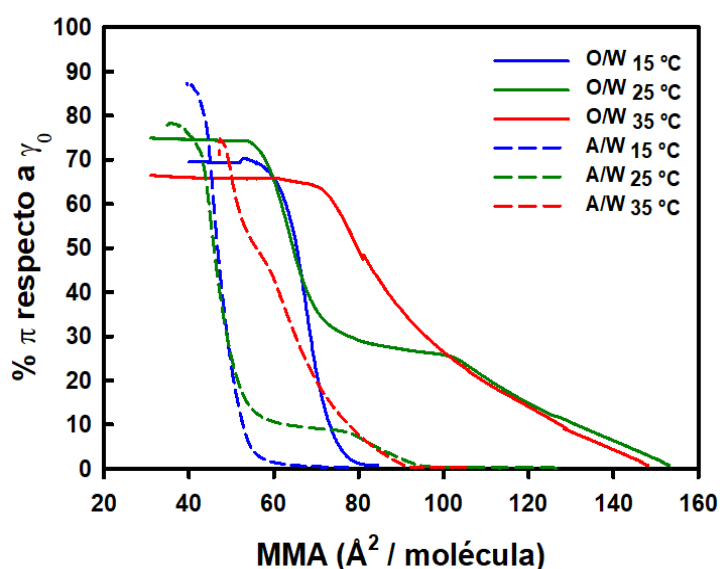
El módulo de compresibilidad (K) es un parámetro capaz de reflejar cualitativamente el estado físico y también es útil para identificar la presencia de una transición de fase bidimensional de una monocapa. Típicamente los fosfolípidos muestran valores de K entre 100 - 250 mN/m para las fases LC y entre 12,5 - 50 mN/m para las fases LE<sup>167</sup>. Sin embargo, estos datos no reflejan completamente el comportamiento de las monocapas de DPPC estudiadas en la interfase O/W, ya que en los experimentos realizados se encontró que las fases LC de DPPC (a 15 y 25 ° C) en la interfase VAS/W muestran valores de K cercanos a 80 mN/m a una  $\pi = 20$  mN/m, mientras que, las fases LC en la interfase A/W presentan valores mayores a 190 mN/m que se condicen con la literatura. Comparativamente, los valores calculados para el módulo de compresibilidad fueron menores para los filmes en la interfase O/W con respecto a los calculados para la interfase A/W, incluso para la fase LC de DPPC. Además, como se esperaba en ambos sistemas, estos valores aumentaron a medida que la T disminuyó de 35 ° C a 15 ° C debido a que bajas temperaturas estabilizan el estado LC al favorecer mayores interacciones intermoleculares (ver isothermas K-MMA en los insertos de las Figura 30a y b).

Por otra parte, el aumento en la presión de superficie conduce a que la MMA se vuelva lo suficientemente pequeña como para provocar que las fuerzas de repulsión entre las moléculas predominen sobre las fuerzas atractivas, desestabilizando así la monocapa formada y causando por lo tanto su colapso<sup>†</sup> a una presión lateral denominada presión de colapso ( $\pi_c$ ). Las monocapas en la interfase O/W exhibieron isothermas de compresión  $\pi$ -MMA con menor presión de colapso que las preparadas en la interfase A/W. Sin embargo,

---

<sup>†</sup> Existen distintos tipos de colapso que implican la inestabilización global de la monocapa, lo que se aprecia en la isoterma como una caída brusca de la  $\pi$ . También puede ocurrir la segregación de moléculas desde la monocapa hacia otra fase (por ej. una fase líquida) que permanece sobre la monocapa en equilibrio con ésta y que en la isoterma se distingue como un valor máximo de  $\pi$  que permanece constante aun cuando la compresión progrese.

como se explicó en el Capítulo IV, el límite superior de  $\pi$  que puede alcanzar un filme monomolecular es la tensión superficial de la interfase limpia ( $\gamma_0$  en Ec. (4)). Debido a esto, se normalizaron los valores de  $\pi$  de acuerdo con el valor de  $\gamma_0$  de cada interfase limpia como se observa en la Figura 31. Esto permitió demostrar que las diferencias observadas en los valores de  $\pi_c$  a las distintas temperaturas trabajadas no se encuentran asociadas a una estabilidad del filme en la interfase O/W significativamente menor respecto a la interfase A/W. En ambas interfaces los porcentajes de  $\pi_c$  respecto a  $\gamma_0$  no presentaron diferencias significativas; por ejemplo, en el caso de una monocapa de DPPC a 25 °C, las presiones de colapso fueron  $\pi_{c, A/W} = 58$  mN/m y  $\pi_{c, VAS/W} = 27$  mN/m que representan un  $\sim 80\%$  y  $\sim 73\%$  de sus respectivos valores de  $\gamma_0$ .



**Figura 31. Isothermas  $\pi$ . vs MMA de monocapas de DPPC normalizadas.**

Isothermas de compresión de  $\pi$  vs. MMA de DPPC pura obtenidas a distintas temperaturas en las interfaces A/W (líneas discontinuas) y O/W (líneas sólidas), normalizadas por la tensión superficial de la interfase limpia correspondiente ( $\gamma_0$ ). Para las interfaces A/W y VAS/W, los valores de  $\gamma_0$  son  $\gamma_{0, A/W} = 72$  y  $\gamma_{0, VAS/W} = 37$  mN/m, respectivamente.

Los datos moleculares y reológicos mencionados se resumen en la Tabla 3, donde además se exhibe la cantidad de energía libre requerida para comprimir una monocapa desde 2 mN/m hasta 20 mN/m en cada interfase. La energía libre de compresión ( $\Delta G_{\text{comp}}$ ) de una monocapa es una cantidad compleja que refleja no sólo el equilibrio energético entre las interacciones intermoleculares y la pérdida de entropía en la compresión, sino también la energía relacionada con las transiciones de fase<sup>168</sup>. Los filmes de DPPC estudiados a distintas temperaturas requirieron distintas cantidades de energía para ser comprimidos hasta una  $\pi = 20$  mN/m. Pero, como tendencia general, los valores de  $\Delta G_{\text{comp}}$  en la interfase O/W siempre fueron mayores que aquellos obtenidos para la interfase A/W. Este resultado refleja que el  $\Delta G_{\text{comp}}$  incluye un componente que representa la energía necesaria para expulsar las moléculas de hidrocarburos de la fase superior intercaladas entre las cadenas

hidrocarbonadas de las moléculas de DPPC. Esto por un lado dificulta el empaquetamiento de las moléculas de fosfolípido y por otro, produce una compresibilidad aparente del filme en la interfase O/W cuyo valor es menor que la compresibilidad del mismo fosfolípido en la interfase A/W. Además, el  $\Delta G_{\text{comp}}$  también expresa un mayor requerimiento de energía para el desplazamiento de las moléculas presentes en la interfase O/W debido a la mayor viscosidad de la fase superior respecto a la interfase A/W.

**Tabla 3. Parámetros moleculares, reológicos y termodinámicos de monocapas de DPPC.**

T (°C)	MMA <sup>a</sup> (Å <sup>2</sup> /molécula)		K <sup>b</sup> (mN/m)		Presión de colapso (mN/m)		Área molecular mínima (Å <sup>2</sup> /molécula)		$\Delta G_{\text{comp 2-20}}$ (kJ/mol) <sup>c</sup>	
	A/W	O/W	A/W	O/W	A/W	O/W	A/W	O/W	A/W	O/W
15	50 ± 2	65 ± 4	288 ± 25	87 ± 5	60 ± 2	24 ± 1	42 ± 1	60 ± 4	0,3 ± 0,1	0,8 ± 0,1
25	49 ± 1	67 ± 4	195 ± 3	83 ± 4	58 ± 2	27 ± 1	40 ± 3	59 ± 3	1,9 ± 0,2	3,5 ± 0,4
35	66 ± 2	78 ± 3	110 ± 2	47 ± 2	52 ± 1	23 ± 1	49 ± 1	72 ± 3	1,1 ± 0,1	3,1 ± 0,1

Los datos se tomaron de isotermas de compresión de monocapas de DPPC preparadas en la interfase A/W o en la interfase O/W. Los valores son la media ± S.E.M. de al menos dos experimentos independientes. <sup>a</sup> Valores obtenidos a 20 mN/m. <sup>b</sup> Calculado a partir de la Ec. 5 a 20 mN/m. <sup>c</sup> Calculado a partir de la Ec. 6 integrando isotermas de compresión entre 2 y 20 mN/m. Las fases O, W y A corresponden a vaselina, agua y aire, respectivamente.

Además de las consideraciones anteriores, también debe tomarse en cuenta que, el rango de  $\pi$  dentro del cual se realiza el cálculo de cambio de energía libre de compresión ( $\Delta G_{\text{comp 2-20}}$ ), para las isotermas de DPPC a 25°C, tanto en la interfase A/W (DPPC<sub>A/W</sub>) como en la interfase O/W (DPPC<sub>O/W</sub>), incluyen una transición bidimensional de fase. Esto involucra un gasto energético extra que no puede apreciarse de manera cuantitativa cuando se evalúan los valores de  $\Delta G_{\text{comp}}$  de manera global. La energía requerida para una transición de fase LE-LC está relacionada principalmente con el orden de las cadenas de acilo, cuya frecuencia de la isomerización *trans-gauche* disminuye y cuyas interacciones intermoleculares tipo de London - Van der Waals aumentan en cantidad e intensidad. Para destacar y luego comparar la energética de transición ( $\Delta G_{\text{Trans}}$ ) de fase de DPPC en las dos interfaces bajo estudio, se realizó el cálculo de  $\Delta G$  de compresión integrando las isotermas de compresión  $\pi$ -MMA a 25°C de DPPC<sub>A/W</sub> y DPPC<sub>O/W</sub> en la región correspondiente a la transición de fase donde  $\pi$  es constante ( $\pi_{\text{Trans}}$ ). Los rangos de integración, resultados del cálculo y otros parámetros que permiten caracterizar adecuadamente esta transición en ambos sistemas se muestran en la Tabla 4.



**Tabla 4. Parámetros que describen la transición de fase a 25 °C de DPPC en las interfases A/W y O/W.**

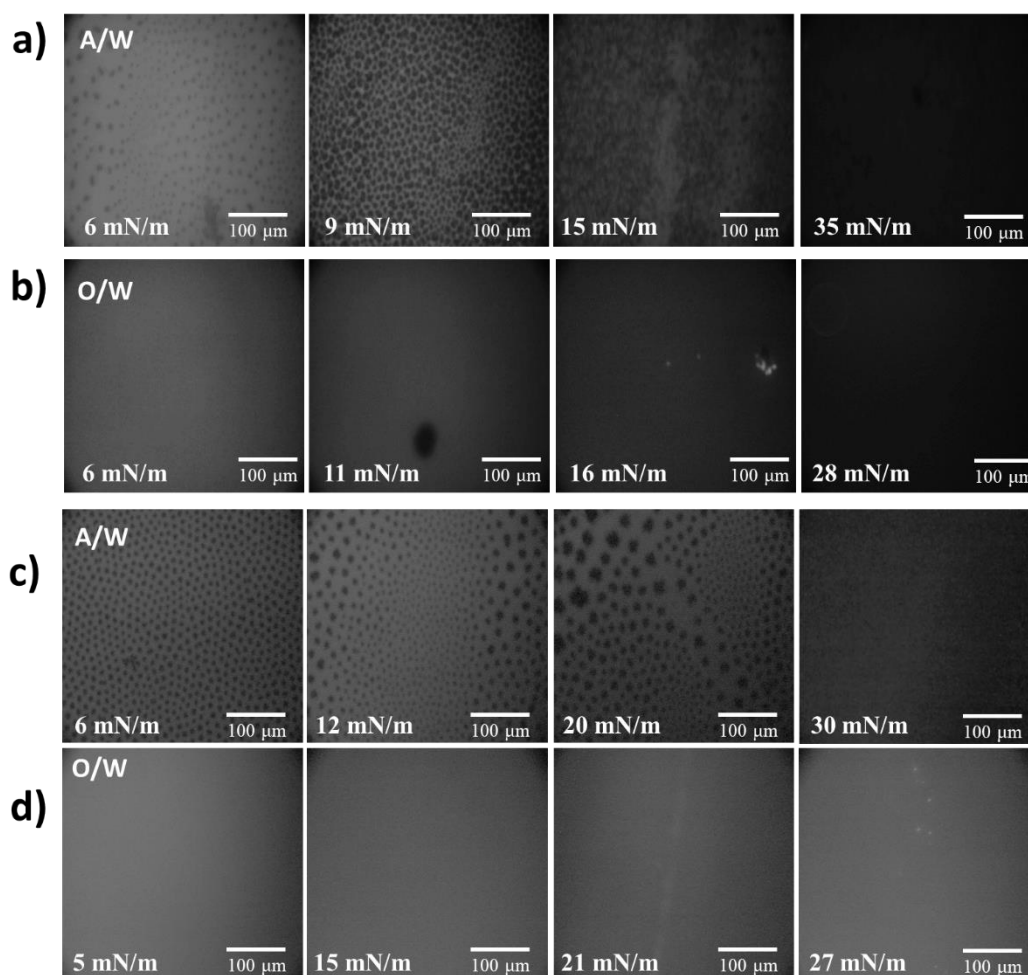
Propiedades de la transición		A/W	O/W
$\pi_{\text{Trans}}$ (mN/m)		$6 \pm 1$	$9,5 \pm 0,5$
$\Delta G_{\text{Trans}}$ (kJ/mol) <sup>a</sup>		$0,9 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,3$
MMA ( $\text{\AA}^2/\text{molécula}$ ) <sup>b</sup>	inicial	$76 \pm 1$	$105 \pm 4$
	final	$55 \pm 3$	$83 \pm 2$
Propiedades reológicas antes y después de la transición			
Variable	$\pi$ (mN/m)	A/W	O/W
K (mN/m) <sup>c</sup>	4	$38 \pm 2$	$25 \pm 3$
	20	$195 \pm 3$	$83 \pm 4$
Estado de Fase <sup>c</sup>	4	LE	LE
	20	LC	LC

<sup>a</sup> Calculado mediante la Ec. 6. <sup>b</sup> Límites de integración para calcular  $\Delta G_{\text{Trans}}$ . <sup>c</sup> Determinado por debajo de (4 mN/m) y por encima de (20 mN/m) la  $\pi$  de transición.

A una temperatura de 25 °C, las isothermas de compresión  $\pi$ -MMA (Figura 30 y Tabla 4) muestran que la  $\pi_{\text{Trans}}$  en el sistema O/W es mayor que en A/W, esto indica que, en la primera, la fase superior hidrocarbonada se encuentra estabilizando el estado de fase LE de la monocapa, lo que pone de manifiesto una partición preferencial de los alcanos en la fase LE comparado con la LC. Esta conclusión es reforzada por el  $\Delta G_{\text{Trans}}$  ~2,4 veces mayor en la interfase O/W respecto a la interfase A/W (Tabla 4) que en el caso de la interfase O/W incluye dos componentes energéticos asociados: 1) la expulsión de moléculas de hidrocarburo y 2) la fricción de las cadenas hidrocarbonadas de la DPPC con la fase superior, que en el sistema O/W tiene mayor viscosidad que en A/W. Además de 3) el componente necesario (fuerzas de interacción de van der Waals) para empaquetar el filme e inducir la transición de fase al aumentar su densidad molecular, ya que las moléculas de alcano en el sistema O/W actúan como espaciadores entre las moléculas de los fosfolípidos impidiendo que las interacciones intermoleculares de corto alcance ocurran adecuadamente. Si asumimos que los componentes no directamente asociados a la transición de fase (1+2) pueden surgir de la diferencia entre los valores de  $\Delta G_{\text{Trans}}$  calculados para las interfases O/W y A/W ( $\Delta \Delta G_{\text{Trans}} = 1,4$  kJ/mol) es interesante destacar que la región “horizontal” de la isoterma  $\pi$ -MMA, correspondiente a la  $\pi_{\text{Trans}}$ , cubre un rango de MMA de ~21  $\text{\AA}^2/\text{molécula}$ , para ambas interfases. Dentro de ese rango de áreas moleculares persiste la coexistencia de una fase LE con una fase LC, más condensada y ordenada, hasta que finalmente la

transferencia de moléculas de DPPC desde la fase LE a la LC se completa y con ello finaliza el cambio de fase.

Para evaluar la topología del filme durante su compresión, se realizaron experimentos de EFM, en una primera instancia, agregando a la DPPC una pequeña cantidad de la sonda fluorescente Rhod-PE la cual posee el grupo fluorescente unido a una de las cadenas hidrocarbonadas de la PE (Figura 10e). Las imágenes se obtuvieron a distintas presiones laterales durante la compresión de monocapas de DPPC en la interfase A/W (Figura 32a) y O/W (Figura 32b). En la interfase A/W, se observa claramente la coexistencia de las fases LE y LC, donde puede apreciarse la nucleación y crecimiento de los dominios condensados de DPPC durante el proceso de transición de fase. Esta sonda particiona preferentemente en la fase LE (zona más brillante), siendo excluida de los dominios condensados (zonas más oscuras).



**Figura 32. Micrografías obtenidas por EFM para monocapas de DPPC.**

La topología de las monocapas de DPPC se observó mediante la técnica de microscopía de Epifluorescencia (EFM) utilizando 0,3% de la sonda Rhod-PE (a y b) o 0,5% de la sonda NBD-PC (c y d). Los experimentos se realizaron en la interfase A/W (a y c) o en la interfase VAS/W (b y d).

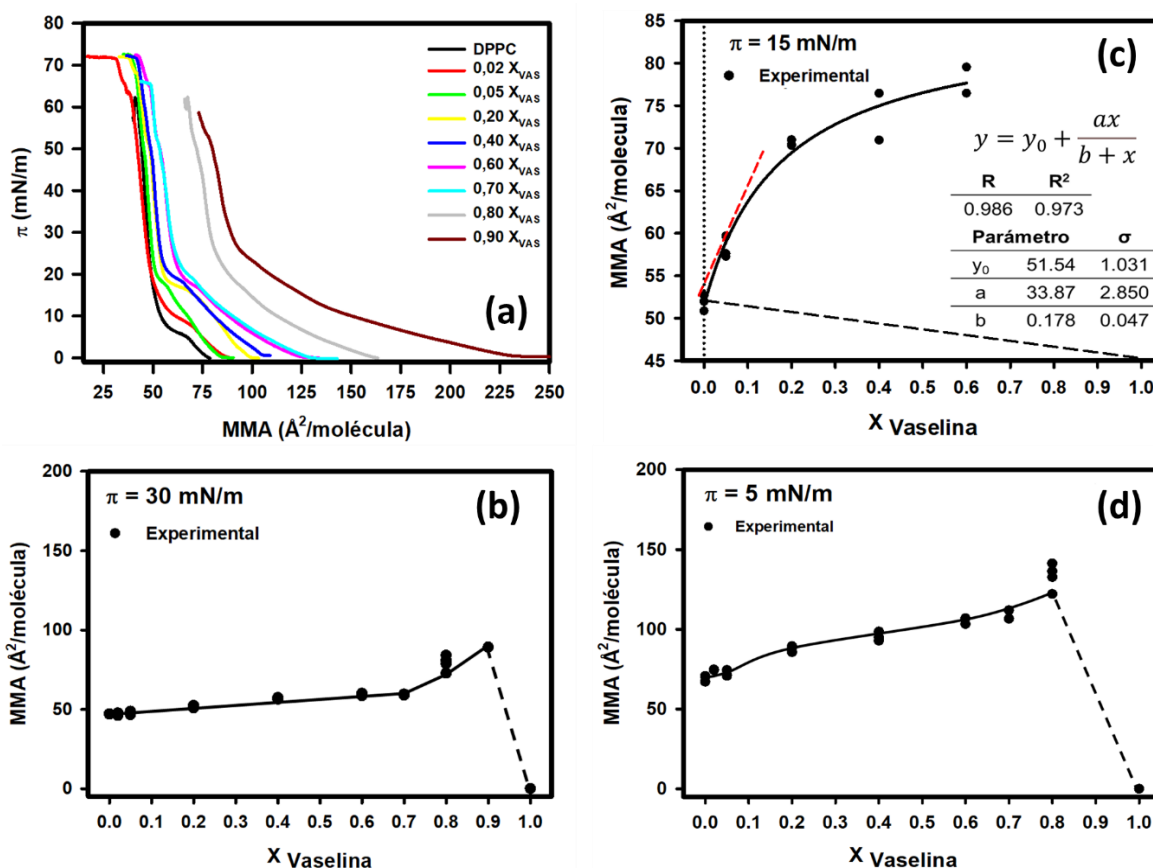
Este comportamiento interfasial es el esperado para este fosfolípido que ya ha sido ampliamente estudiado<sup>169</sup>. Sin embargo, en la interfase O/W no fue posible distinguir visiblemente una coexistencia de fases. Al evaluar el sistema utilizando otra sonda fluorescente, NBD-PC (Figura 10c) cuyo grupo fluoróforo se encuentra en su cadena hidrocarbonada se obtuvieron resultados similares (ver Figura 32c y d para A/W y O/W respectivamente). Lo mismo ocurrió cuando se utilizó en la interfase O/W otra sonda fluorescente, DiIC<sub>18</sub> (resultados no mostrados).

Estas observaciones podrían indicar que cuando los filmes de DPPC se encuentran en la interfase VAS/W, el estado LC adquirido en este sistema según muestran las isotermas de compresión  $\pi$ -MMA presenta una “estructura laxa” que permitiría la partición de la sonda comparada con aquella obtenida en la interfase A/W; lo cual se condice también con los menores valores de K alcanzados. Por el contrario, también podrían indicar que la técnica EFM utilizada con el equipamiento y condiciones disponibles no resultó eficiente para determinar la topografía del filme. Aunque los experimentos se realizaron con una variedad de sondas fluorescentes (Rhod-PE, NBD-PC y DiIC<sub>18</sub>) y utilizando distintas concentraciones, no se obtuvieron resultados satisfactorios.

### ***V.2.2. Análisis de mezclas pseudobinarias DPPC/VAS en la interfase A/W***

Los resultados detallados en la Sección IV.2.2, indicaron que las moléculas de alcanos de la fase superior se insertan entre las cadenas de hidrocarburos del fosfolípido EPC y no son totalmente expulsadas incluso en los puntos de mayor compresión logrados antes del colapso de la monocapa. Lo mismo es esperable para una monocapa de DPPC preparada en una interfase O/W por lo que no podría ser considerada como un sistema de un único componente, sino que debería considerarse como una mezcla pseudobinaria del fosfolípido como componente mayoritario y una fracción de la sustancia utilizada como fase superior, en este caso VAS. Considerando esto y teniendo en cuenta la imposibilidad de realizar una adecuada caracterización por EFM debido a las dificultades técnicas encontradas, se consideró conveniente realizar un estudio de mezclas pseudobinarias de DPPC/VAS en la interfase A/W.

Para ello, se eligieron ocho mezclas VAS/DPPC constituidas por fracciones molares de VAS (de  $X_{VAS}$ ) variando desde 0,02 hasta 0,90. En todas las composiciones evaluadas, las isothermas  $\pi$ -MMA de las mezclas se desplazaron hacia áreas moleculares cada vez mayores que la obtenida para una isoterma de DPPC pura, a medida que aumentó  $X_{VAS}$  (ver Figura 33 a).



**Figura 33. Isothermas de mezclas DPPC/VAS y diagramas de MMA vs.  $X_{VAS}$ .**

(a) Isothermas de compresión experimentales de DPPC pura y de sus mezclas pseudobinarias con diferentes proporciones de VAS. (b, c y d) Valores experimentales de área molecular promedio a  $\pi = 30, 15$  y  $5 \text{ mN/m}$ , respectivamente, en función de la composición de la mezcla. En (c), se incluye la ecuación y la tabla con los valores correspondientes al ajuste de una función hiperbólica mediante una regresión no lineal; --- representa la asíntota que pasa por  $X_{VAS} = 0,05$ . La gráfica completa de MMA vs.  $X_{VAS}$  a  $\pi = 15 \text{ mN/m}$  puede observarse en la Figura A. 3.

El valor de  $\pi$  para la transición de fase bidimensional aumentó desde  $\pi \sim 8,5 \text{ mN/m}$  para una monocapa de DPPC pura hasta  $\pi \sim 15,5 \text{ mN/m}$  para monocapas mezclas con una fracción molar de VAS ( $X_{VAS}$ ) dentro del rango de 0,05 a 0,6. Además, a medida que la proporción de VAS se incrementó, la transición de fase fue menos cooperativa y prácticamente desapareció a partir de  $X_{VAS} = 0,80$ , donde la monocapa adquirió un comportamiento tipo líquido expandido. Esto se vio reflejado en los valores de K

presentados en la Tabla 5, los cuales a partir de  $X_{VAS} = 0,7$  disminuyen en función del aumento del porcentaje de VAS.

**Tabla 5. Parámetros moleculares y reológicos de monocapas mezcla de DPPC/ $VAS_{A/W}$ .**

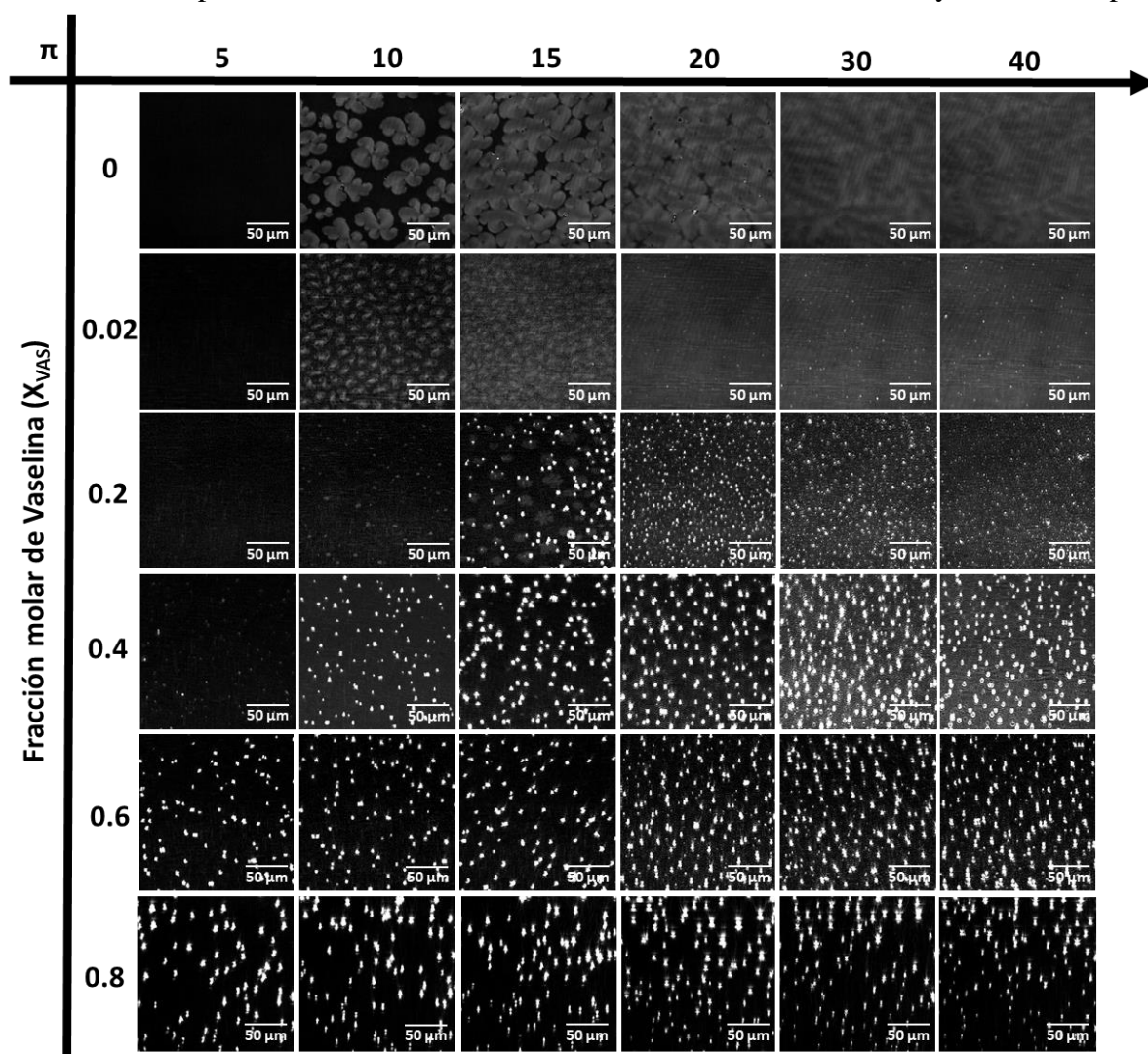
$X_{VAS}$	$\pi = 5 \text{ mN/m}$			$\pi = 30 \text{ mN/m}$		
	MMA ( $\text{\AA}^2/\text{molécula}$ )	$K^a$ (mN/m)	Estado de fase	MMA ( $\text{\AA}^2/\text{molécula}$ )	$K^a$ (mN/m)	Estado de fase
0	$69 \pm 2$	$21 \pm 1$	LE	$47,03 \pm 0,04$	$290 \pm 33$	LC
0,02	$74 \pm 1$	$38 \pm 2$	LE	$47 \pm 1$	$217 \pm 9$	LC
0,05	$72 \pm 2$	$48 \pm 5$	LE	$47 \pm 1$	$297 \pm 5$	LC
0,2	$88 \pm 2$	$59 \pm 2$	LE	$52 \pm 1$	$264 \pm 55$	LC
0,4	$95 \pm 3$	$34 \pm 2$	LE	$55 \pm 3$	$241 \pm 14$	LC
0,6	$105 \pm 3$	$30 \pm 1$	LE	$59 \pm 1$	$203 \pm 14$	LC
0,7	$109 \pm 4$	$26 \pm 2$	LE	$59,2 \pm 0,5$	$191 \pm 25$	LC
0,8	$133 \pm 8$	$29 \pm 1$	LE	$81 \pm 3$	$163 \pm 24$	LC
0,9	$188 \pm 5$	$25 \pm 4$	LE	$89 \pm 3$	$116 \pm 25$	LC

Los datos se tomaron de las isothermas de compresión de monocapas de DPPC pura o de mezclas pseudobinarias de DPPC y VAS a distintas fracciones molares. Los valores son la media  $\pm$  S.E.M. de al menos dos experimentos independientes.  $T = 25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ . <sup>a)</sup> Calculado a partir de la Ec. 5 (Sección II.2.3.2). El estado de fase se clasificó según los criterios de Davies and Rideal.<sup>167</sup>

Es importante destacar que VAS es tan inestable en la interfase A/W que no forma monocapas (Figura 26a), por lo que a  $X_{VAS} = 1$  el valor de MMA se considera igual a  $0 \text{ \AA}^2$ . Sin embargo, permanece en la interfase estabilizada como parte de una monocapa mezcla fosfolípido/VAS. En consecuencia, a partir de las isothermas experimentales (Figura 33 a), se lograron construir los diagramas de MMA en función de  $X_{VAS}$  a  $\pi = 30 \text{ mN/m}$  (Figura 33b),  $15 \text{ mN/m}$  (Figura 33c) y a  $\pi = 5 \text{ mN/m}$  (Figura 33d). Se puede observar cómo la MMA aumenta a medida que se incrementa la  $X_{VAS}$  a una presión superficial constante. A partir de los datos de los diagramas de MMA vs.  $X_{VAS}$  y utilizando la regla de las aditividades<sup>170</sup> es posible determinar matemáticamente cuál sería el área ocupada por una molécula de VAS en la mezcla ( $A_{VAS, m A/W}$ ) a una determinada presión lateral. Para ello, en la Figura 33c se ajustó una hipérbola rectangular a los puntos experimentales, siendo de interés conocer la  $MMA_{VAS}$  a  $\pi = 15 \text{ mN/m}$  debido a que a esta presión lateral existe coexistencia de fases como se demostrará más adelante. La asíntota a esa curva que pasa por  $X_{VAS} = 0,05$  extrapolada a  $X_{VAS} = 0$ , permite determinar el valor del área molecular de DPPC en la mezcla ( $A_{DPPC, m A/W} = 54 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ ). De igual manera, si se extrapola esta asíntota a  $X_{VAS} = 1$  se puede

determinar el valor de  $A_{VAS, mA/W}$  en la mezcla a la fracción molar de interés ( $A_{VAS, mA/W} = 174 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ ). Estos datos serán utilizados en análisis posteriores.

La topografía de las monocapas mezclas DPPC/ $VAS_{A/W}$ , se estudió mediante BAM con el objetivo de evaluar el efecto de la presencia de VAS sobre la transición bidimensional de fase. Para esto se seleccionaron cinco mezclas representativas (Figura 34). La forma de los dominios condensados varió con la composición de la mezcla. En ausencia de VAS, a 10 mN/m (región de coexistencia de fases) se observan los dominios más claros, correspondientes a fase LC con el típico formato de trisquelion<sup>171-172</sup>, los que a mayores presiones se aproximan y finalmente coalescen. A  $X_{VAS} = 0,02$ , también a partir de 10 mN/m, comienzan a aparecer dominios condensados de menor tamaño, en mayor cantidad por

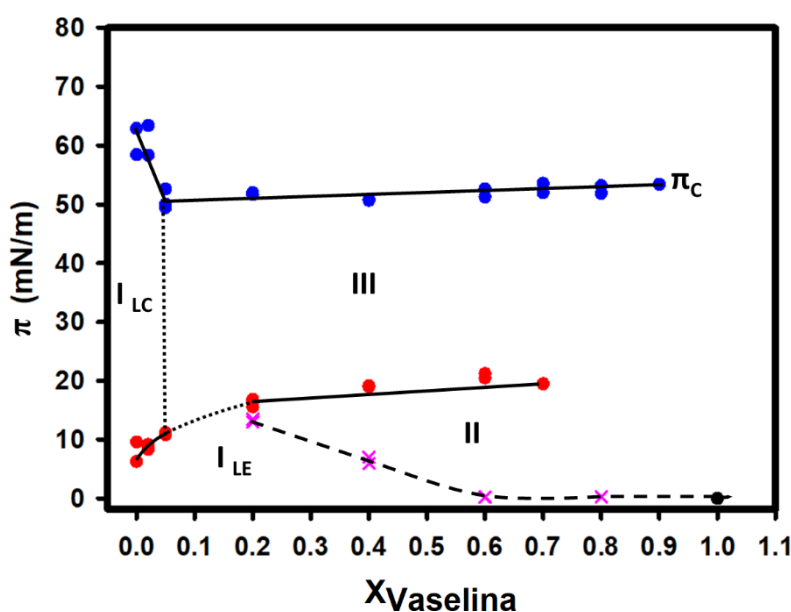


**Figura 34.** Imágenes obtenidas mediante BAM para monocapas mezclas de DPPC/VAS

Para monocapas de DPPC pura y para monocapas constituidas por distintas proporciones de VAS/DPPC, se registró mediante BAM su comportamiento interfasial a distintas  $\pi$  a lo largo de su isoterma de compresión.

unidad de superficie, pero aportando una cantidad similar de fase LC que en el caso de la monocapa de DPPC pura. En condiciones de exceso de VAS ( $X_{VAS} > 0,2$ ) se observó la aparición de estructuras de alta reflectividad (puntos brillantes), tal como se mostró anteriormente para mezclas de EPC/VAS (Figura 28 Sección IV.2.3). Es interesante notar que a  $X_{VAS} = 0,2$ , a 15 mN/m además de los puntos brillantes, reaparecen las imágenes de los dominios LC con forma de trisqueliones. Esto sugiere que, una vez excluida la VAS, la monocapa resultante tendría una composición suficientemente enriquecida de DPPC como para sostener una transición de fase, con una  $X_{VAS} < 0,02$ .

El diagrama de fases  $\pi$  vs.  $X_{VAS}$  (ver Figura 35) se construyó usando los valores de  $\pi$  de transición (transición de fase y otras transiciones) y de  $\pi$  de colapso identificadas en cada una de las isothermas  $\pi$ -MMA. Además, se incorporaron los datos de  $\pi$  a los cuales aparecen las lentes (gotas brillantes) obtenidos mediante las imágenes de BAM. Los puntos provenientes de un mismo tipo de fenómeno (transición, colapso, aparición de lentes) colocados en el plano  $\pi$ - $X_{VAS}$  se unieron con líneas que permitieron distinguir distintas regiones.



**Figura 35. Diagrama de fases de  $\pi$  vs.  $X_{VAS}$  para mezclas DPPC/VAS.**

Las áreas numeradas se refieren a: I: monocapa mezcla en estado LE o LC, II: monocapa en estado LE + fase líquida (puntos brillantes), III: monocapa en estado LC + fase líquida (puntos brillantes). Los símbolos (x) se corresponden a los valores de  $\pi$  a los cuales aparecen las lentes en BAM.  $\pi_c$  (puntos azules) indican las presiones de colapso de la monocapa.

A bajas fracciones molares de VAS ( $X_{VAS} < 0,5$ ), la Región I muestra una línea que marca el límite de la transición de fase LE-LC comenzando en  $\pi \sim 5$  mN/m y con una pendiente positiva que marca un límite entre las fases LE y LC, por debajo y por encima de esa línea, respectivamente. Manteniendo la  $X_{VAS} < 0,5$ , el aumento en la  $\pi$  lleva hasta una segunda línea, que marca el límite superior de la existencia de la monocapa, en este caso con

pendiente negativa, más allá de la cual ocurre el colapso. La dependencia de ambas líneas con la composición de la monocapa da cuenta de efectos coligativos. La Región I, correspondiente a fase monocapa en estado LE, se extiende hasta  $X_{VAS} \sim 0,6$  pero a partir de  $\pi \leq 15$  mN/m es interrumpida por otra línea que marca el límite con la Región II, constituida por los puntos  $\pi$ -MMA a los cuales aparecen las lentes/gotas a las distintas  $X_{VAS}$ . En consecuencia, la Región II correspondería a un sistema donde coexiste la fase monocapa mezcla DPPC/VAS en estado LE con otra fase de VAS líquida (ver próxima sección). La Región III corresponde a la zona del plano con valores intermedios y altos tanto de  $X_{VAS}$  como de  $\pi$  donde coexisten una monocapa mezcla en estado condensado y VAS líquida bajo la forma de lentes sobre la monocapa. Aumentando la  $\pi$  se alcanza una línea horizontal que marca la transición hacia la monocapa colapsada. La constancia en ese valor de  $\pi_C$  indica que por encima de la línea que limita las Regiones I, LE y II con la Región III, tenemos una monocapa de fosfolípido saturada con VAS y que el aumento en la proporción de VAS en la mezcla inicial conduce a un aumento en la cantidad de fase VAS líquida segregada.

En función de este análisis se pudo determinar que la solubilidad de VAS en DPPC, que representa el límite de composición a la cual la fase monocapa existe a toda  $\pi < \pi_C$ , es muy baja ( $X_{VAS} \sim 0,05$ ). Además, se demostró que todos los componentes de las mezclas DPPC/VAS permanecen en la fase monocapa dentro de los límites  $\pi \leq 15$  mN/m y  $X_{VAS} \leq 0,2$ .

### **V.2.3. *Análisis de la mezcla DPPC/VAS<sub>0,2</sub>***

Los puntos brillantes observados en las imágenes de BAM de las monocapas mezclas de DPPC/VAS en la interfase agua-aire (DPPC/VAS<sub>A/W</sub>) parecen ser gotas líquidas de alta reflectividad soportadas sobre un filme fosfolipídico que puede racionalizarse como una “hemipartícula de emulsión”.

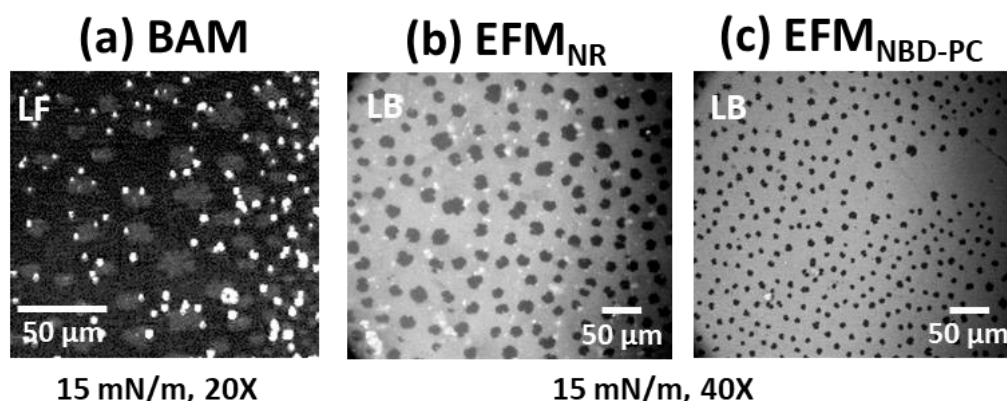
Para estudiar la emergencia y confirmar la relación estructural de las lentes observadas mediante BAM en las monocapas DPPC/VAS<sub>A/W</sub> (Figura 34) con el modelo de “hemipartículas de emulsión” se seleccionó representativamente la mezcla DPPC/VAS con una proporción correspondiente a  $X_{VAS}=0,2$  (DPPC/VAS<sub>0,2,A/W</sub>). En este modelo experimental la monocapa exhibe la coexistencia de los dominios LC, fase LE y los puntos de alta reflectividad y, respecto al modelo EPC/VAS, presenta la ventaja de permitir



dilucidar si la localización de las lentes muestra una posible preferencia por los distintos estados de empaquetamiento molecular LC, LE o los bordes LE-LC.

En primer lugar, la monocapa constituida por la mezcla de interés DPPC/VAS y un porcentaje de una sonda fluorescente se transfirió a un soporte sólido hidrofílico para obtener filmes de Langmuir-Blodgett (LB) a una  $\pi = 15$  mN/m. Posteriormente, se observó la topología del filme mediante EFM como se muestra en la Figura 36b-c, donde se incluye a modo comparativo una imagen de BAM obtenida a la misma  $\pi$  (Figura 36a).

Cuando se utiliza la sonda Rojo de Nilo (NR) (Figura 10d), una molécula hidrofóbica y con propiedades solvatocrómicas, se observa una alta concentración de esta en los puntos de alta reflectividad, siendo entonces efectiva para marcar la fase líquida hidrofóbica (VAS) (Figura 36b). Además, se observa que particiona en menor medida en la fase LE de la monocapa (fondo claro de la imagen) y que es excluida de la fase condensada (dominios oscuros), que se distribuyen casi homogéneamente sobre el fondo claro.

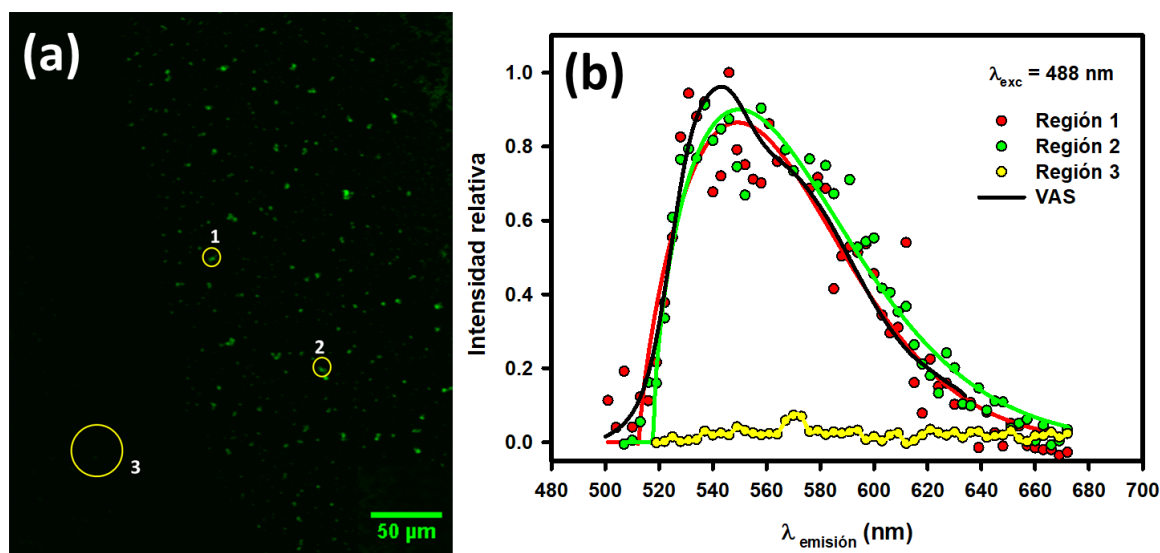


**Figura 36. Estudio de la mezcla DPPC/VAS<sub>0,2</sub> a  $\pi = 15$  mN/m mediante EFM y BAM.**

Imágenes de microscopía obtenidas para la mezcla DPPC/VAS a  $X_{VAS} = 0,2$  y a  $\pi = 15$  mN/m. En (a) se muestra para referencia una imagen obtenida mediante BAM. Mientras que (b) y (c) exhiben la imagen de un filme de LB observado mediante EFM cuando la sonda fluorescente utilizada es NR o NBD-PC, respectivamente.

Por el contrario, cuando se utiliza como sonda fluorescente una molécula anfipática cuyo grupo fluorescente se encuentra en la zona de las cadenas hidrocarbonadas del fosfolípido como el NBD-PC (Figura 10c), se observa que la sonda particiona en la fase LE dado que permite seguir evidenciando los puntos oscuros correspondientes a fase LC de donde se excluye (ver Figura 36c). Sin embargo, NBD-PC no permite distinguir la presencia de los puntos brillantes en la monocapa. Esta marcación continua de la región LE sugiere que el NBD-PC estaría marcando las regiones LE de la monocapa, incluyendo la superficie en contacto con las lentes.

El análisis mediante microscopía de epifluorescencia confocal espectral usando NR como sonda fluorescente, permitió obtener imágenes desde donde se seleccionaron lentes (regiones 1 y 2 en la Figura 37a) y zonas de la monocapa carentes de lentes (región 3 en la Figura 37a). A partir de las lentes en las regiones 1 y 2 (Figura 37a) se registraron los espectros de emisión de fluorescencia (obtenidos a una  $\lambda_{exc}=488$  nm) (Figura 37b). Estos espectros mostraron valores de centros de masa espectral  $CSM=564 \pm 3$  nm y  $569 \pm 6$  nm, respectivamente. Además, estos espectros fueron superponibles con el espectro de emisión de una disolución de NR en VAS y cuyo  $CSM=563 \pm 4$  nm. Lo cual indica fuertemente que las lentes están constituidas por VAS. En contraste, el espectro tomado de la región 3 (ausencia de lentes) no mostró niveles de emisión de fluorescencia significativamente distintos de cero indicando la ausencia de cantidades significativas de NR particionando entre las cadenas hidrocarbonadas de la DPPC.



**Figura 37. Análisis por Microscopía Espectral de la mezcla pseudobinaria DPPC/VAS<sub>0,02</sub>**

(a) Imagen obtenida mediante microscopía espectral de la mezcla pseudobinaria DPPC/VAS con una  $X_{VAS}=0,2$  y  $0,5\%$  de la sonda fluorescente rojo de Nilo (NR) a una  $\pi \sim 15-20$  mN/m. Las circunferencias amarillas denotan las regiones 1,2 y 3, cuyos espectros de emisión de fluorescencia (obtenidos tras la excitación a  $\lambda_{exc} = 488$  nm) se observan en (b). VAS se refiere al espectro de emisión de NR cuando se encuentra disuelto en solución en VAS pura.

Tomados en conjunto los resultados de EFM y de microscopía confocal espectral, apoyan el modelo de “hemipartícula de emulsión” consistente en una lente de VAS cubierta en la parte inferior por una monocapa de DPPC/VAS. Es esperable que, en esa monocapa, la  $X_{VAS}$  sea la correspondiente a la saturación ( $X_{VAS} \sim 0,05$ ) definida a partir de datos del diagrama de fase (Figura 35).

### V.3. Conclusiones

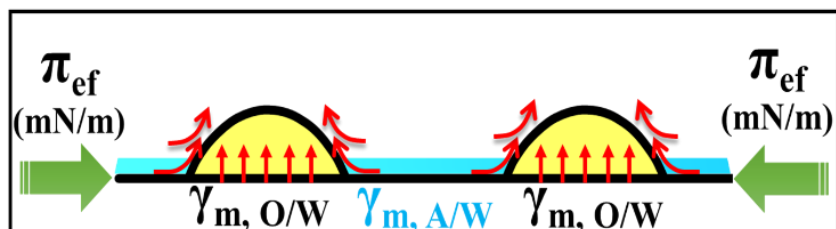
En este capítulo se compararon parámetros moleculares, reológicos y termodinámicos de monocapas de DPPC en la interfase O/W con respecto a la interfase A/W a distintas temperaturas. Los resultados obtenidos demostraron que las monocapas en la interfase O/W con respecto a las formadas en la interfase A/W son más expandidas y presentan más resistencia a la compresión, exhibiendo así una mayor  $\pi$  de transición y energía libre de transición de fase.

El comportamiento observado indica que las moléculas de alcanos de la fase superior se insertan entre las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos y no terminan de ser expulsadas de la monocapa aún en el punto previo al colapso (de mayor compresión). Los altos valores de  $\Delta G_{\text{comp}}$  obtenidos en la interfase líquido/líquido respecto a la A/W reflejan el trabajo extra necesario para expulsar las moléculas de hidrocarburos provenientes de la fase superior que están insertas en la monocapa entre las cadenas hidrocarbonadas de las moléculas de fosfolípido.

El estudio de monocapas de DPPC en la interfase O/W mediante la técnica de EFM presentó dificultades técnicas para obtener imágenes satisfactorias, que no pudieron ser resueltas. Debido a ello se realizaron estudios de mezclas pseudobinarias constituidas por DPPC y diferentes proporciones de VAS en la interfase A/W. A partir de ellas, se determinó que la solubilidad de VAS en DPPC es muy baja ( $X_{\text{VAS}} \sim 0,05$ ) y que las mezclas de DPPC/VAS forman monocapas estables en todo el rango de  $\pi$  a  $X_{\text{VAS}} < 0,2$ .

Sin embargo, a mayores  $X_{\text{VAS}}$  se observó mediante estudios de BAM la aparición de estructuras brillantes coexistiendo con dominios LC en la interfase. A partir de  $X_{\text{VAS}} > 0,2$  estos puntos brillantes (lentes) observados por BAM aparecieron incluso a menores valores de  $\pi$ . Estas estructuras se asociaron con gotas líquidas de alta reflectividad recubiertas por una monocapa lipídica en la interfase VAS/W, es decir hemipartículas de emulsión. Mediante estudios de microscopía espectral pudo confirmarse que las lentes estaban formadas por VAS. Además, a partir del diagrama de fases  $\pi$ - $X_{\text{VAS}}$  pudo observarse que las mezclas con  $X_{\text{VAS}} > 0,2$  exhibieron valores de transición de fase que son intermedios entre la  $\pi$  de transición para el sistema VAS/W y A/W lo que apoyó también la hipótesis de hemipartículas de emulsión.

Por otro lado, en el punto triple (PT) encontrado en el diagrama de fase  $\pi$ - $X_{VAS}$  ( $X_{VAS} = 0,05$  y  $\pi_{PT} = 11,0 \pm 0,2 \text{ mN/m}$ , correspondiente a  $MMA = 65,6 \pm 0,1 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ ), la monocapa en estado LE y LC está en equilibrio con una fase VAS líquida. Las moléculas de VAS expulsadas de la fase monocapa formarían núcleos de condensación que crecerían en altura a medida que aumenta la compresión lateral. Es importante considerar que la aparición de las gotas ocurrirá cuando la acumulación de moléculas de VAS excluidas de la monocapa sea lo suficientemente grande como para que en conjunto puedan exhibir las propiedades del líquido, constituir así una nueva fase y en definitiva para que el sistema exhiba la aparición de una interfase líquido/líquido. Teóricamente, esta situación se alcanzaría a una  $X_{VAS}$  comprendida entre 0,05 y 0,2 a 15 mN/m, pero experimentalmente, las microscopías EFM y BAM, permitieron demostrar la existencia de las gotas sólo a partir de  $X_{VAS} = 0,2$ ; a menor proporción de VAS las gotas podrían existir, pero la resolución de estas técnicas no permitió verificar experimentalmente esta posibilidad. Probablemente, tal como se mostró para la monocapa de  $EPC_{VAS/W}$  Figura 28c, varían en altura durante la compresión y recién a partir de  $X_{PG, VAS} = 0,2$  y a  $\pi_{PG} = 15 \text{ mN/m}$  (punto de gota, PG), se vuelven accesibles a la microscopía bajo la forma de gotas de VAS líquida (Figura 37) sobre la monocapa mezcla DPPC/VAS, cuya evolución se esquematiza en la Figura 38.



**Figura 38. Esquema ilustrativo de la transición de fase en mezclas líquidas binarias con solubilidad parcial y nucleación.**

Ilustración de las tensiones interfaciales involucradas en el proceso de nucleación ( $\gamma_{m, A/W}$  y  $\gamma_{m, O/W}$ ) cuando una monocapa mezcla DPPC/VAS es comprimida isométricamente. Las moléculas de VAS expulsadas de la fase monocapa formarían núcleos de condensación que crecerían en altura a medida que aumenta la compresión lateral. La presión lateral medida se considera como efectiva ( $\pi_{ef}$ ) al ser la ponderación de todos los fenómenos interfaciales sufridos por la monocapa durante el proceso de compresión. Las flechas rojas indican el movimiento de las moléculas.

En consecuencia, entre el PT y el PG aparece la interfase O/W. En estas condiciones el sistema presenta la coexistencia de una monocapa mezcla DPPC/VAS ubicada en la interfase A/W, en las zonas libres de gotas (m, A/W), y en la interfase O/W, en las zonas que subyacen a la gota (m, O/W). Entonces, resulta interesante preguntar cuáles son los valores de la composición ( $X_{m, A/W}$  y  $X_{m, O/W}$ ) y de la tensión interfacial ( $\gamma_{m, A/W}$  y  $\gamma_{m, O/W}$ ) de

la monocapa en cada zona cuando el sistema se encuentra en las condiciones del PG (por ejemplo, a  $X_{PG, VAS} = 0,2$  y  $\pi_{PG} = 15$  mN/m). Ya que en estas condiciones se tiene evidencia experimental a partir de BAM y EFM (Figura 34, Figura 36) de la aparición de las lentes y a partir de la microscopía confocal espectral que las mismas son una fase líquida constituida por VAS (Figura 37).

Para este fin, a partir de los valores de  $\gamma_{0, O/W}$  (37 mN/m) y  $\gamma_{0, A/W}$  (72 mN/m) para las interfases O/W y A/W limpias, respectivamente, y considerando que la presión lateral es constante en todo el sistema (15 mN/m) es posible calcular  $\gamma_{m, O/W} = \gamma_{0, O/W} - \pi$  (22 mN/m) y  $\gamma_{m, A/W} = \gamma_{0, A/W} - \pi$  (57 mN/m).

A partir del diagrama de fases (Figura 35) es posible inferir que la fase monocapa libre de gotas tiene una composición de saturación ( $X_{VAS}=0,05$ ). Siendo el número total de moléculas de VAS:

$$n_{VAS,T} = n_{VAS,m A/W} + n_{VAS,m O/W} + n_{VAS,G} \quad (18)$$

Para calcular la cantidad de moléculas de VAS segregada en la fase líquida (la gota) se estimó la densidad superficial ( $\delta_G=0,002$  gotas/ $\mu\text{m}^2$ ), el radio ( $r = 1,88 \pm 0,09 \mu\text{m}$ ) y el área ( $14 \pm 1 \mu\text{m}^2$ ) promedio (calculados a partir de la Figura 36a) así como la altura promedio ( $h \sim 2,92 \pm 0,09$  nm) de las gotas (a partir de la imagen de la Figura 28c). La relación entre diámetro y altura indica que la forma de las gotas se ajusta a la de un esferoide tipo oblato, aunque las imágenes no permiten discriminar si el mejor modelo corresponde al de un hemiesferoide soportado por una base (la  $m, O/W$ ) aproximadamente “plana” o si se trata de una  $m, O/W$  deprimida por el peso de una gota con forma de esferoide completo con un volumen  $V_G$ . Considerando el modelo de hemiesferoide  $V_G$  resulta:

$$V_G = \left[ \frac{4}{3} \pi \cdot r^2 \cdot \frac{h}{2} \right] \quad (19)$$

En este último caso  $V_G=0,0216 \mu\text{m}^3$  ( $2,16 \times 10^{-17}$  L/gota) y, considerando  $\delta_{VAS} = 820$  g/L,  $PM_{VAS} = 347 \pm 9$  g/mol (ver Sección III.4) y  $NA = 6,02 \times 10^{23}$ , el número de moléculas de VAS que conforman la gota ( $n_{VAS, G} = 3,147 \times 10^7$  moléculas/gota) se pudo estimar según:

$$n_{VAS,G} = \frac{\delta_{VAS} \cdot V_G \cdot NA}{PM_{VAS}} \quad (20)$$

Los datos geométricos y la densidad superficial de las gotas también permitieron inferir la fracción del área total ocupada por la  $m, O/W$  ( $f_{m, O/W} \cong 0,06$ , considerando la  $\delta_G$  y

el área total cubierta por gotas de VAS  $1,6 \times 10^3 \mu\text{m}^2$  en un área total de monocapa  $A_{T,m} = 4,29 \times 10^4 \mu\text{m}^2$  en la imagen analizada) y por diferencia la  $f_{m,A/W} \cong 0,94$ . Las moléculas de DPPC y VAS se distribuyen entre ambas zonas de la monocapa ( $m, A/W$  y  $m, O/W$ ) en una proporción dependiente del área molecular promedio y de la  $X_{DPPC}$  y  $X_{VAS}$  en cada zona. Por ejemplo, en la  $m, A/W$ :

$$MMA_{m,A/W} = \frac{n_{DPPC,m A/W} \cdot A_{DPPC,m A/W} + n_{VAS,m A/W} \cdot A_{VAS,m A/W}}{n_{DPPC,m A/W} + n_{VAS,m A/W}} \quad (21)$$

$$MMA_{m,A/W} = X_{DPPC,m A/W} \cdot A_{DPPC,m A/W} + X_{VAS,m A/W} \cdot A_{VAS,m A/W} \quad (22)$$

Donde  $MMA_{m, A/W}$  se refiere al área molecular promedio en la monocapa mezcla VAS/DPPC, mientras que  $n_{DPPC,m A/W}$  y  $n_{VAS,m A/W}$  o  $A_{DPPC,m A/W}$  y  $A_{VAS, mA/W}$  se refieren al número de moléculas o al área ocupada por una molécula de DPPC o VAS respectivamente, a la misma presión lateral (en este caso 15 mN/m). El valor de  $n_{DPPC, mA/W}$  pudo calcularse conociendo la fracción de saturación de la DPPC con VAS ( $X_{DPPC, mA/W} = 0,95$ ) (diagrama de fase Figura 35), el  $A_{DPPC, mA/W} = 54 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$  (ver Figura 33c) y el  $MMA_{m, mA/W} = 60 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$  (Figura 33a, isoterma de la mezcla con  $X_{VAS} = 0,05$ ). Despejando de la Ec.(22) o a partir de la Figura 33c resulta  $A_{VAS, mA/W} = 174 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ . Además, si:

$$A_{T,m} = A_{m,A/W} + A_{m,O/W} = f_{m A/W} \cdot A_{T,m} + f_{m O/W} \cdot A_{T,m} \quad \text{y} \quad n_{T,m A/W} = \frac{f_{m A/W} \cdot A_{T,m}}{MMA_{m A/W}}$$

Conociendo la fracción molar global de VAS en el sistema ( $X_{T,VAS} = 0,2$ ) y la cantidad total de moléculas sembradas ( $n_T = 7,68 \times 10^{10}$ ) que ocupan un área como la de la imagen bajo análisis (Figura 36a) a 15 mN/m (datos experimentales) resultan  $n_{T,DPPC} = 6,14 \times 10^{10}$  moléculas y  $n_{T,VAS} = 1,5 \times 10^{10}$  moléculas. A partir del número ( $n_G$ ) y el área ( $A_G$ ) de cada gota se pudo calcular el área de la monocapa ocupada por interfase  $m, O/W$  y por diferencia el área de  $m, A/W$ , las que divididas por las respectivas MMA en cada fase (68 y  $62,9 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ , respectivamente), tomadas de la isotermas a 15 mN/m de  $DPPC_{O/W}$  y de la mezcla  $DPPC/VAS_{0,2,A/W}$  resultan en  $n_{T,m O/W} = 3,97 \times 10^9$  y  $n_{T,m A/W} = 6,42 \times 10^{10}$  moléculas, respectivamente. La resolución del conjunto de ecuaciones permitió calcular  $X_{DPPC, mA/W} = 0,91$ , un valor muy próximo al valor 0,95 determinado experimentalmente mediante el diagrama de fase  $\pi$ - $X_{VAS}$  (Figura 35); y conociendo  $n_{T,m A/W}$  se calculó  $n_{DPPC, mA/W} = 5,84 \times 10^{10}$  moléculas y por diferencia respecto al total,  $n_{VAS, mA/W} = 5,78 \times 10^9$  moléculas. A partir de la solubilidad de DPPC en  $VAS_{liq}$ ,  $S_{DPPC, VAS_{liq}} = 6,6 \times 10^{-4}$  mM y el volumen total de  $VAS_{liq}$  en forma de gotas ( $3,89 \times 10^{-15}$  L) se calculó  $n_{DPPC, G} = 1,55 \times 10^3$  moléculas. Esto indica

que, en las gotas, la proporción de moléculas de fosfolípido es despreciable respecto a las de VAS. Despejando de la Ec.(18) es posible calcular  $n_{VAS,m O/W} = 9,78 \times 10^8$  moléculas y con la misma ecuación pero referida a DPPC se calculó  $n_{DPPC,m O/W} = 2,99 \times 10^9$  moléculas.

Finalmente es posible definir que la  $m, O/W$  a 15 mN/m y T ambiente, contiene una  $X_{VAS, m O/W} = 0,25$ , un dato que no era posible determinar mediante los experimentos con los filmes de Langmuir en la interfase O/W. Además, el hecho de que densidad molecular calculada haya resultado aproximadamente constante en las interfases A/W y O/W ( $1,59 \times 10^{26}$  y  $1,58 \times 10^{26}$  molécula/m<sup>2</sup>) avala el concepto inicial de  $\pi = cte$  en el cual se basó el conjunto de cálculos. Esto puede deducirse si, como aproximación estimativa, se aplica  $\pi = \frac{n}{A}RT$  como ecuación de estado de la monocapa, donde  $\frac{n}{A}$  es la densidad molecular, R la constante universal de los gases y T la temperatura absoluta.

El conjunto de resultados de estos análisis se muestra en la Tabla 6.

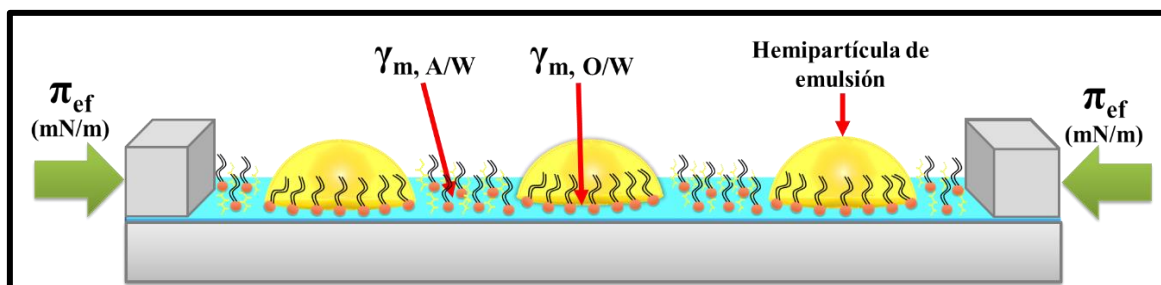
**Tabla 6. Datos obtenidos para el análisis de composición de la monocapa en las condiciones del PG ( $X_{PG, VAS} = 0,2$  y  $\pi_{PG} = 15$  mN/m).**

Variable	Monocapa (DPPC/VAS <sub>0,2</sub> ) $\pi=15$ mN/m			Gotas
	Total	Interfase A/W	Interfase O/W	
Área total	$4,292 \times 10^4 \mu\text{m}^2$	$4,049 \times 10^4 \mu\text{m}^2$	$0,243 \times 10^4 \mu\text{m}^2$	$14 \pm 1 \mu\text{m}^2/\text{gota}$
Radio				1,88 nm
Altura	-	-	-	$2,92 \pm 0,09$ nm
Volumen	-	-	-	$2,16 \times 10^{-17}$ L/gota
$\delta_G$	-	-	-	$0,003 \pm 0,001$ gotas/ $\mu\text{m}^2$
$F_{\text{área},m}$	1	0,94	0,06	-
MMA ( $\text{Å}^2/\text{molec}$ )	70	62,9	68	-
$A_{DPPC,m}$ ( $\text{Å}^2/\text{molec}$ )		55,43		-
$A_{VAS,m}$ ( $\text{Å}^2/\text{molec}$ )		138,43		
$n_T$ (molec#)	$7,68 \times 10^{10}$	$6,42 \times 10^{10}$	$3,97 \times 10^9$	$5,53 \times 10^9$
$n_{T,DPPC,m}$ (molec#)	$6,14 \times 10^{10}$	$5,84 \times 10^{10}$	$2,99 \times 10^9$	$1,55 \times 10^3$ *
$n_{T,VAS,m}$ (molec#)	$1,54 \times 10^{10}$	$5,78 \times 10^9$	$9,78 \times 10^8$	$5,53 \times 10^9$
$X_{DPPC}$	0,8	0,91	0,75	$2,79 \times 10^{-7}$
$X_{VAS}$	0,2	0,09	0,25	0,9997
Densidad molecular (molec/m <sup>2</sup> )		$1,59 \times 10^{26}$	$1,58 \times 10^{26}$	
$\gamma$ (mN/m)		57	22	

#, Calculado para el área total de la imagen a partir de la cantidad sembrada experimentalmente.  $n_{DPPC} = 1,598 \times 10^{16}$  moléculas;  $n_{VAS} = 0,397 \times 10^{16}$  moléculas para preparar la monocapa comprimida a 15 mN/m.

\*, Calculado según la solubilidad de DPPC en VAS<sub>liq</sub>  $S_{VASliq} = 6,6 \times 10^{-4}$  mM. Los valores en rojo fueron determinados experimentalmente.

Esto muestra que se ha logrado complementar la información derivada de los dos modelos de monocapas estudiados y así proponer el modelo de hemipartícula de emulsión que nos permite explicar adecuadamente los fenómenos interfaciales observados en las monocapas de mezclas pseudobinarias de VAS/DPPC en la interfase A/W (ver Figura 39).



**Figura 39. Modelo de hemipartícula de emulsión.**

Esquema representativo del modelo propuesto para explicar el comportamiento observado en monocapas mezcla de VAS/DPPC. Puede observarse que, a partir de cierta composición,  $X_{VAS} = 0,2$ , la monocapa mezcla (con una composición  $X_{VAS} = 0,09$ ) en la interfase agua aire ( $\gamma_{m, A/W}$ ) en estado LE y LC está en equilibrio con una fase VAS líquida que se encuentra segregada en núcleos estabilizados en la interfase O/W por una monocapa fosfolipídica ( $\gamma_{m, O/W}$ ) que evitan su coalescencia, constituyendo así hemipartículas de emulsión.



*“No importa cuántas conexiones tomemos en consideración para describir un fenómeno, siempre estaremos obligados a excluir otras”.*  
Fritjof Capra (*La trama de la vida*).

## **Capítulo VI**

### ***Monocapas en la interfase O/W como un modelo experimental de emulsiones***

#### **VI.1. Introducción**

La formación de un filme interfasial que posea ciertas propiedades reológicas en la superficie de una partícula de emulsión es de inmensa importancia para la estabilidad de las emulsiones O/W y W/O. Se han llevado a cabo considerables investigaciones sobre diversas propiedades fisicoquímicas de las emulsiones; sin embargo, aún no hay una descripción detallada y clara de los mecanismos que se encuentran involucrados en la estabilidad de tales sistemas. Algunos autores se refieren a complejos intermoleculares en la interfase aceite/agua<sup>173-174</sup>, otros postulan una adsorción aumentada de los tensioactivos en presencia de cosurfactantes<sup>175-176</sup>, y otros han demostrado que la presencia de cristales líquidos es un factor que mejora la estabilidad de la emulsión<sup>177-178</sup>. También se ha informado que la formación y las propiedades físicas de emulsiones O/W están influenciadas por la longitud de la cadena del hidrocarburo del tensioactivo, del cosurfactante y del aceite<sup>61</sup>.

El estudio de las propiedades interfasiales de un tensioactivo en la interfase O/W y de las mezclas tensioactivo/aceite en la interfase A/W son de fundamental importancia en el diseño de procesos donde dos fases líquidas están en equilibrio. A partir de los resultados obtenidos en el Capítulo V, para monocapas de DPPC en la interfase agua/vaselina y para mezclas DPPC/VAS en la interfase agua/aire se realizaron diversos experimentos para evaluar en una primera instancia si estos datos pueden utilizarse para diseñar de un modo racional emulsiones estables con un determinado diámetro de gota. Si bien estos estudios aún no son suficientes para elaborar de manera completa una metodología nueva de trabajo en la formulación de emulsiones, los mismos constituyen un gran avance para dilucidar

cómo puede utilizarse el modelo de Filmes de Langmuir como una técnica preliminar para conocer el sistema surfactante/agua/aceite de interés y obtener datos cuantitativos que sean de utilidad en el proceso de selección de los componentes interfásicamente activos y en la formulación de emulsiones específicas.

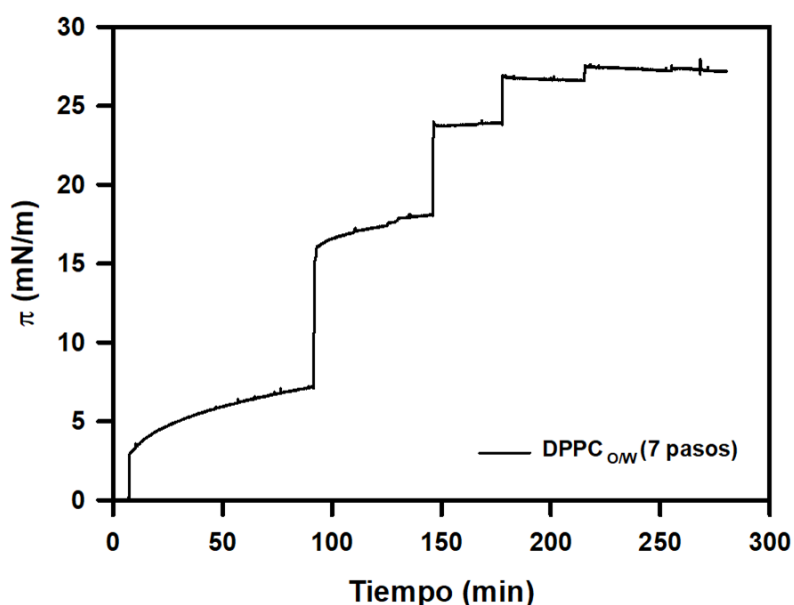
## **VI.2. Resultados y discusión**

### **VI.2.1. Emulsiones de DPPC/VAS**

La eficiencia del empaquetamiento del fosfolípido ya sea en monocapas del lípido puro en la interfase O/W o en monocapas mezclas en la interfase A/W, se encuentra muy influenciada por la presencia de las moléculas hidrofóbicas que componen la fase aceite. Además, como se explicó en el Capítulo III, la VAS es una mezcla compleja de hidrocarburos que varían principalmente en la longitud de sus cadenas hidrocarbonadas. Las interacciones de los componentes hidrofóbicos de las moléculas del tensioactivo y la fase oleosa en el estado de coexistencia de fases de las monocapas pueden proporcionar una idea de cómo actúan sobre la estabilidad de la emulsión al influir en la curvatura preferida de la monocapa de tensioactivo y, por lo tanto, en el tamaño de la gota. Como se señaló anteriormente (Capítulo I, Sección I.4), un papel importante de los tensioactivos en cualquier interfase es reducir la energía interfásica a través de su adsorción. Aunque puede haber varios factores involucrados, una de las principales fuerzas impulsoras será, como siempre, una reducción en la energía libre del sistema a través de una disminución en el área interfásica total. Por lo tanto, para conseguir la estabilización de una emulsión, conocer el comportamiento de adsorción de los tensioactivos en la interfase agua/aceite es de especial importancia.

Debido a esto, se realizaron experimentos de adsorción de DPPC en la interfase VAS/W (ver Figura 40). La solución de DPPC se sembró en siete pasos en la interfase O/W previamente formada (Método  $AM_{O/W}$ ) hasta alcanzar la presión de equilibrio de saturación, como se describió anteriormente para EPC (ver Capítulo IV, Sección IV.2.1). A partir de la isoterma de adsorción puede obtenerse el valor de la presión de equilibrio de saturación de DPPC ( $\pi_{eq,sat} \sim 27,3 \pm 0,1$  mN/m), en el cual la interfase VAS/W se encuentra saturada de fosfolípido y la presión interfásica alcanza su valor de equilibrio máximo. Dado que la superficie es finita, la concentración de moléculas en esta región tiene como límite máximo la concentración superficial a saturación; por lo tanto, si se toma el valor de la presión

superficial en este punto ( $\pi_{eq,sat} = 27,3 \pm 0,1$  mN/m), y se interpola en la isoterma  $\pi$ -MMA en la interfase VAS/W a 25 ° C (ver Figura 30b, Sección V.2.1), se puede determinar que el área molecular mínima que ocupa el tensoactivo en la interfase es  $MMA_{min} = 59 \pm 3$  Å<sup>2</sup>/molécula. Considerando entonces, que una partícula de emulsión estará estabilizada por una monocapa tensoactivo podría considerarse el valor de área  $MMA_{min}$  para estimar la cantidad máxima de moléculas de DPPC que serían necesarias para recubrir la superficie de una gota. Aunque para una interfase curva, debe considerarse el efecto del radio de curvatura, se ha estimado que la tensión superficial ( $\gamma$ ) para una interfase curva está muy cerca de la de una superficie plana, a menos que las gotas sean muy pequeñas ( $< 10$  nm)<sup>179</sup>, por lo que utilizar los valores de  $\pi_{eq,sat}$  y  $MMA_{min}$  debería ser una aproximación válida.



**Figura 40. Isotherma de adsorción de DPPC en la interfase vaselina/agua.**

Gráfico de presión interfasial vs. tiempo, cuando la siembra de DPPC se realiza mediante el método  $AM_{O/W}$  (—) en la interfase VAS/W, en 7 pasos consecutivos. La curva mostrada es representativa de experimentos que varían en menos de 2 mN/m con sus respectivas réplicas.  $T = 25 \pm 1$  °C.

No obstante, si se observa la isoterma  $\pi$ -MMA en la interfase VAS/W a 25 ° C (ver Figura 30b, Sección V.2.1), el valor de  $\pi_{eq,sat}$  obtenido para DPPC (Figura 40) es muy cercano a la presión de colapso ( $\pi_{c, VAS/W} = 27 \pm 1$  mN/m) de la monocapa de DPPC en la interfase VAS/W. Como ya se ha explicado anteriormente (Capítulo I, Sección I.5.2) existen distintos tipos de colapso que implican la inestabilización global de la monocapa, y generalmente pueden existir estructuras tridimensionales (no monocapa). Por este motivo, se consideró oportuno no utilizar el valor de  $MMA_{min}$  sino un punto de la isoterma  $\pi$ -MMA cercano a la  $\pi_{eq,sat}$  y dentro de un 10% por debajo de la  $\pi_{c, VAS/W}$ , donde las moléculas de DPPC forman una monocapa estable con un estado de fase LC.

Esto corresponde a una presión superficial dentro del rango  $\pi = 24 \pm 1$  mN/m y un área molecular aparente promedio para la DPPC\*\* de MMA=  $63 \pm 3$  Å<sup>2</sup>/molécula (tomando en cuenta el error experimental para ambas variables). Considerando que el área de una partícula de emulsión, si se asume una forma esférica, se calcula como:  $A = 4\pi r^2$  puede determinarse que para cubrir una partícula de 200 nm de diámetro ( $A = 125663,7$  nm<sup>2</sup>) con moléculas de DPPC de MMA=  $66$  Å<sup>2</sup> (extremo superior del rango de área seleccionado) se requieren teóricamente, y como mínimo, 190399,54 moléculas de DPPC. Además, el volumen de una gota de 200 nm de diámetro calculado como  $\frac{4}{3}\pi r^3$  es 4188790 nm<sup>3</sup>. De acuerdo con la densidad de VAS ( $\delta = 0,82$  g/mL) y la masa molecular media ponderada (346,89 g/mol), el volumen calculado representa aproximadamente  $5,95 \times 10^6$  moléculas de VAS. Utilizando esta información puede predecirse que teóricamente la relación molar VAS/DPPC estimada para preparar una emulsión cuyo diámetro de gota sea de 200 nm de diámetro es 31/1 mol/mol.

Este cálculo predictivo puede realizarse según el valor del diámetro de gota que se desea obtener en la emulsión final. Para verificar si esta predicción era adecuada se examinaron diversas emulsiones O/W, utilizando la DPPC como emulsionante, VAS como aceite y agua como fase acuosa. Se modificaron las relaciones molares de lípido y fase oleosa de acuerdo con los cálculos predictivos para la obtención de gotas con un diámetro teórico de 100, 200, 300, 400, 600 y 800 nm. La concentración de DPPC en agua (0,01mM) se eligió de acuerdo con lo reportado por Wiącek<sup>180</sup> para emulsiones de n-tetradecano/agua y DPPC. Adicionalmente, se utilizó una concentración diez veces mayor (0,1 mM) con fines comparativos.

Cabe destacar que la concentración de fosfolípido en agua también es un parámetro importante a tener en cuenta y podrían realizarse una amplia variedad de formulaciones evaluando cómo el sistema es afectado por la relación agua-surfactante, sin embargo, este tipo de experimentos se encuentran más allá de los objetivos del presente trabajo de tesis y deberán ser estudiados en futuras investigaciones.

---

\*\* Surge de interpolar el valor de  $\pi$  en la isoterma  $\pi$ -MMA en la interfase VAS/W a 25 ° C (ver Figura 30b, Sección V.2.1)

## VI.2.2. Determinación del tamaño de las partículas por DLS

En la Tabla 7 se exhiben los diámetros hidrodinámicos ( $D_h$ ) y el índice de polidispersidad (PDI) medidos experimentalmente para las partículas de emulsión obtenidas, así como el valor del área molecular promedio ocupada por las moléculas de DPPC en cada una de las emulsiones. Como se describió en la Sección VI.2.1, la MMA utilizada para DPPC en los cálculos predictivos fue de  $63 \pm 3 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ , comparando este valor y los diámetros teóricos con los experimentales se puede considerar que los valores obtenidos por DLS son significativamente cercanos a los predichos y que se encuentran dentro del error experimental para el caso de emulsiones realizadas a partir de una concentración acuosa 0,01mM de DPPC ( $[\text{DPPC}]_{\text{O/W}, 0,01\text{mM}}$ ).

**Tabla 7. Caracterización de las emulsiones O/W para distintas relaciones molares DPPC/VAS.**

Relación molar VAS/DPPC	$D_h^a$ Teórico (nm)	[DPPC] 0,01 mM			[DPPC] 0,1 mM		
		$D_h^b$ (nm)	PDI	MMA <sup>c</sup>	$D_h^b$ (nm)	PDI	MMA <sup>c</sup>
16:01	100	160 ± 40	0,17 ± 0,04	37 ± 22	270 ± 90	0,11 ± 0,01	26 ± 14
31:01	200	207 ± 11	0,12 ± 0,04	63 ± 5	315 ± 9	0,12 ± 0,04	45 ± 2
47:01	300	272 ± 14	0,16 ± 0,01	73 ± 5	521 ± 14	0,15 ± 0,03	41 ± 3
63:01	400	455 ± 25	0,08 ± 0,04	58 ± 6	696 ± 20	0,07 ± 0,04	44 ± 2
94:01	600	722 ± 36	0,12 ± 0,03	53 ± 4	887 ± 15	0,20 ± 0,03	42 ± 1
126:01	800	906 ± 50	0,23 ± 0,03	59 ± 7	1173 ± 94	0,12 ± 0,04	45 ± 5

Los datos se tomaron de las emulsiones de DPPC<sub>O/W</sub>. Los valores son la media ± S.E.M. de al menos tres experimentos independientes. T = 25 ± 1 ° C. <sup>a</sup>l Diámetro teórico deseado para las partículas de emulsión. <sup>b</sup>l Diámetro hidrodinámico medido experimentalmente mediante DLS. <sup>c</sup>l Área molecular promedio que ocupan las moléculas de DPPC en la emulsión estimada a partir de los datos experimentales.

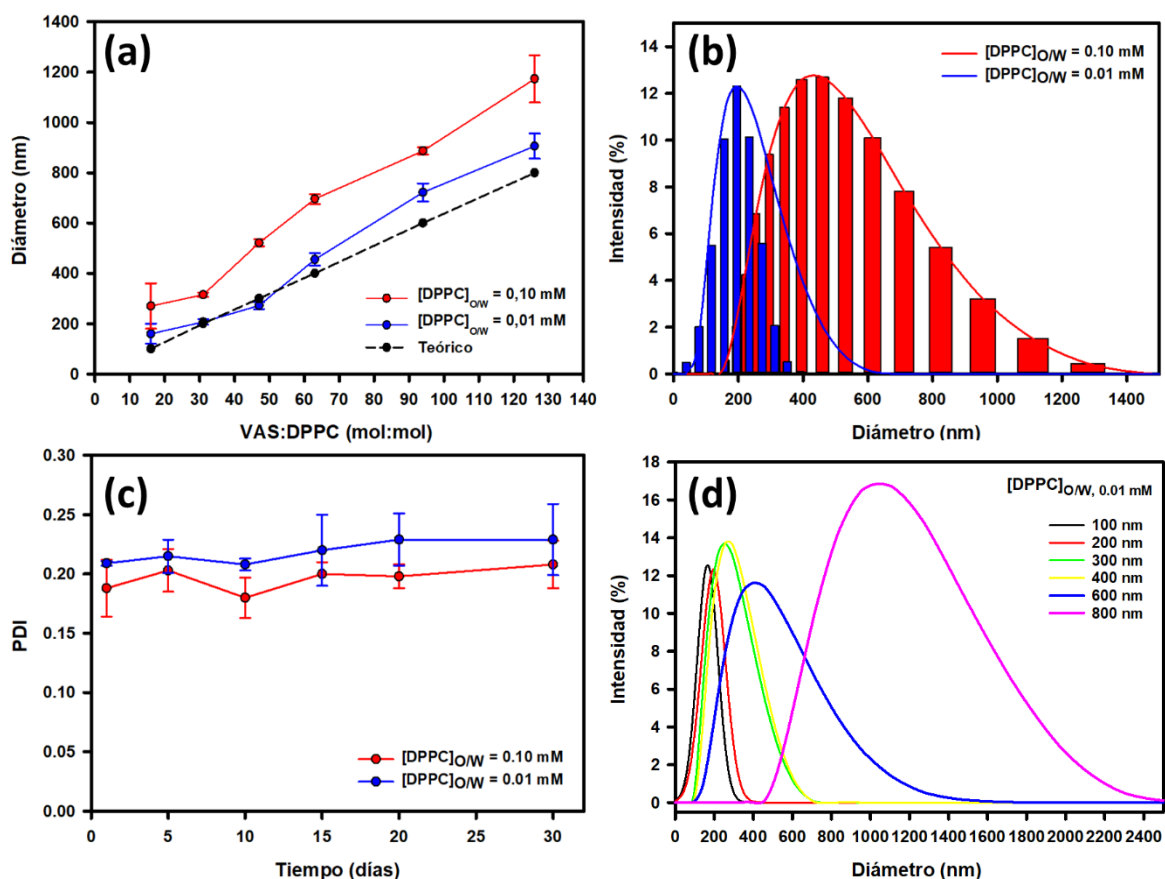
Por el contrario, para el caso de las emulsiones con una concentración acuosa de DPPC 0,1mM ( $[\text{DPPC}]_{\text{O/W}, 0,1\text{mM}}$ ). los valores de MMA y de  $D_h$  se encuentran más alejados de los valores predichos a partir del sistema de monocapas líquido/líquido. Esto se ve claramente en la Figura 41a, donde se muestra la relación molar VAS/DPPC requerida según el diámetro de partícula deseado (línea roja) y los diámetros experimentales para las emulsiones realizadas. Los datos experimentales para  $[\text{DPPC}]_{\text{O/W}, 0,01\text{mM}}$  se asemejan a la idealidad teórica, en mayor medida, en el rango de 100 nm a 400 nm mientras que en el rango de 600 nm a 800 nm se alejan en un 15 %. Sin embargo, es evidente que en el caso de las emulsiones  $[\text{DPPC}]_{\text{O/W}, 0,1\text{mM}}$ , los diámetros obtenidos son en promedio 1,8 veces mayores que los esperados. Si bien las mediciones de DLS muestran el diámetro promedio de

partícula y su distribución poblacional, esta técnica no puede brindar información referida al tipo de estructura presente en la dispersión, por lo que durante las mediciones se asume que las partículas son esféricas. Para realizar tal determinación estructural y esclarecer las diferencias obtenidas en los resultados se podrían realizar estudios de Dispersión de rayos X de ángulo reducido (SAXS), sin embargo, esta técnica no se encontró dentro de las posibilidades de la tesis al momento de la realización de estos experimentos.

En la Figura 41b, se muestra la selección de dos distribuciones poblacionales (a modo comparativo) obtenidas para  $[\text{DPPC}]_{\text{O/W}, 0,01\text{mM}}$  y  $[\text{DPPC}]_{\text{O/W}, 0,1\text{mM}}$  cuando el tamaño de partícula esperado teóricamente es de 200 nm. Este gráfico demuestra que la distribución poblacional es más amplia para  $[\text{DPPC}]_{\text{O/W}, 0,1\text{mM}}$ , por lo tanto, la variedad de estructuras y tamaños de partículas presentes en la dispersión es mayor que para las emulsiones  $[\text{DPPC}]_{\text{O/W}, 0,01\text{mM}}$  cuya distribución de poblaciones es menor y más uniforme. Considerando esta variabilidad en la distribución de poblaciones, se asume que para las emulsiones  $[\text{DPPC}]_{\text{O/W}, 0,1\text{mM}}$ , las predicciones teóricas realizadas a partir del modelo de filmes de Langmuir no son satisfactorias. Estos resultados son un indicio de que la concentración de fosfolípido en agua es de gran importancia y que no puede ser desestimada al momento de plantear una formulación, aunque se disponga de los cálculos teóricos previos. En otras palabras, lo que varía es la cantidad de agua en el sistema. Cuando se utiliza una concentración de 0,1 mM hay menor cantidad de agua en el sistema que cuando se utiliza la concentración 0,01mM. Por lo que es lógico pensar que a mayor cantidad de agua en el sistema las gotas de emulsión se encuentren más alejadas entre sí, favoreciendo que las mismas sean uniformes y más estables.

Además, el nivel de empaquetamiento del fosfolípido, así como su estado de fase podrían ser modificados por las condiciones del medio. Cambios en el nivel de fuerza iónica, el pH o en la polaridad del medio acuoso pueden utilizarse como herramientas para modificar el tipo de agregado supramolecular. Por ejemplo, se ha reportado que el agregado de etanol como cosurfactante a la fase acuosa en ciertas concentraciones favorece la formación de partículas de emulsión de menor diámetro para el caso de la DPPC<sup>180</sup>. El etanol puede acumularse en la monocapa de fosfolípidos o interactuar entre los lípidos y el agua circundante. Su presencia tiene un efecto sobre la temperatura de transición principal<sup>181-182</sup>, este efecto es bifásico y causa distintos cambios en el mecanismo de la estructuración de la fase DPPC/agua (etanol)<sup>183-184</sup>. Estas posibles variaciones no fueron consideradas en esta

instancia porque no se utilizaron inicialmente en el sistema modelo de monocapas líquido/líquido, de modo que para poder realizar una evaluación inicial y una comparación más fehaciente de ambos sistemas (monocapas-emulsiones) sólo se trabajó en una concentración acuosa de DPPC superior a su CMC.



**Figura 41. Análisis y caracterización de las emulsiones  $[DPPC]_{O/W}, 0.01 \text{ mM}$  y  $[DPPC]_{O/W}, 0.1 \text{ mM}$  a partir de datos obtenidos mediante DLS.**

(a) Valores experimentales del diámetro de las partículas de emulsión para  $[DPPC]_{O/W}, 0.01 \text{ mM}$  y  $[DPPC]_{O/W}, 0.1 \text{ mM}$  en función de la relación molar VAS:DPPC. La línea discontinua representa el valor teórico de diámetro esperado. (b) Distribución poblacional del tamaño de partículas para dos emulsiones representativas preparadas con distinta concentración acuosa de DPPC y cuyo tamaño de diámetro esperado es 200nm. (c) Evaluación de la estabilidad de las partículas de emulsión de (b) durante 30 días mediante el análisis de los datos de PDI experimentales. (d) Distribución poblacional para emulsiones de  $[DPPC]_{O/W}, 0.01 \text{ mM}$  con diámetros esperados de 100, 200, 300, 400, 600 o 800 nm. Los resultados mostrados del análisis de DLS son representativos de al menos tres experimentos independientes

Por otra parte, se realizó un seguimiento de las formulaciones en función del tiempo para evaluar su estabilidad, a tal fin se midieron los valores de PDI durante treinta días (ver Figura 41c) para emulsiones de 200 nm de diámetro. A pesar de que las emulsiones  $[DPPC]_{O/W}, 0.1 \text{ mM}$  no se ajustaron a los tamaños de diámetro esperados, las mismas resultaron

ser bastante estables en el tiempo al igual que las emulsiones [DPPC]<sub>O/W, 0,01mM</sub>, las cuales no atravesaron procesos de inestabilidad irreversibles o reversibles, como floculación, sedimentación, coalescencia o maduración de Ostwald ya que las variaciones en el PDI fueron mínimas y no significativas considerando el error experimental asociado. En particular, aquellas gotas de 200 nm a 400 nm de diámetro son de mayor interés porque corresponden a una nanoemulsión y resultan ser sistemas eficientes para encapsular moléculas hidrofóbicas. Además, en el caso de la encapsulación de drogas con fines terapéuticos este tamaño de gota favorece su administración y una duración prolongada en el sistema circulatorio<sup>185-186</sup>.

Finalmente, en la Figura 41d se muestra la distribución de poblaciones para las emulsiones [DPPC]<sub>O/W, 0,01mM</sub> preparadas según los diámetros de gota deseados. Puede observarse que en el rango de 100 nm a 400 nm de diámetro las distribuciones son homogéneas presentando una sola población con un máximo acorde al tamaño de partícula esperado. Sin embargo, cuando se intenta obtener partículas de mayor diámetro (600 nm y 800 nm) la distribución de poblaciones es más amplia y no se obtienen resultados satisfactorios. Hay una tendencia a la aparición de partículas lipídicas de mayor diámetro debido, posiblemente, a una inestabilidad del sistema (floculación / coalescencia) o a la formación de otro tipo de agregados supramoleculares.

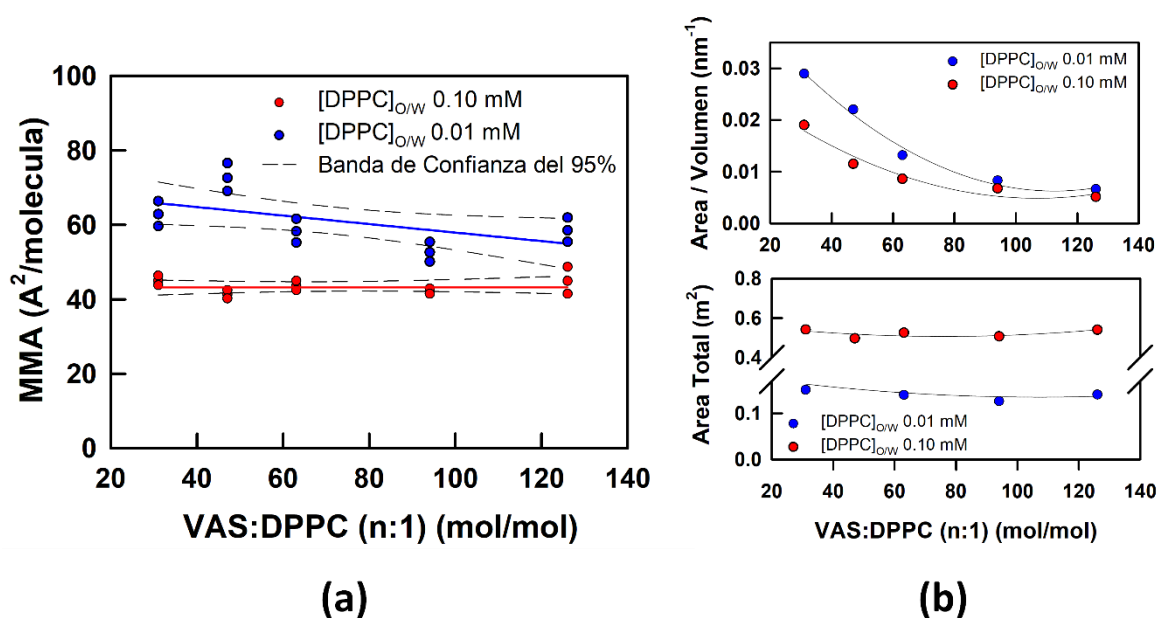
Adicionalmente, teniendo en cuenta el análisis realizado en el Capítulo V, puede considerarse que las moléculas de tensioactivo (en este caso DPPC) en el sistema se distribuyen en tres compartimientos: a) la fase hidrofóbica (VAS), b) la fase acuosa y c) la monocapa localizada en la interfase VAS/agua (ver Figura 39).

A partir de la información obtenida con EPC en el Capítulo IV y asumiendo un comportamiento similar entre EPC y DPPC, se puede estimar un valor de la solubilidad de DPPC en la fase de VAS<sub>liq</sub> como  $S_{DPPC, VAS} = 6,6 \times 10^{-4}$  mM (ver Sección IV.2.1, pág. 92). En la fase acuosa, por encima de su concentración micelar crítica ( $CMC_{DPPC} = 7 \times 10^{-7}$  mM) DPPC participa de un equilibrio vesícula-monómero. El monómero proveniente de las fases VAS y agua participa del equilibrio monómero en solución-monocapa. En función de este modelo y a partir de los datos de concentración de DPPC, relaciones molares de VAS-DPPC y VAS-agua y características geométricas deducidas de los valores de tamaños de partículas de emulsión determinados mediante DLS, se calculó el área molecular ocupada por las moléculas de DPPC en la interfase O/W ( $MMA_{O/W}$ ), (Figura 42a). A una concentración fija



de DPPC, el valor de  $MMA_{O/W}$  se mantuvo constante en función de la relación molar VAS:DPPC y fue menor (mayor empaquetamiento molecular) a mayor concentración de DPPC total en el sistema global. Comparando este resultado con el mostrado en la Figura 41a, se pone de manifiesto que, en nuestro diseño experimental, a medida que la relación VAS/DPPC aumenta a DPPC total constante, el sistema regula el tamaño de las partículas a fin de mantener constante la densidad molecular interfasial del surfactante (también conocido como exceso de superficie, del inglés *Surface excess*,  $\Gamma$ ).

En consecuencia,  $\Gamma$  es el parámetro que resume la condición de estabilidad de la emulsión y al que debe prestarse gran atención en el diseño de emulsiones a fin de prevenir los fenómenos de coalescencia.



**Figura 42. Análisis del área molecular de la DPPC en la interfase de una partícula de emulsión.**

(a) Valores del área molecular promedio de la DPPC calculados a partir de los datos experimentales obtenidos para las emulsiones ● — [DPPC]<sub>O/W</sub>, 0,01 mM y ● — [DPPC]<sub>O/W</sub>, 0,1 mM en función de la relación molar VAS:DPPC. La línea discontinua representa la banda de confianza del 95% obtenida para cada regresión lineal (línea sólida) realizada. (b) Relación entre el área de la partícula de emulsión y su volumen calculada a partir de los datos experimentales de  $D_h$  (panel superior), y el área total calculada como el producto del N° total de partículas y el área ocupada por cada una de ellas (panel inferior) en función de la relación molar VAS:DPPC respectivamente, para las emulsiones ● [DPPC]<sub>O/W</sub>, 0,01 mM y ● [DPPC]<sub>O/W</sub>, 0,1 mM

### VI.3. Conclusiones

Los resultados obtenidos son una primera aproximación de cómo puede utilizarse el modelo de filmes de Langmuir en la interfase líquido/líquido para obtener información cuantitativa preliminar para la formulación de emulsiones estables. Es evidente que aún quedan muchas variables a considerar y, por tanto, experimentos a realizar. El presente Capítulo no pretende ser una investigación consumada, sino un aporte para iniciar un camino que permita dilucidar la relación entre dos estructuras autoorganizadas que difieren en complejidad (monocapa-emulsión) pero que desde el punto de vista de la química interfasial son sistemas íntimamente relacionados.

En esta instancia se pudo constatar que las predicciones realizadas a partir de los datos de monocapas resultaron ser adecuadas para emulsiones con una concentración de DPPC 0,01 mM y con tamaños de partículas deseados en el rango de 100 nm a 400 nm presentando una distribución poblacional homogénea y una alta estabilidad en el tiempo por 30 días. Sin embargo, se determinó que la concentración de fosfolípido utilizada en la formulación (o cantidad de agua presente) es un parámetro que debe estudiarse cuidadosamente y que ejerce una gran influencia en el tamaño de gota promedio de la dispersión, ya que las predicciones realizadas no fueron válidas cuando la concentración de DPPC fue diez veces mayor (0,1 mM).

Los resultados obtenidos son parcialmente satisfactorios e invitan a la realización de una mayor cantidad y variedad de experimentos para corroborar las predicciones. Además, sería oportuno evaluar otros protocolos experimentales de síntesis modificando el proceso de ultrasonificación o utilizando otras técnicas como la microfluidización, que permite la obtención de distribuciones poblacionales más uniformes. Finalmente, sería importante estudiar otros fosfolípidos y/o surfactantes sintéticos para evaluar con detalle el efecto de la variación de los tres parámetros (Agua/Surfactante/Aceite) y su comportamiento en el sistema de monocapas en la interfase líquido/líquido.

*" La curiosidad tiene su propia razón de existir. Uno no puede evitar sentirse asombrado cuando contempla los misterios de la eternidad, de la vida, de la maravillosa estructura de la realidad".*  
Albert Einstein.

# Capítulo VII

## ***Emulsiones como moldes para la síntesis de nanocápsulas de sílica<sup>†</sup>***

### **VII.1. Introducción**

Los enfoques basados en emulsiones han sido ampliamente estudiados para la encapsulación de moléculas. Actualmente, el principal requisito que deben cumplir los nanoportadores para el suministro de fármacos *in vivo* es que permitan el seguimiento del tratamiento terapéutico y que el suministro de la droga pueda ser controlado espacial y temporalmente. Estas características convergen en la síntesis de nanoportadores multifuncionales que integren propiedades de detección (biosensores), diagnóstico (biomarcadores/bioimagen) y transporte de genes, proteínas o fármacos con administración dirigida y su posterior liberación en respuesta a estímulos del medio<sup>189-192</sup>. Las emulsiones obtenidas por la simple estabilización con surfactantes no son capaces de satisfacer estos requerimientos. Esto impulsó el rápido progreso en la síntesis de nanomateriales de sílice mesoporosos formados en el interior (nanopartículas mesoporosas) o en la superficie (nanocápsulas) de partículas de emulsión, que les sirven de molde. Estos nanomateriales han adquirido una creciente atención en el área de la biomedicina porque presentan una gran área superficial específica, poros ajustables en volumen y estructura y la posibilidad de modificar su superficie con grupos funcionales, convirtiéndolos en sistemas con gran potencial para la administración de fármacos<sup>193-203</sup>.

---

<sup>†</sup> En este capítulo se presentan resultados de experimentos que surgieron a partir de una colaboración con la Prof. Dr. Katharina Landfester del "Max Planck Institute for Polymer Research" en Mainz, Alemania. Estos experimentos se realizaron en el marco de una Beca doctoral para estancias cortas de investigación del Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) por 4 meses en el año 2017. Mediante este proyecto amplíe mis conocimientos en química interfacial<sup>187-188</sup> y se iniciaron proyectos, que actualmente siguen en curso, adaptados al sistema líquido/líquido de esta tesis.

En comparación con las nanopartículas de sílice mesoporosas, las nanocápsulas de sílica (NCs) tienen la ventaja de que su cavidad interior ofrece una gran capacidad de carga para las moléculas y la cubierta puede diseñarse para tener una permeabilidad modificable para la liberación específica de su contenido<sup>204</sup>. Generalmente, las moléculas o las partículas que se desean encapsular se disuelven o dispersan primero en las gotitas líquidas de la emulsión que servirán de molde para la posterior formación de una cubierta de sílica. Una gran variedad de sustancias con diferentes tamaños y polaridades, tales como enzimas<sup>205-206</sup>, inhibidores de corrosión<sup>207-208</sup>, agentes de autoreparación<sup>209</sup>, agroquímicos<sup>210-211</sup>, agentes terapéuticos<sup>212-213</sup> y sondas fluorescentes<sup>212, 214</sup> se han encapsulados en NCs utilizando emulsiones de tipo O/W o W/O<sup>204</sup>. Dónde surfactantes catiónicos, tales como el bromuro y el cloruro de cetiltrimetilamonio, se utilizaron con frecuencia para confinar la formación de sílica en la interfase de las gotas de emulsión<sup>207-209</sup>.

Sin embargo, la mayoría de las síntesis existentes<sup>210, 215-216</sup> requieren de varios pasos sintéticos y a veces el diámetro de las cápsulas obtenido es de un tamaño que está fuera del rango de aplicabilidad para la administración de fármacos *in vivo* mediante administración intravenosa (< 500 nm)<sup>217</sup>. Como consecuencia, a pesar del progreso reciente en el diseño de nanocápsulas, todavía se necesita un enfoque versátil para su preparación que permita tener un control adecuado a nivel morfológico y molecular para aplicaciones biomédicas. Esto sería posible con una síntesis que permita controlar la estructura, el tamaño, la composición, la permeabilidad y la funcionalización de la superficie de la cápsula en la menor cantidad de pasos sintéticos.

En este contexto, se desarrolló un enfoque de un solo paso sintético para la preparación de NCs funcionales. Éstas se sintetizaron mediante un proceso sol-gel confinado en la interfase de una partícula de miniemulsión del tipo O/W. Mediante esta síntesis, se logró un control a nivel morfológico y molecular de las NCs con las características necesarias que permitieron la encapsulación y la liberación del fármaco utilizado como modelo, Dexametasona (DXM).

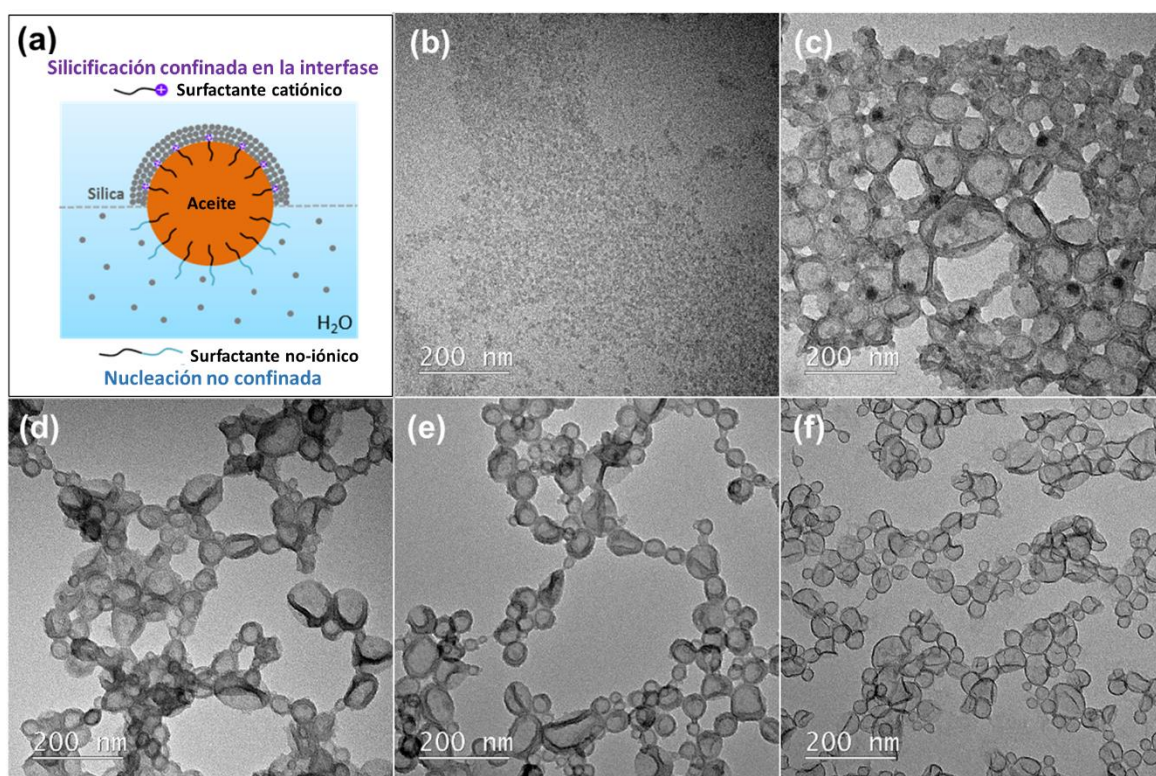
## VII.2. Resultados y Discusión

Brevemente, las nanocápsulas de sílica (NCs) se sintetizaron mediante un proceso sol-gel confinado en la interfase agua-aceite de las gotas de una nanoemulsión del tipo O/W. La fase oleosa (hidrofóbica) de las nanogotas consistió en una mezcla de precursores de sílice (TEOS, TESPT y TESP), de un coestabilizador (hexadecano), de un disolvente orgánico (cloroformo o aceite de oliva) y en algunos casos del fármaco dexametasona. Esta mezcla hidrofóbica se agregó a una solución acuosa de un tensioactivo (CTMA-Cl) y mediante el proceso de ultrasonificación se formó la nanoemulsión (ver Capítulo II, Sección II.2.5). Inicialmente se estudió como optimizar el proceso de síntesis para obtener nanocápsulas adecuadas en tamaño y estabilidad (Sección VII.2.1 y VII.2.2). Lo que fue de utilidad para seleccionar luego el sistema más conveniente para encapsular el agente terapéutico deseado (Sección VII.2.3 y VII.2.4). Adicionalmente, se describen resultados obtenidos en el laboratorio argentino para la formulación de emulsiones y síntesis de nanocápsulas con un nuevo protocolo que incluye el uso de VAS como fase hidrofóbica y del tensioactivo CTAB (Sección VII.2.5).

### VII.2.1. *Control estructural de la polimerización activada por interfase*

Se utilizó un sistema modelo compuesto por cloroformo como fase hidrofóbica, y una solución acuosa del tensioactivo cloruro de cetiltrimetilamonio (CTMA-Cl) o Lutensol AT50. En esta primera instancia se investigó como el surfactante catiónico o no iónico influyen en el proceso de polimerización activado por interfase. El CTMA-Cl se utilizó como tensioactivo catiónico para estabilizar las gotas de miniemulsión y evitar su coalescencia. Además, su segunda función es ser un agente que pueda utilizarse como molde para limitar la condensación de los precursores hidrolizados de sílica en la interfase aceite/agua, lo cual es posible mediante el autoensamblaje cooperativo de las especies de sílica cargadas negativamente y del tensioactivo catiónico, evitando así la nucleación secundaria de silicatos en la fase continua<sup>204</sup> (ver Figura 43a). Esta interacción electrostática resulta de la disociación de los grupos silanol al pH experimental (4-5), que está por encima del punto isoelectrico del silicato (~ pH 2-3)<sup>218</sup>.

Para demostrar el efecto generado cuando se utiliza el surfactante CTMA-Cl como molde, se usó el tensioactivo no iónico Lutensol AT50 para reemplazar total o parcialmente el CTMA-Cl (Tabla 8). Cuando el tensioactivo no iónico se utilizó puro sin CTMA-Cl, no se observaron nanocápsulas mediante TEM, sólo se observaron pequeñas nanopartículas (Figura 43b), lo que indica la presencia de nucleación no controlada de silicatos en la fase continua (Figura 43a). Sin embargo, las dispersiones fueron estables cuando se utilizó una cantidad de CTMA-Cl  $\geq 25\%$ , obteniendo nanocápsulas que se visualizaron claramente mediante TEM como se muestra en la Figura 43c-f.



**Figura 43. Influencia del tipo de surfactante en la formación de nanocápsulas de sílica.**

a) Esquema ilustrativo del proceso de silicificación confinada en la interfase cuando se utiliza un surfactante catiónico como el CTMA-Cl (mitad superior) o cuando se utiliza un surfactante no iónico como el Lutensol AT50 (mitad inferior). b–f) Imágenes de nanocápsulas obtenidas por TEM cuando son estabilizadas por mezclas de CTMA-Cl y Lutensol AT50 con una relación molar  $n_{\text{CTMA-Cl}}:n_{\text{Lutensol}}$  de: b) 0:1 (muestra SJP120a), c) 1:22,7 (muestra SJP120b), d) 1:7,6 (muestra SJP120c), e) 1:2,5 (muestra SJP120d), y f) 1:0 (muestra SJP120f). Figura adaptada de la ref. 187.

Además, se registró mediante DLS que el diámetro hidrodinámico de las nanocápsulas ( $D_h$ ) fue menor a medida que se incrementó la cantidad de CTMA-Cl (Tabla 8), lo cual se atribuye a la mayor eficiencia estabilizadora que generalmente presentan los tensioactivos catiónicos de bajo peso molecular en comparación con los tensioactivos no iónicos<sup>219</sup>.

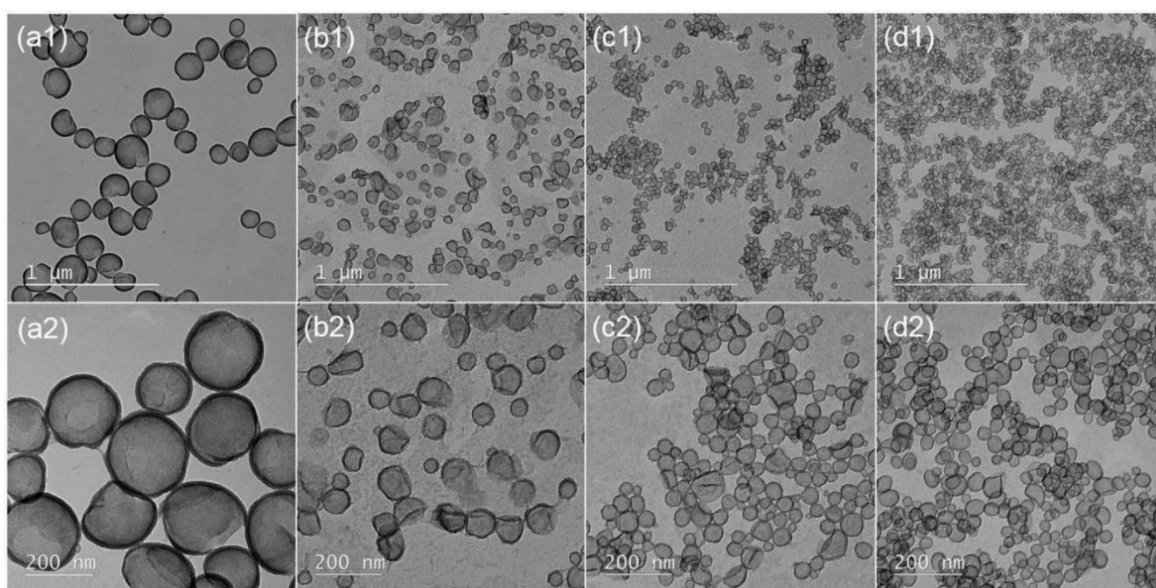
**Tabla 8. Estabilidad coloidal, diámetros hidrodinámicos ( $D_h$ ) e índice de polidispersidad (PDI) de NCs preparadas con diversas cantidades molares de tensioactivos CTMA-Cl y Lutensol AT50.**

Muestra	$m_{CTMA-Cl}/m_{Lutensol}$	$n_{CTMA-Cl}:n_{Lutensol}$	Estabilidad coloidal	$D_h$ (nm)	PDI
SJP120a	0 mg/300 mg	Lutensol puro	Precipitación después de 24 h	-	-
SJP120b	1,6 mg/270 mg	1:22,7	Gelación después de 24 h	-	-
SJP120c	3,9 mg/225 mg	1:7,6	Estable	151	0,136
SJP120d	7,8 mg/150 mg	1:2,5	Estable	137	0,186
SJP120e	15,5 mg/0 mg	CTMA-Cl puro	Estable	100	0,216

### VII.2.2. Influencia de la relación fase hidrofóbica/agua en el diámetro de las nanocápsulas (NCs)

Es importante destacar que el tamaño de los nanoportadores en la administración de fármacos influye en su farmacocinética *in vivo*, modificando parámetros como la captación celular, la biodistribución y la vida media de circulación<sup>220</sup>. En la polimerización dentro de una miniemulsión, el tamaño de partícula se puede variar en un amplio rango principalmente cambiando el tipo y la cantidad de tensioactivo. Otros factores, como la relación de volumen de la fase dispersa a la fase continua, el aporte de energía y la concentración de electrolitos de la fase acuosa también pueden desempeñar un papel importante en el tamaño de partícula<sup>219</sup>. Además, para obtener nanocápsulas con una distribución de tamaño homogénea, un agente osmótico que actúe como coestabilizador es útil para impedir la maduración de Ostwald y, por tanto, la inestabilidad de la emulsión. Debido a su muy baja solubilidad en agua, en el presente trabajo se utilizó hexadecano como coestabilizador<sup>221</sup> y se adicionó a la fase hidrofóbica utilizada (cloroformo).

Se sintetizaron NCs con un diámetro hidrodinámico promedio ajustable de 60 nm a 400 nm. El tamaño se controló variando la relación de volumen de fase hidrofóbica /agua mientras que los otros parámetros que se mantuvieron constantes (ver Tabla 9). A medida que la relación de volumen de fase hidrofóbica/agua disminuyó del 40, 20, 10 al 5%, los diámetros hidrodinámicos promedio correspondientes disminuyeron de 395, 147, 103 a 59 nm, respectivamente. Todas las nanocápsulas se observaron por TEM y exhibieron estructuras bien definidas (ver Figura 44).



**Figura 44. Micrografías TEM de nanocápsulas con distintos diámetros hidrodinámicos obtenidos al modificar la relación de volumen fase hidrofóbica/agua.**

a)  $D_h = 395$  nm,  $d$  (espesor)  $\approx 17 \pm 4$  nm,  $V_{\text{hidrofóbico}}/V_{\text{agua}} = 40\%$  (muestra SJP45-0), b)  $D_h = 147$  nm,  $d \approx 8 \pm 2$  nm,  $V_{\text{hidrofóbico}}/V_{\text{agua}} = 20\%$  (muestra SJP45-1), c)  $D_h = 103$  nm,  $d \approx 5 \pm 2$  nm,  $V_{\text{hidrofóbico}}/V_{\text{agua}} = 10\%$  (muestra SJP45-2), y d)  $D_h = 59$  nm,  $d \approx 4 \pm 2$  nm,  $V_{\text{hidrofóbico}}/V_{\text{agua}} = 5\%$  (muestra SJP45-3). Figura adaptada de la ref. 187.

El grosor de las NCs puede variar al aumentar la concentración de alcoxisilano en la fase dispersa y/o controlando la relación entre la fase hidrofóbica y el agua. En los experimentos realizados sólo se modificó este último parámetro. La concentración del precursor de sílica TEOS se mantuvo constante en todas las dispersiones, considerando el volumen final de la emulsión (20 mL), la concentración de surfactante y la relación de volumen de fase hidrofóbica/agua. El espesor correspondiente de cada cápsula ( $d$ ) se detalla en la Tabla 9, donde puede observarse que a medida que el diámetro hidrodinámico de la nanocápsula disminuye de 395 a 59 nm su espesor también disminuye de 17 a  $\approx 4$  nm.

**Tabla 9. Espesor ( $d$ ) y diámetros hidrodinámicos ( $D_h$ ) de NCs preparadas con distintas proporciones de aceite/agua.**

Muestra	[CTMA-Cl] en la fase acuosa	Volumen de fase hidrofóbica (mL)	Volumen de fase acuosa (mL)	Relación <sup>a</sup> $V_{\text{hidrofóbico}}/V_{\text{agua}}$	$D_h - \text{PDI}$ <sup>b</sup> (nm)	$d$ (nm) <sup>c</sup>
SJP45-0	0,8 g/L	8	20	40%	395 – 0,59	17 ± 4
SJP45-1		4	20	20%	147 – 0,44	8 ± 2
SJP45-2		2	20	10%	103 – 0,47	5 ± 2
SJP45-3		1	20	5%	59 – 0,42	4 ± 2

<sup>a</sup>] Para facilitar la lectura, la relación de volumen de la fase hidrofóbica (cloroformo)/agua se denota en la tabla como  $V_{\text{hidrofóbico}}/V_{\text{agua}}$ . <sup>b</sup>] Los datos del diámetro hidrodinámico ( $D_h$ ) y del índice de polidispersidad (PDI) de las cápsulas se obtuvieron por mediciones de DLS. <sup>c</sup>] Para determinar el espesor de las nanocápsulas ( $d$ ) se midieron al menos tres imágenes calibradas utilizando software Fiji.



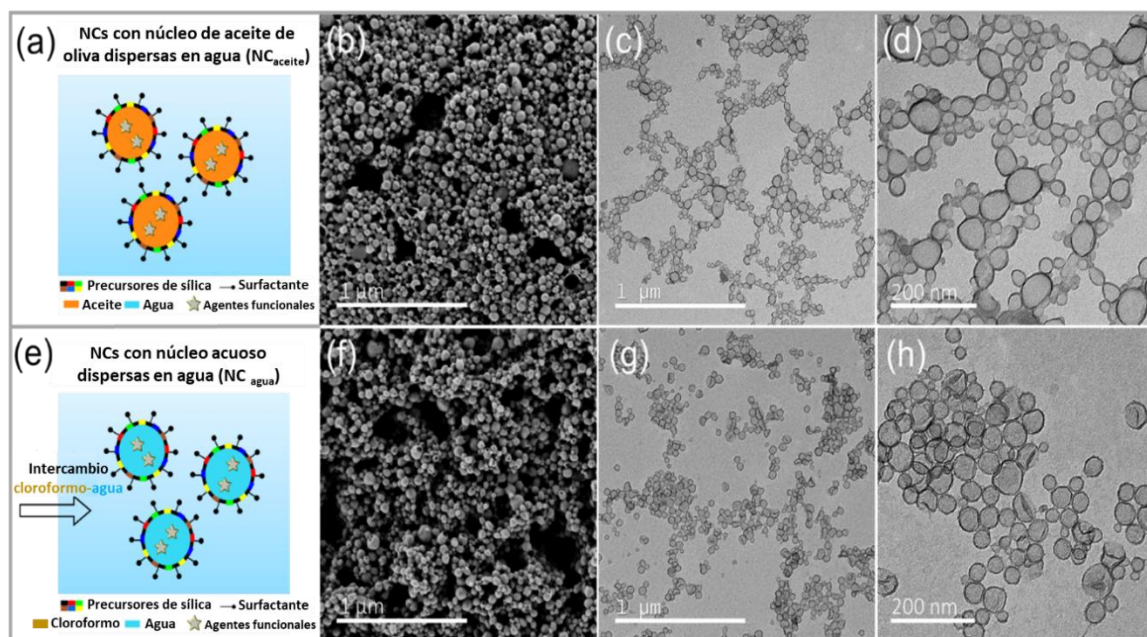
### **VII.2.3. Selección de nanocápsulas con interés en aplicaciones biomédicas**

Con el fin de generalizar la formación de nanocápsulas para la carga efectiva de distintas moléculas, en el presente estudio, se escogió el aceite de oliva como un solvente biocompatible representativo y el cloroformo como un solvente de bajo punto de ebullición para formar el núcleo de las nanocápsulas (ver Figura 45 a y e). En el último caso, el cloroformo se puede evaporar después de la formación de las nanocápsulas por difusión a través de la fase acuosa continua<sup>222</sup>, llenando así de agua la cavidad interior de las NCs. Por lo tanto, se llevó a cabo un proceso de intercambio cloroformo-agua en el núcleo de la partícula.

Las dispersiones acuosas de nanocápsulas llenas de agua se obtuvieron directamente en un proceso de un paso (en un recipiente, por su denominación del inglés como “*one pot*”), lo que es muy ventajoso respecto a los métodos de síntesis existentes para este tipo de nanocápsulas. Por lo general, la síntesis de dispersiones acuosas de nanocápsulas con un núcleo acuoso requieren de dos pasos: (i) la formación de cápsulas en miniemulsiones inversas (agua en aceite), y (ii) la posterior transferencia a un medio acuoso con la estabilización adicional de un tensioactivo que presente un valor alto de HLB (balance hidrofílico-lipofílico). Para que luego, el disolvente orgánico sea evaporado<sup>223-224</sup>.

Las nanocápsulas preparadas a partir de aceite de oliva y cloroformo (con posterior evaporación del solvente) se denotan como NC<sub>aceite</sub> y NC<sub>agua</sub>, respectivamente. La evaporación del cloroformo se evidenció por la desaparición de su señal característica a 7,26 ppm en espectros de <sup>1</sup>H-RMN después de 12 h (ver Figura A. 4).

Como se muestra en la Figura 45, se identificó mediante TEM una morfología adecuada y bien definida de las NCs, lo que indica una condensación exitosa de los alcoxisilanos alrededor de las gotitas de miniemulsión. Los diámetros promedio determinados por microscopía electrónica de barrido (SEM) fueron  $34 \pm 23$  nm para NC<sub>aceite</sub> y  $58 \pm 28$  nm para NC<sub>agua</sub>. Además, se determinó a partir de las micrografías TEM el espesor promedio de las cápsulas, el cual fue de  $4,5 \pm 1,8$  nm y  $4,4 \pm 1,9$  nm, respectivamente.



**Figura 45. Microscopía SEM y TEM de las nanocápsulas obtenidas.**

Esquema ilustrativo y micrografías de SEM y TEM para las  $NC_{aceite}$  (a-d) y para las  $NC_{agua}$  después del proceso de intercambio cloroformo-agua (e-h). Figura adaptada de la ref. 187.

#### VII.2.4. Liberación controlada de Dexametasona

La liberación sitio-específica de moléculas con acción terapéutica es un requisito principal para la administración *in vivo* de un fármaco mediado por nanoportadores. La liberación controlada del fármaco puede lograrse preparando cápsulas cuya permeabilidad cambie en respuesta a las condiciones locales de los tejidos diana. En el presente trabajo se muestra que las nanocápsulas pueden diseñarse para liberar selectivamente el fármaco dexametasona (DXM) en respuesta a la presencia del tripéptido L-Glutatión (GSH) mediante una reacción redox.

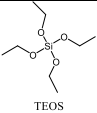
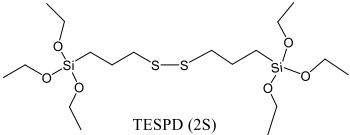
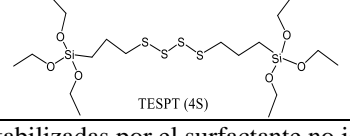
La DXM es un glucocorticoide hidrofóbico que se utiliza para modular la respuesta inflamatoria de los macrófagos hepáticos. La administración sistémica de glucocorticoides se asocia con efectos secundarios graves, como hiperglucemia, hipertensión y hemorragia intestinal<sup>225</sup>, por lo tanto, realizar una formulación con DXM para su administración intracelular y liberación sitio-específica es de gran importancia. La estrategia de utilizar una plataforma de nanoportadores sensibles al L-Glutatión se fundamenta en el hecho de que compartimentos intracelulares como el citosol, la mitocondria y el núcleo celular contienen una concentración de L-Glutatión de aproximadamente 2-10 mM, mientras que la

concentración en los fluidos extracelulares es significativamente menor (aproximadamente 2-20  $\mu\text{M}$ )<sup>226</sup>, permitiendo la liberación de la droga sólo en el interior celular donde la concentración de GSH es lo suficientemente alta. Debido a esto, esta estrategia puede ser prometedora para la administración también de otras drogas que ejerzan su acción terapéutica en el interior celular.

Para este propósito, se incluyeron enlaces disulfuro (2S) o tetrasulfuro (4S) en las cápsulas de sílica seleccionadas anteriormente (Sección VII.2.3) por medio del uso de precursores alcoxisilanos con estos grupos funcionales. Las nanocápsulas resultantes se denotan como NC-2S o NC-4S, respectivamente. Con el fin de determinar la cantidad de puentes siloxano, grupos silanol y enlaces de disulfuro y tetrasulfuro incorporados en la cubierta de sílica, las nanocápsulas NC-2S / 4S se midieron mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de estado sólido <sup>29</sup>Si-MAS-RMN y <sup>13</sup>C-CP-MAS-RMN, cuyo análisis se explica en el Anexo, Sección A.5.

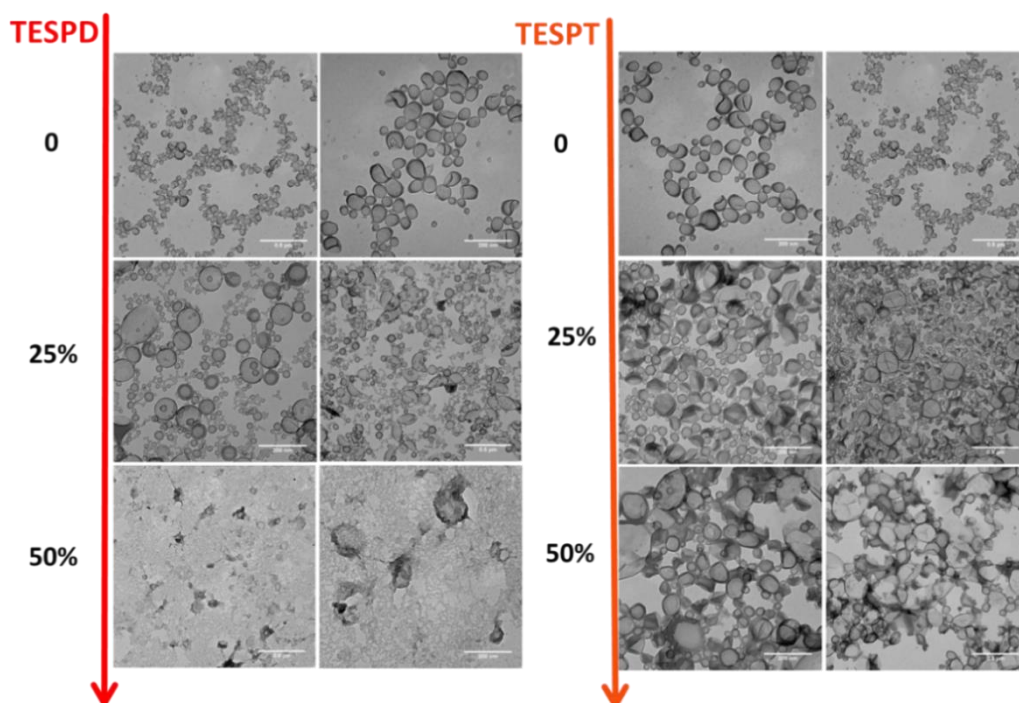
Para el éxito en la aplicación *in vivo* de nanoportadores como vehículos de administración de fármacos, los mismos necesitan permanecer coloidalmente estable en el plasma sanguíneo. Se sabe que las cadenas de PEG unidas a una superficie aumentan la vida media en la circulación sanguínea de los nanoportadores al reducir las interacciones inespecíficas con proteínas<sup>227-228</sup>. Debido a esto, las nanocápsulas fueron cubiertas con grupos PEG (polietilenglicol) mediante el intercambio del surfactante inicial CTMA-Cl por el surfactante no iónico Lutensol AT50<sup>188</sup>. En la Tabla 10 se muestran los datos obtenidos mediante DLS y potencial zeta, así como los valores calculados para la eficiencia de encapsulación de DXM para las nanocápsulas después de incorporar los alcoxisilanos funcionales. Como todas las nanocápsulas se estabilizaron con el tensioactivo no iónico Lutensol AT50 sus cargas superficiales se encuentran cercanas a cero. A modo comparativo, las nanocápsulas estabilizadas por el tensioactivo catiónico CTMA-Cl se encontraban cargadas positivamente (por ejemplo, el potencial zeta fue de +12 mV para NC<sub>aceite</sub>).

**Tabla 10. Diámetros hidrodinámicos ( $D_h$ ), potencial zeta ( $\zeta$ ) y eficiencia de encapsulación (EE) de DXM de las nanocápsulas obtenidas.**

Muestra	Precusores de sílica	$D_h$ (nm)	$\zeta^a$ (mV)	EE (%)
NC <sub>aceite</sub>		179 ± 53	-2 ± 1	38
NC <sub>agua</sub>	TEOS	115 ± 55	-1 ± 1	39
NC <sub>aceite</sub> -2S-25%		157 ± 54	-1 ± 1	58
NC <sub>aceite</sub> -2S-50%		169 ± 22	2 ± 1	60
NC <sub>agua</sub> -2S-25%		193 ± 38	-2 ± 1	45
NC <sub>agua</sub> -2S-50%	TESPD (2S)	223 ± 118	-2 ± 1	-
NC <sub>aceite</sub> -4S-25%		175 ± 74	1 ± 1	25
NC <sub>agua</sub> -4S-25%		210 ± 65	-4 ± 1	36
NC <sub>agua</sub> -4S-25%		TESPT (4S)		

<sup>a</sup> Potencial zeta de las NCs estabilizadas por el surfactante no iónico Lutensol AT50.

Además, es importante destacar que las nanocápsulas sintetizadas con cloroformo como disolvente (NC<sub>agua</sub>) fueron uniformes cuando se utilizó TEOS como único precursor de silicato (Figura 45f-h). El tamaño y la polidispersidad de las NC<sub>agua</sub> aumentó a medida que el contenido de alcoxisilanos funcionales TESPD y TESPT incrementó de 0 a 50% (ver Figura 46). Por este motivo, se seleccionaron para los ensayos de liberación solo las NC<sub>agua</sub> con una proporción del 25% de puentes 2S o 4S, cuya morfología fue uniforme.


**Figura 46. Efecto de la proporción de enlaces disulfuro o tetrasulfuro en la morfología de las nanocápsulas con interior acuoso.**

Micrografías TEM de las NC<sub>agua</sub>-2S 0%, 25%, y 50% (ver panel izquierdo) y de las NC<sub>agua</sub>-4S-0%, 25%, y 50% (ver panel derecho). TESPD (precursor de puentes disulfuro, 2S) y TESPT (precursor de puentes tetrasulfuro, 4S).

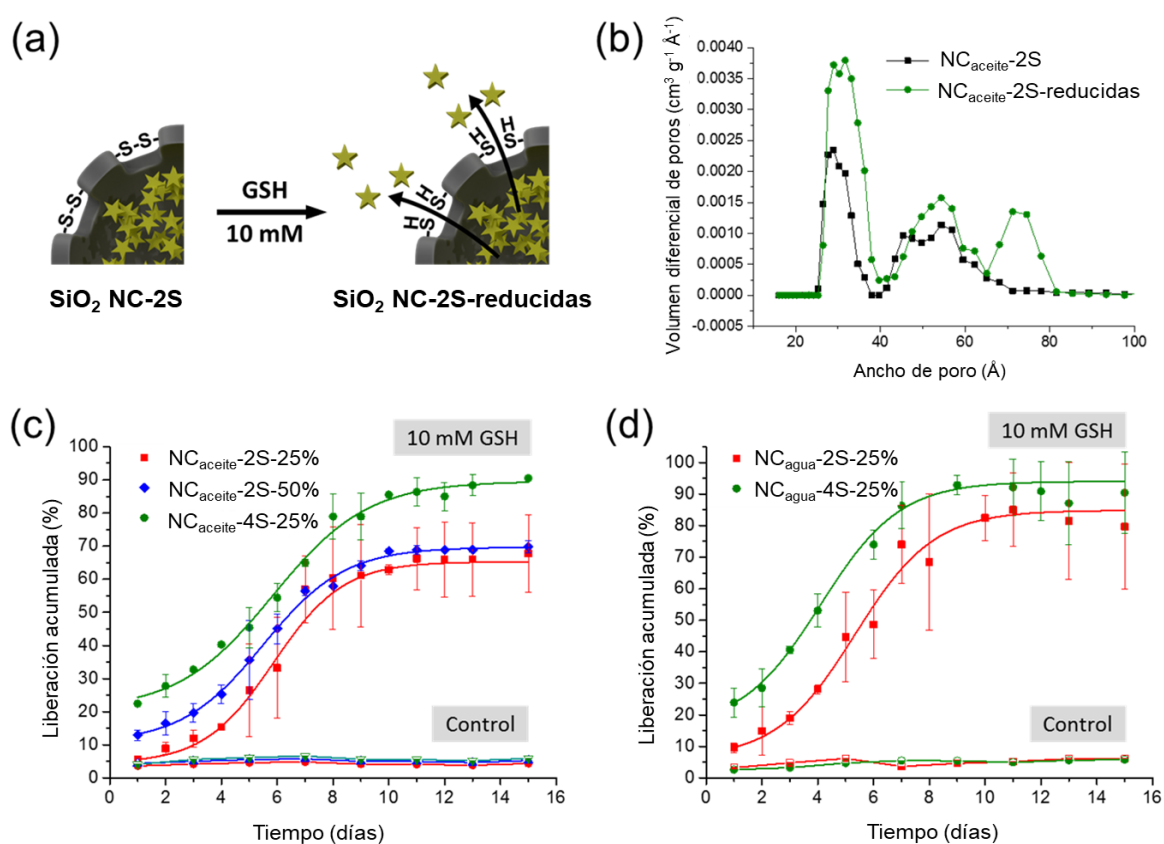
La liberación *in vitro* de DXM en respuesta a la presencia de GSH se estudió incubando las nanocápsulas en un medio acuoso con una concentración 10 mM de GSH, la cual se usa comúnmente para imitar el microambiente intracelular reductor<sup>229-231</sup>. Luego, la concentración de DXM se midió por espectroscopía UV-Vis en el rango de 200 – 300 nm ( $\lambda_{\text{max}} = 243$  nm) durante 16 días como se detalla en el Capítulo II, Sección II.2.5.2.2. El esquema del mecanismo de liberación sensible a GSH se muestra en la Figura 47a.

Cabe destacar que en la literatura se han descrito diferentes métodos para medir las formas de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) en plantas, en plasma/suero de animales o seres humanos, etc<sup>232-234</sup>. Estos métodos se basan en pruebas ELISA utilizando kits disponibles comercialmente o en su separación por HPLC con detección de fluorescencia o UV-Vis<sup>235-237</sup>. La determinación de estas especies por fluorescencia o por espectroscopía UV-Vis, generalmente proporcionan una alta sensibilidad, pero presentan el inconveniente de requerir una etapa de derivatización para formar compuestos fluorescentes o que presenten un grupo cromóforo que sea detectable por UV-Vis. La falta de un buen cromóforo UV-Vis o un grupo fluoróforo nativos hace que la medición directa de GSH-GSSG no sea posible. Esto es una ventaja en los experimentos realizados, ya que no hay detección de un pico de absorbancia de estos compuestos en el rango de 200 – 300 nm que pueda interferir con la detección de la DXM a la longitud de onda utilizada<sup>238</sup>.

Las dispersiones de NCs se incubaron en ausencia de GSH para los experimentos de control. Como se muestra en la Figura 47c, se liberó menos del 5% de DXM en 15 días para todos los controles de las NC<sub>aceite</sub>-2S / 4S. En presencia de 10 mM GSH en el medio de incubación, la liberación de DXM para las NC<sub>aceite</sub>-2S-25% se aceleró drásticamente debido a la escisión de los enlaces disulfuro, lo que condujo a un aumento de la permeabilidad de la cubierta de sílica<sup>239</sup>. Tanto el aumento del contenido de enlaces disulfuro como el reemplazo de enlaces disulfuro por enlaces tetrasulfuro incrementaron aún más la cantidad liberada de DXM en el equilibrio (Figura 47c). No se observaron diferencias significativas para los perfiles de liberación de nanocápsulas con núcleos de aceite de oliva o de agua (Figura 47c-d). Además, los perfiles de liberación mostraron una forma sigmoideal, lo que implica probablemente la presencia de dos procesos de difusión en el sistema. En primer lugar, se requiere que las moléculas de GSH difundan a través de la cubierta de sílice y rompan los enlaces disulfuro. Por lo tanto, en la etapa inicial se observa una liberación relativamente lenta. Sin embargo, a medida que aumenta la escisión de los puentes disulfuro, se observa

que la liberación se acelera debido al incremento de la permeabilidad de la cubierta de sílica. Lo que se ve reflejado, en un proceso de liberación sostenida de hasta más de diez días.

El cambio en la permeabilidad de la cubierta de sílica durante el proceso de liberación se investigó mediante experimentos de adsorción-desorción de nitrógeno. En la Figura 47b puede observarse cómo la distribución de los tamaños de poros para las  $NC_{aceite-2S}$  cambió a valores mayores luego de la incubación. Además, se observa la aparición de un nuevo pico correspondiente a poros con tamaños  $\sim 7-8$  nm de ancho para las nanocápsulas reducidas. El aumento en la porosidad de la cubierta de sílica después de la reducción es consistente con los perfiles de liberación de DXM en respuesta a GSH.



**Figura 47. Análisis de la liberación de DXM desde las nanocápsulas de sílica.**

(a) Esquema ilustrativo de la liberación de DXM desde nanocápsulas de sílica con puentes disulfuro ( $SiO_2NCs-2S$ ) sensibles a estímulos redox en presencia de GSH como agente reductor. (b) Distribución del tamaño de poro de  $NCs-2S$  antes y después de la reducción por GSH medidos mediante la técnica de BET. Perfiles de liberación de DXM desde (c)  $NC_{aceite}$  y desde (d)  $NC_{agua}$  que contienen distintas proporciones de enlaces disulfuro o tetrasulfuro. Los símbolos sin rellenar y con relleno sólido corresponden a las muestras incubadas sin (control) y con GSH 10 mM en el medio, respectivamente. Figura adaptada de la ref. 187.

### **VII.2.5. Síntesis de Nanocápsulas en Argentina**

A partir de la experiencia adquirida durante la estancia de investigación en Alemania, se intentó establecer nuevos protocolos para la formulación de emulsiones y síntesis de nanocápsulas en nuestro laboratorio perteneciente al Área de Bioquímica y Biofísica molecular del IIBYT. Con este fin, se buscó utilizar y optimizar los recursos disponibles para realizar esta técnica y a su vez, relacionarla con el sistema líquido/líquido de interés en esta tesis. Aunque sólo se pudieron realizar algunos avances, estos experimentos iniciaron el camino para la elaboración de nuevos proyectos que aún siguen en curso.

Para realizar las nanocápsulas se utilizó Vaselina o Cloroformo (con posterior evaporación de este solvente) como núcleos hidrofóbicos, denotados como  $NC_{VAS}$  y  $NC_{agua}$  respectivamente. Además, se utilizó bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) como tensioactivo.

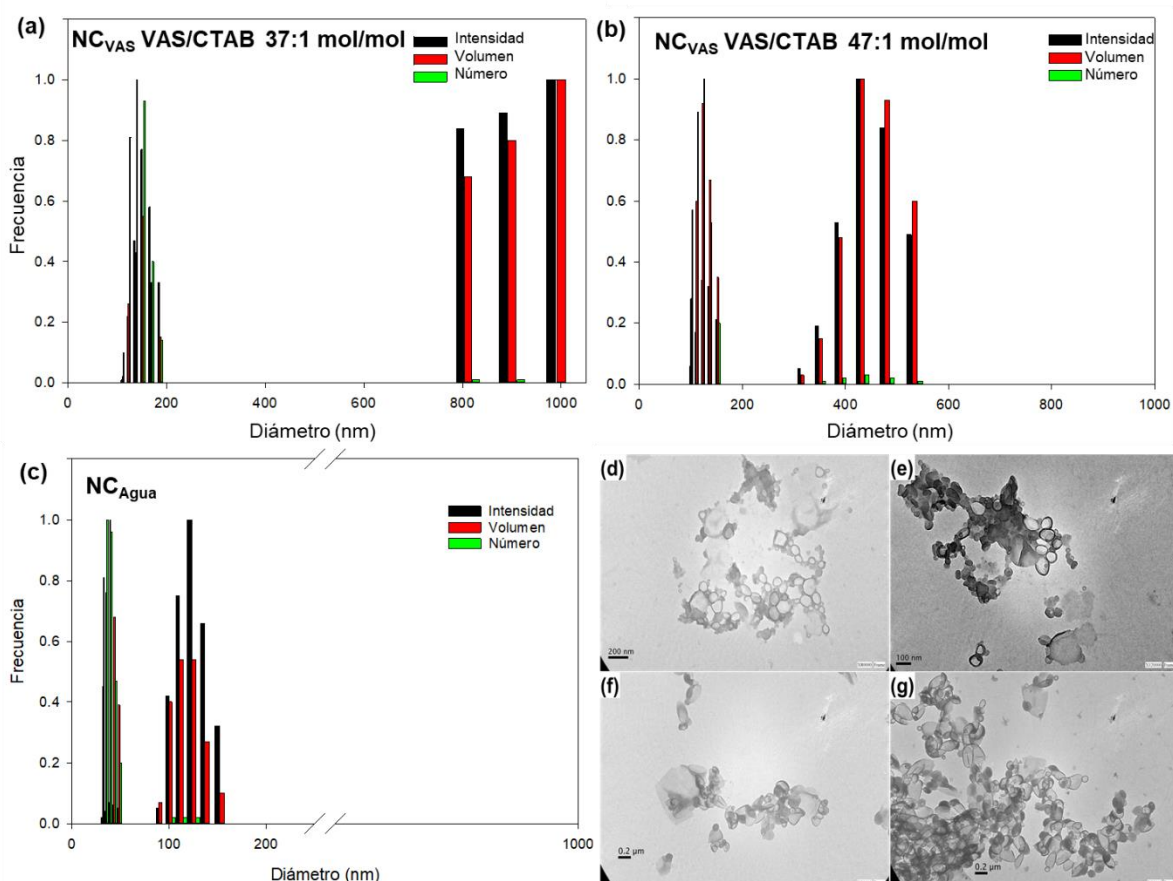
Inicialmente se realizaron experimentos piloto para ajustar los parámetros técnicos relacionados con la metodología experimental según los equipos disponibles. Principalmente, se realizaron ajustes respecto al protocolo original en cuanto a la duración de los pulsos, pausas y potencia de la ultrasonificación. Además, para las bases de agitación se evaluó que la velocidad fuera suficiente y constante para obtener emulsiones estables y luego nanocápsulas de tamaño y morfología adecuada.

En este proceso, se evaluaron dos relaciones molares distintas de aceite y surfactante, VAS/CTAB, de 47:1 y 37:1 mol/mol para la obtención de nanocápsulas de sílica. Estas relaciones molares se seleccionaron como punto de partida y de manera tentativa a partir de las relaciones molares de aceite de oliva/CTMA-Cl que permitían la obtención de emulsiones estables y evaluadas en los experimentos previos (Sección VII.2.3). Los resultados obtenidos por DLS para la relación molar 37:1 (ver Figura 48a) indican la presencia de dos poblaciones con tamaños promedio de partículas muy distintos entre sí, puede observarse una población con diámetros de  $\sim 150$  nm y otra de mayor tamaño con  $D_h > 800$  nm. Esto podría significar que el proceso de emulsificación fue ineficiente y que la formación de las gotas no fue homogénea o que la emulsión incurrió en procesos de inestabilidad como maduración de Ostwald, floculación o coalescencia en el transcurso de

las primeras horas posteriores al paso final de ultrasonificación, afectando de esta manera el proceso de polimerización de la sílica.

Por el contrario, cuando la cantidad de VAS se incrementó en una relación molar VAS/CTAB de 47:1, el diámetro promedio de las nanocápsulas obtenidas mejoró notablemente (ver Figura 48b). Aunque se observa la presencia de dos poblaciones diferentes, los tamaños obtenidos son más cercanos a los esperados, una población de ~ 150 nm y otra de ~400 - 500 nm.

Finalmente, como control del protocolo se utilizó la síntesis de las NC<sub>Agua</sub> a partir de la formulación de una nanoemulsión conocida, estable y caracterizada anteriormente en la Sección VII.2.3 y se midió su distribución de tamaños como se exhibe en la Figura 48c. Los diámetros de las partículas obtenidas se encuentran dentro del tamaño deseado, aunque, nuevamente se evidenció la presencia de dos poblaciones, una de ellas con un  $D_h \sim 50$  nm y



**Figura 48.** Análisis mediante DLS y microscopía TEM de NC<sub>VAS</sub> y NC<sub>Agua</sub>.

Distribución poblacional del diámetro de nanocápsulas obtenidas para: NC<sub>VAS</sub> con una relación molar VAS/CTAB de (a) 37:1 mol/mol; (b) 47:1 mol/mol y (c) NC<sub>Agua</sub> como muestra control. Se muestran las micrografías TEM de las nanocápsulas obtenidas para (d – e) NC<sub>VAS</sub> y (f – g) NC<sub>Agua</sub>.



otra de ~ 150 nm. Sin embargo, es importante destacar que la población de partículas de mayor volumen se encuentra presente en un número muy pequeño comparado con la población de menor tamaño.

Teniendo en cuenta la información obtenida por DLS se realizó una caracterización mediante microscopía TEM para las muestras de NC<sub>VAS</sub> (relación VAS/CTAB = 47:1) y de NC<sub>Agua</sub>. Como puede observarse en la Figura 48d-g, en ambos casos las nanocápsulas se encontraron formadas y en general con una buena morfología; las imágenes se condicen con los resultados de DLS ya que se aprecian algunas variaciones y diferencias en su tamaño dentro de una misma muestra. Por otra parte, debe considerarse que la presencia de zonas con mayor intensidad de gris y que podrían asociarse con un estado de agregación de la muestra deben desestimarse, ya que el proceso de secado de la muestra llevado a cabo durante la preparación en la grilla de TEM es un factor que influye en la observación de este tipo de fenómenos.

Finalmente, es importante destacar, que en estas muestras la presencia del tensioactivo catiónico CTAB estabilizó adecuadamente las gotas de nanoemulsión contra la coalescencia, y sirvió como plantilla para controlar la hidrólisis y la condensación del precursor de sílica exclusivamente en la interfase, evitando su nucleación fuera de las gotas, lo cual se verifica en las imágenes de TEM donde no se observa la presencia de nanopartículas de sílica.

### VII.3. Conclusiones

En la primer parte de este capítulo se demostró un nuevo enfoque para llevar a cabo una síntesis versátil en un solo paso de nanocápsulas de sílica para aplicaciones biomédicas, el mismo consiste en un proceso sol-gel confinado en la interfase de las gotas de una nanoemulsión O/W. Los resultados obtenidos fueron prometedores y destacaron algunas de las ventajas que tiene esta síntesis:

(i) Las nanocápsulas podrían formarse con diversos líquidos hidrofóbicos para encapsular moléculas con diferente solubilidad.

(ii) Los solventes con bajo punto de ebullición pueden evaporarse para convertir la cavidad interior en un ambiente acuoso.

(iii) Los diámetros hidrodinámicos de las nanocápsulas pueden controlarse entre 60 nm y 400 nm.

(iv) Al introducir enlaces disulfuro o tetrasulfuro en la cápsula, las NCs pueden convertirse en interesantes plataformas para la liberación específica y sostenida en respuesta a la presencia de GSH para determinados fármacos que actúen a nivel intracelular.

Por otra parte, al tratar de aplicar el protocolo de síntesis a nuestro laboratorio en Argentina se tuvieron que afrontar diversos problemas. Entre ellos, el más importante es que los resultados obtenidos por DLS muestran la aparición de dos poblaciones de nanocápsulas, incluso para la muestra control. Esto podría indicar que el protocolo de preparación de las nanocápsulas aún no es adecuado y que se favorece de algún modo un proceso de emulsificación que conduce a la formación de gotas con diámetros no uniformes. No obstante, esto no es un obstáculo que no pueda ser superado a corto plazo ya que probablemente, este efecto se deba a diversas causas relacionadas directamente con la metodología experimental utilizada. Por ejemplo, que la potencia o la duración de los pulsos durante la ultrasonificación no sean suficientes y/o que la velocidad de agitación no sea apropiada o constante durante todo el proceso debido a la precisión del agitador.

Además, si se consideran los resultados obtenidos en el Capítulo VI, Sección VI.2.2 para emulsiones VAS:DPPC y se comparan con las nanocápsulas sintetizadas a partir de emulsiones VAS:CTAB para relaciones molares similares (por ejemplo, 47:1), podría inferirse que la eficiencia de la DPPC como emulsionante, cuando la fase oleosa es VAS, es mayor que para el surfactante CTAB. En particular, esto se ve reflejado en una distribución poblacional de tamaños más uniformes, donde las emulsiones DPPC:VAS presentan en promedio un rango de variación de tamaños continuo que permite la observación de un solo pico poblacional. Estos resultados son consistentes con los hallazgos realizados en el Capítulo V para monocapas de DPPC y que principalmente destacan la capacidad de las moléculas del fosfolípido para estabilizar las gotas de VAS en la interfase agua/vaselina.

En general, los resultados obtenidos aún no son suficientes para optimizar la preparación de las NCs utilizando el sistema de interés de la presente tesis, pero aportan valiosa información para continuar a tiempo futuro realizando experimentos y ajustes en el protocolo de síntesis hasta obtener resultados satisfactorios.

*“Llena tus ojos de ilusión. Ve al mundo. Es más fantástico que cualquier sueño real o imaginario. No pidas garantías, no pidas seguridad. Nunca ha existido algo así”.*  
Ray Bradbury (*Fahrenheit 451*).

## **Capítulo VIII**

### ***Conclusiones generales***

En cualquier disciplina científica para llevar a cabo un análisis riguroso que sea representativo de un determinado sistema, es necesario contar con modelos que brinden una versión simplificada de la realidad dónde puedan controlarse la mayor cantidad de variables posibles para así obtener resultados fehacientes y significativos. En el área de la Biofísica, para estudiar procesos que ocurren en las membranas biológicas desde una perspectiva biofísico-química, se utilizan modelos experimentales como las monocapas de Langmuir, vesículas multilamelares o unilamelares así como monocapas soportadas sobre sólidos, entre otros. Estos modelos permiten, por ejemplo, estudiar propiedades moleculares, interacciones intermoleculares y las características reológicas y electrostáticas de las membranas, evaluar interacciones membrana-proteína o determinar cómo la presencia y penetración de un fármaco puede afectar sus propiedades mecánicas.

A pesar de que se cuenta con una gran cantidad de información proveniente de la utilización de estos modelos, en la literatura se encontraron escasos reportes en los cuales se abordara el estudio de interfases líquido/líquido mediante la utilización de un modelo clásico y de larga trayectoria en el área de la Biofísica como lo son las monocapas de Langmuir. El estudio del comportamiento de fosfolípidos y otras moléculas tensioactivas, en una interfase agua/aceite resulta fundamental si se pretende estudiar sistemas más complejos, como por ejemplo las emulsiones. En particular, la estabilidad de las partículas de emulsión ha sido objeto de intensos debates e investigaciones durante décadas y aún hoy se carece de una comprensión fundamental de los mecanismos que gobiernan la estabilidad de emulsiones O/W y W/O, así como de técnicas preparativas que provean datos cuantitativos para una formulación racional y facilitada.

A partir de esta problemática, y ante la ausencia de información referida a la aplicación de la técnica de filmes de Langmuir en la interfase O/W surgieron diversos

interrogantes que motivaron la realización de esta tesis, algunos de ellos son: ¿Cómo son afectadas las moléculas de fosfolípidos por la presencia de la fase aceite? ¿Cómo se modifican las propiedades reológicas del filme en la interfase O/W con respecto a las observadas en la interfase A/W? ¿Las moléculas de hidrocarburos interfieren en la estabilidad de los estados de fase? ¿Es posible utilizar datos cuantitativos obtenidos en el sistema modelo de monocapas para formular emulsiones estables?

En este sentido, el estudio realizado en esta tesis permitió revalorizar la técnica de monocapas de Langmuir en la interfase líquido/líquido, como así también ofrecer una comparación detallada (y hasta el momento inexistente en la literatura) del comportamiento de dos fosfolípidos modelo, DPPC y EPC, en la interfase A/W con respecto al exhibido en la interfase O/W cuando la fase oleosa es Vaselina. Además, el análisis del comportamiento molecular, reológico y termodinámico de estos fosfolípidos en la interfase agua/vaselina, aportó valiosa información para avanzar en la comprensión, desde un punto de vista biofísico-químico, sobre los fenómenos que ocurren a nivel molecular en la interfase de una partícula de nanoemulsión.

El desafío inicial de esta tesis fue la construcción de la cuba de Langmuir con las características adecuadas para el sistema de monocapas en la interfase líquido/líquido y su posterior validación. En este sentido, la fase oleosa elegida (vaselina) requirió una caracterización detallada de su composición. Mediante diversos análisis de  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN y CG-MS, se pudo describir a la VAS como una mezcla de alcanos con longitudes de cadena (CL) que varían de 19 a 29 (CL promedio =  $25 \pm 3$ ) y una masa molecular media ponderada de  $347 \pm 9$  g/mol.

Como estudios preparatorios, se puso a punto la técnica de filmes de Langmuir en la interfase aceite/agua y se analizó la cinética de difusión 2D y 3D de los fosfolípidos durante el proceso de preparación de las monocapas mediante diferentes técnicas. Esto permitió no sólo entender el proceso sino también definir las condiciones óptimas para la preparación de las monocapas en la interfase líquido/líquido. A continuación, se estudió el comportamiento reológico y termodinámico de monocapas de fosfolípidos (EPC y DPPC) en la interfase vaselina/agua. Teniendo en cuenta que estas monocapas son en realidad una mezcla de determinada composición entre el fosfolípido y VAS, se construyeron monocapas a partir de mezclas pseudobinarias de PC y diversas proporciones de VAS en la interfase agua/aire. De la información obtenida a partir de isothermas de compresión  $\pi$ -MMA y de imágenes de

microscopía de ángulo de Brewster se construyeron diagramas de fase para DPPC y se identificaron puntos en el diagrama donde coexisten las fases de monocapa y de lentes de VAS sobre la monocapa, tal como predijeron los valores del coeficiente de “spreading” calculados en base a la combinación de tensiones interfasiales. La composición de estas últimas se identificó mediante microscopía de epifluorescencia y microscopía espectral con el uso de sondas que particionan de manera diferencial en cada una de estas fases. Una vez formadas, estas gotas permanecen a lo largo de un ciclo de compresión-descompresión y su altura, calculada a partir de valores de reflectividad determinados por BAM, acompaña estos ciclos alcanzando un máximo a la mayor compresión.

Adicionalmente, se debe destacar que gracias a la utilización de DPPC como fosfolípido modelo se pudo realizar un análisis más detallado de los fenómenos interfasiales que ocurren en un sistema binario con transición de fase y separación de fases por nucleación. Mediante la realización del diagrama de fases  $\pi$ - $X_{VAS}$  se pudo obtener valiosa información que permitió determinar que la solubilidad de VAS en DPPC era muy baja,  $X_{VAS} \sim 0,05$  y que las mezclas de DPPC/VAS formaban monocapas en todo el rango de  $\pi$  hasta  $X_{VAS} < 0,2$ . Ya que a partir de  $X_{VAS}$  más altos ( $X_{VAS} > 0,2$ ), se observaron por BAM la aparición de estructuras brillantes (lentes) coexistiendo con una monocapa en estado líquido condensado (LC).

A partir de estas observaciones, surgió el concepto de punto gota (PG) que se definió en el diagrama de fase  $\pi$ - $X_{VAS}$ , como una zona donde las monocapas mezcla DPPC/VAS<sub>0.02</sub> en estado LE y LC, exhibe regiones de monocapa en la interfase agua/aire con una composición constante de  $X_{VAS} \cong 0,05$  que coexiste en equilibrio con una interfase VAS/agua que es producto de la segregación del exceso de VAS a partir de núcleos de condensación que crecen hasta formar la gota estabilizada sobre una monocapa lipídica en la interfase O/W. Estos resultados permitieron construir el modelo de hemipartícula de emulsión para explicar este sistema.

Por otra parte, a partir de isotermas de adsorción de DPPC en la interfase VAS/W, se obtuvo el valor de la presión de equilibrio de saturación de DPPC ( $\pi_{eq,sat} \sim 27,3 \pm 0,1$  mN/m). El cual se pudo interpolar en la isoterma  $\pi$ -MMA en la interfase VAS/W para obtener el área mínima de DPPC ( $MMA_{min}$ ) correspondiente a la presión de equilibrio de DPPC en esta interfase. Con la ayuda de cálculos geométricos, el valor de  $MMA_{min}$  pudo utilizarse como

punto de partida para estimar una proporción adecuada de DPPC/VAS de acuerdo con el tamaño y la concentración deseados para formular suspensiones de partículas de emulsión. Sin embargo, como el valor de  $\pi_{\text{eq,sat}}$  obtenido para DPPC resultó ser muy cercano a la presión de colapso ( $\pi_{\text{c, VAS/W}} = 27 \pm 1$ ) de la monocapa de DPPC en la interfase VAS/W se utilizó el MMA de DPPC en la interfase VAS/W correspondiente a un valor de  $\pi$  ( $24 \pm 1$  mN/m), dentro de un 10% por debajo de la  $\pi_{\text{c, VAS/W}}$  y  $\pi_{\text{eq,sat}}$ . Por consiguiente, se realizaron ensayos preliminares para la formulación de emulsiones utilizando la información obtenida de las monocapas de DPPC en la interfase VAS/W a esta nueva presión interfasial seleccionada, donde existe una monocapa en estado de fase LC. Las predicciones teóricas realizadas a partir del modelo de monocapas fueron satisfactorias sólo para la síntesis de partículas con diámetros promedio en el rango de 100 nm a 400 nm y con bajas concentraciones de DPPC (0,01mM) en el sistema global. Sin embargo, se espera que con ciertas modificaciones y nuevos experimentos el modelo teórico planteado pueda ser refinado y que un fundamento similar pueda aplicarse en el futuro para calcular relaciones de Agua/Aceite/Surfactante que faciliten la formulación de emulsiones con el uso de otros tensioactivos.

De este modo, mediante el análisis y cuantificación de fenómenos como la difusión, la segregación en fases y puntos críticos, se pudo interpretar cada vez mejor el rol que juegan los lípidos como surfactantes naturales en sistemas más complejos. Estos estudios son de gran interés no sólo para lograr una correlación con el modelo de emulsiones, sino que también pueden contribuir en gran medida a la comprensión de otro tipo de sistemas biológicos, como los fenómenos de la biogénesis de “lipid droplets”, que están presentes en la respuesta a la infección con virus, la estructuración de lipoproteínas y otros fenómenos de gran relevancia biológica.

Por otra parte, mediante la colaboración con otro grupo de investigación se pudo estudiar el uso de partículas de emulsión como moldes para la síntesis de nanocápsulas de sílica con posibles aplicaciones biomédicas. Si bien el sistema aceite-surfactante utilizado no fue el mismo que el planteado inicialmente en esta tesis, se pudo abordar exitosamente un nuevo enfoque para sintetizar en un solo paso nanocápsulas sensibles a estímulos redox. Estos resultados, permitieron destacar que las emulsiones tienen un gran potencial como plataformas para el encapsulamiento y liberación de moléculas, ya sean de interés farmacológico, médico, cosmético o alimentario, entre otros. Esto nos invita a reflexionar

sobre el valor del desarrollo a nivel nanobiotecnológico de esta temática y de sus beneficios para la sociedad. Sin embargo, esto no será posible sin la necesaria existencia de investigaciones que permitan una comprensión teórica de los fundamentos biofísico-químicos que regulan los sistemas nanoemulsionados. Como explicaba la científica Marie Skłodowska-Curie: “[...] *ello es prueba de que el trabajo científico no debe considerarse desde el punto de vista de su uso directo. Se debe realizar por sí mismo, por la belleza de la ciencia y luego siempre existirá la posibilidad de que un descubrimiento científico [...] se convierta en un beneficio para la humanidad*”.

Finalmente, es importante destacar que mediante la realización de esta tesis doctoral se logró incorporar exitosamente la técnica de Filmes de Langmuir en la interfase líquido/líquido a nuestro laboratorio y todo el equipamiento diseñado específicamente para su realización. Esta nueva técnica permitió ampliar la experticia que tiene nuestro laboratorio en el área de la Biofísica de biomembranas y a su vez, brinda a toda la comunidad Biofísica Argentina la posibilidad de contar con esta valiosa técnica para abordar, en colaboración, la resolución de nuevas problemáticas y/o de problemáticas vigentes que puedan verse beneficiadas mediante su aplicación y el análisis de los nuevos datos obtenidos.

# Anexos

## A.1. Certificado de análisis de VAS.



Productos Químicos Industriales, usos de Laboratorio  
y Materias Primas para la Alimentación.

### CERTIFICADO DE ANALISIS

PRODUCTO: **VASEPLUS 90** CAS N: 8042-47-5 O. COMPRA:

CLIENTE: **LEVY J. F.** REMITO: **12052** BATCH: **5056**  
CÓDIGO:

FECHA ELABORACIÓN: **01/2014**

VIDA ÚTIL **2 AÑOS**

CODIGO: 01-0103 para lts 01-0123 para Kg

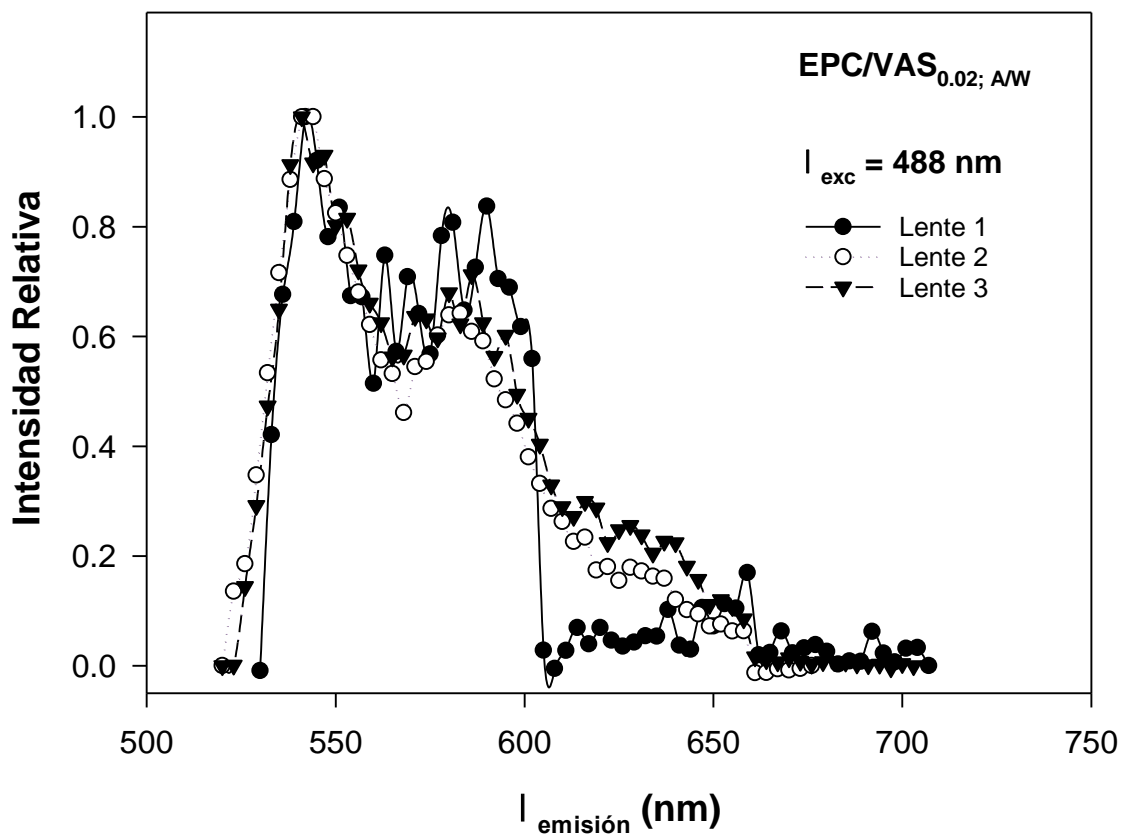
TEST	ESPECIFICACION	METODO	RESULTADO
Color	Incoloro	visual	<b>Cumple</b>
Olor y gusto	Inodora en frío débil olor a petróleo a 70°C	Sensitiva	<b>Cumple</b>
Peso específico 15/15°C	0.820- 0.860	ASTM-D-1298	<b>0.845</b>
Peso específico 25/25°C		ASTM-D-1298	
Viscosidad SSU 37.8°C	70/90	ASTM-D-445	<b>75</b>
Viscosidad cst.40°C	12.2/17	ASTM-D-445	
Acidos y alcalis	Neutra al papel de tornasol	FA.VI p 1001	<b>Cumple</b>
Azufre y sulfuros	Pasa test	FA.VI p 1001	<b>Cumple</b>
Sustancias facilmente carbonizables	Color < al Standard	FA. p 1001	Cumple
Parafinas Solidas y agua	Pasa test	FA. VI p 1001	<b>Cumple</b>
Compuestos polinucleares	< a 1/3 del Standard	USP. XXV- NF20	Cumple
APROBO:	Nombre: Santillan Ernesto	CARGO: jefe de planta	

Figura A. 1. Caracterización de VAS provista por el fabricante.

Certificado de análisis brindado por el fabricante VASEPLUS S.A. a Todo Droga, una de las empresas que fracciona y distribuye esta sustancia en la ciudad de Córdoba y donde fue adquirido el stock utilizado en el presente trabajo. Puede observarse que sólo se detallan características fisicoquímicas generales de acuerdo con pruebas estándares de calidad.



## A.2. Capítulo IV. Sección IV.2.3.



**Figura A. 2.** Microscopía de epifluorescencia confocal espectral de monocapas EPC/VAS<sub>0.02</sub> en la interfase A/W.

Se utilizó NR como sonda fluorescente. La fracción molar de VAS fue 0,02. Se muestran los espectros de emisión obtenidos tras una excitación a 488 nm. Los espectros se construyeron a partir del análisis de tres lentes diferentes, en imágenes que fueron sucesivamente capturadas a diferentes  $\lambda_{emisión}$  dentro del rango de 500-700 nm.

### A.3. Capítulo V. Sección V.2.2

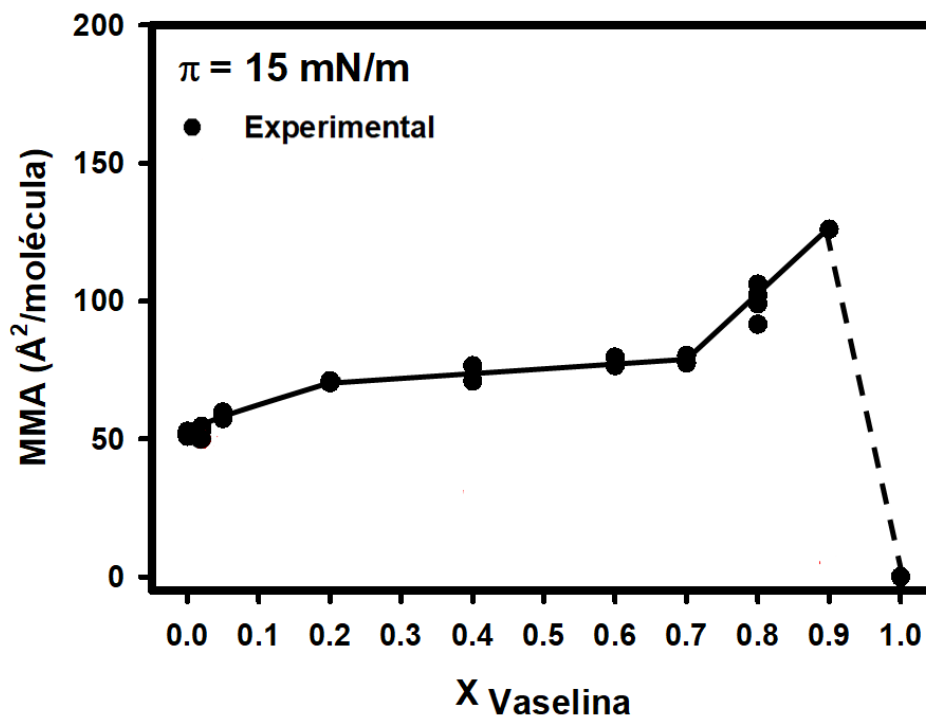
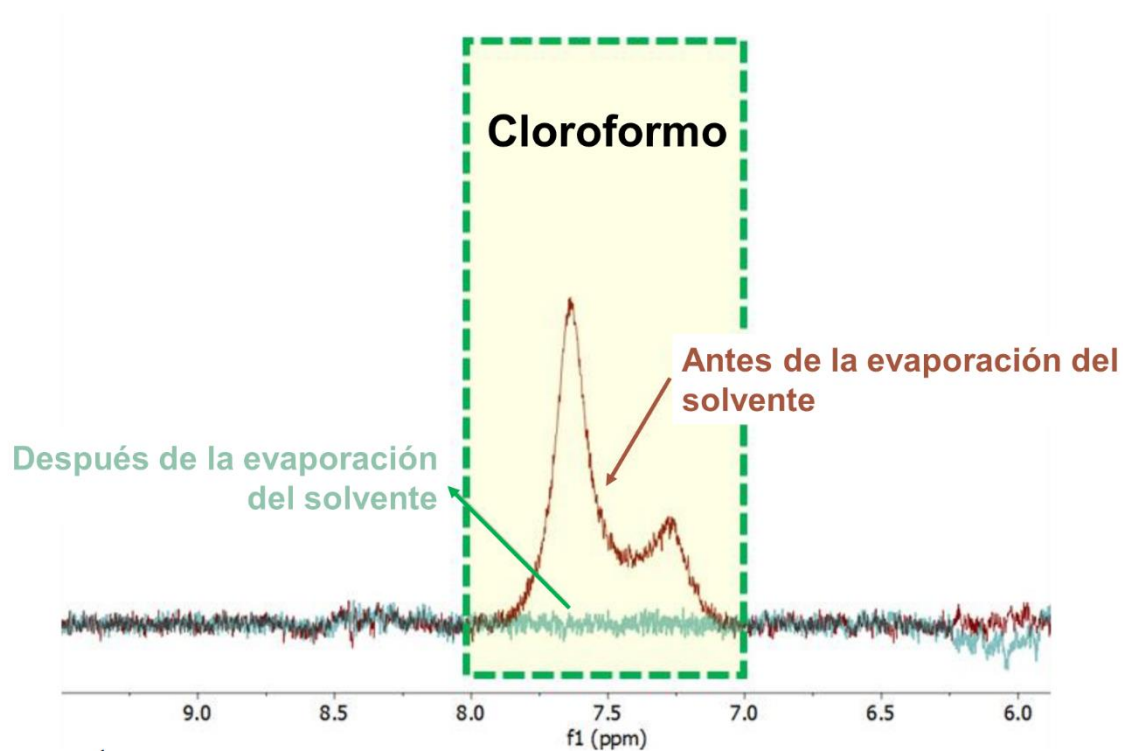


Figura A. 3. Diagrama de MMA vs.  $X_{VAS}$  para la mezcla DPPC/VAS.

Valores experimentales de área molecular promedio a  $\pi = 15$  mN/m en función de la composición de la mezcla pseudobinaria VAS/DPPC.

#### A.4. Capítulo VII. Sección VII.2.3.



**Figura A. 4** Espectro <sup>1</sup>H-RMN de las nanocápsulas de sílica (NC<sub>agua</sub>) antes y después de la evaporación del solvente a temperatura ambiente durante 12 horas.

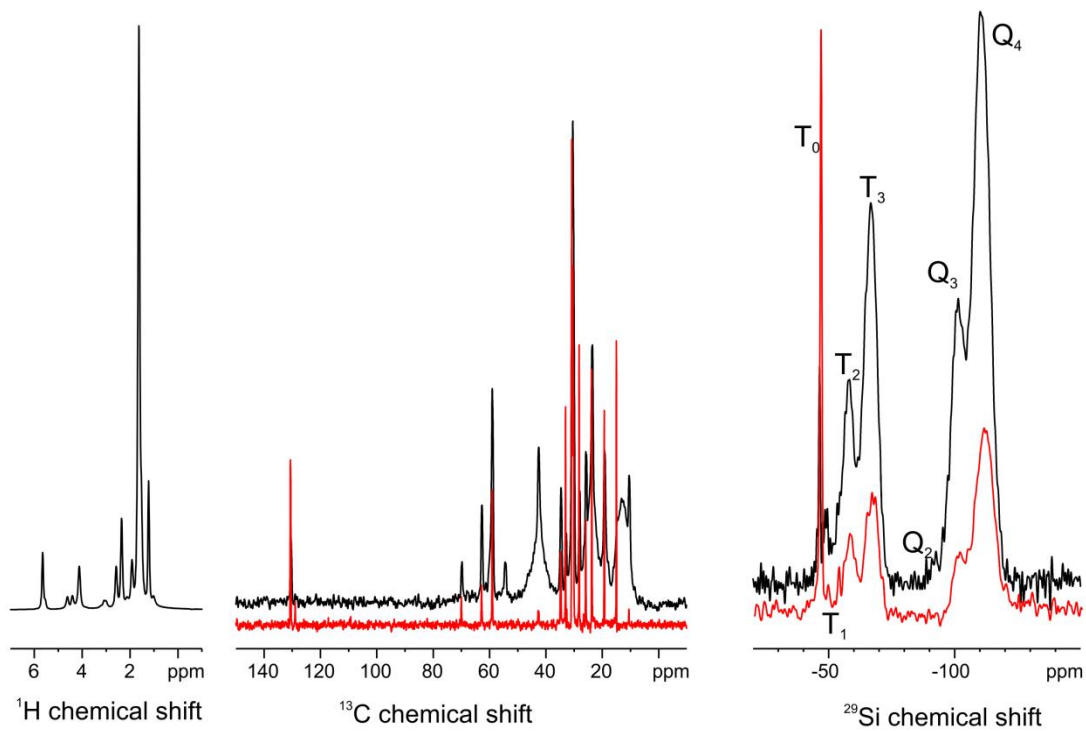
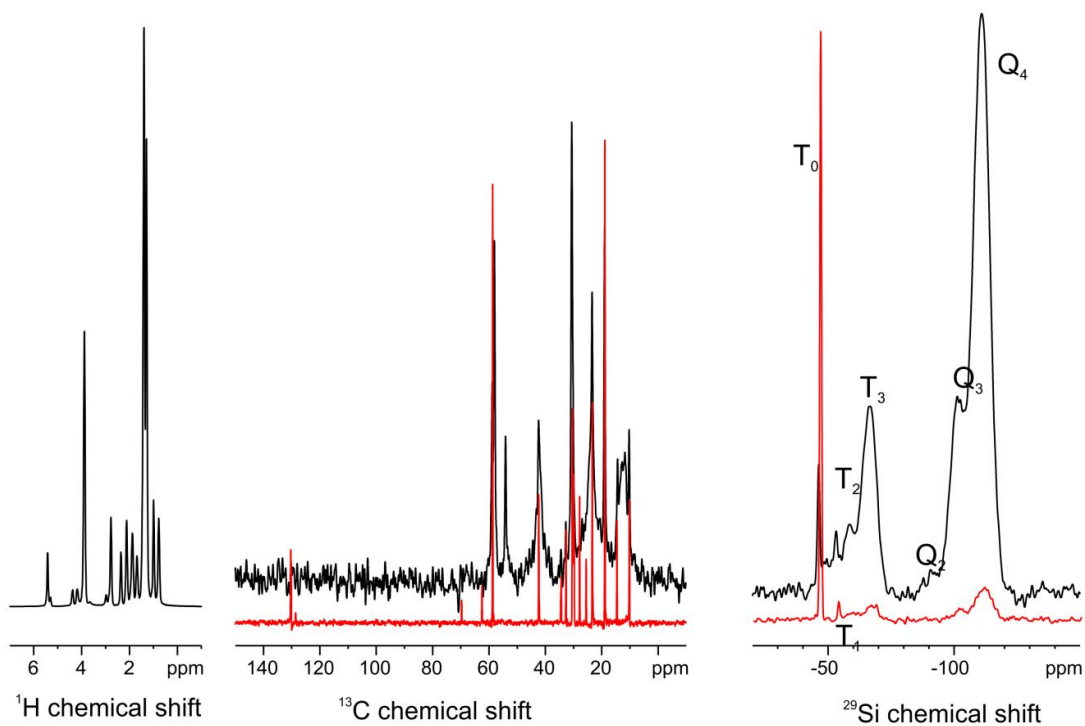
Para la medición de <sup>1</sup>H-RMN, se mezclaron 100  $\mu$ L de la dispersión de nanocápsulas con 500  $\mu$ L de D<sub>2</sub>O. La sal sódica del ácido 3-(trimetilsilil)-1-propanosulfónico se utilizó como patrón externo disolviéndola primero en D<sub>2</sub>O.

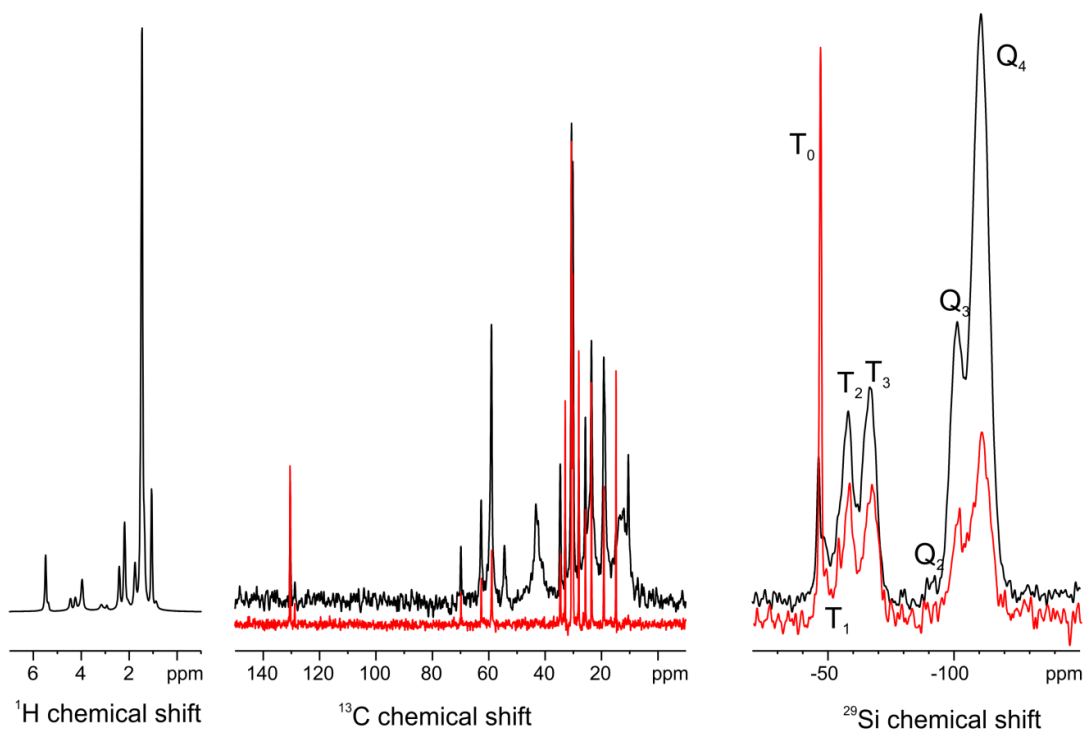
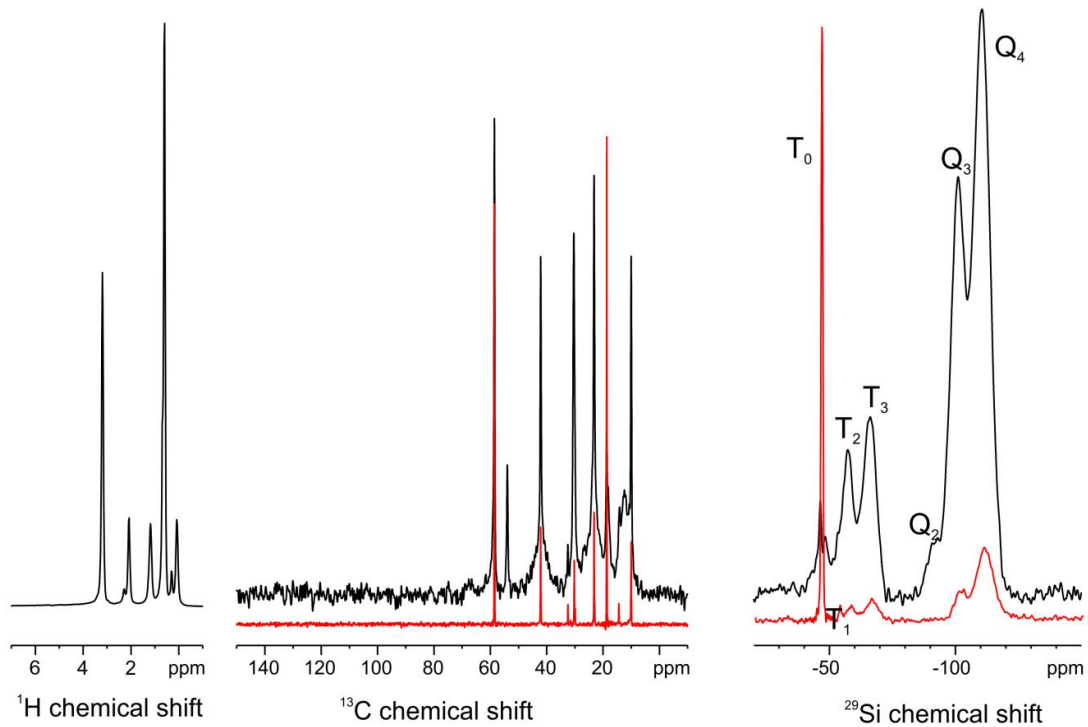
### A.5. Capítulo VII. Sección VII.2.4.

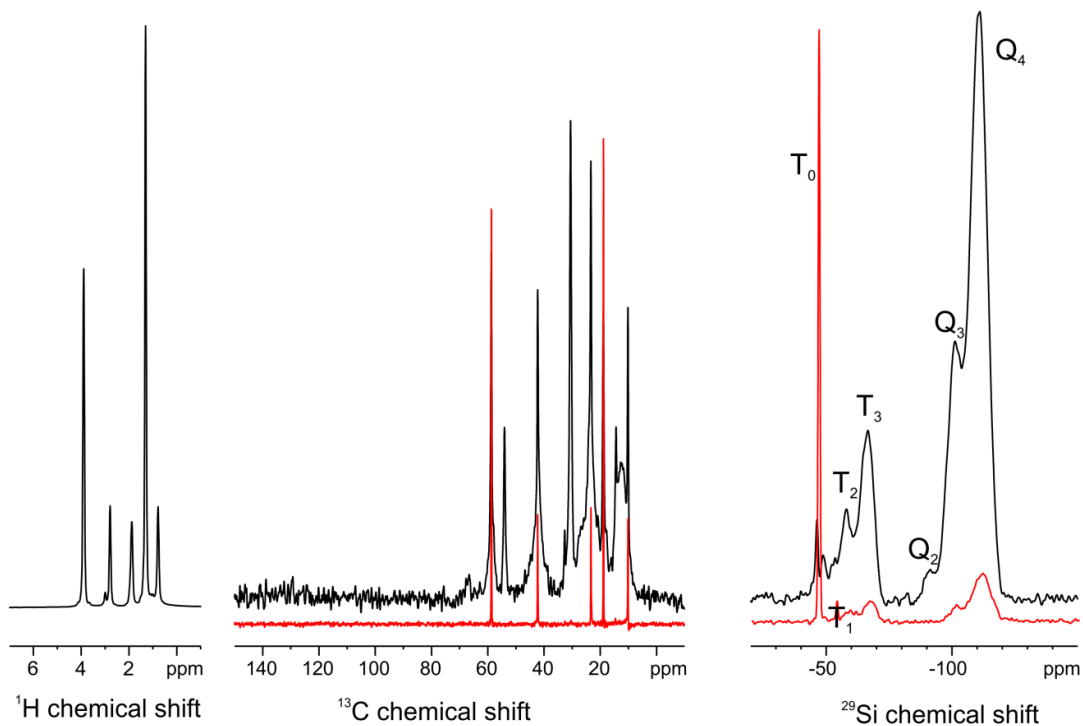
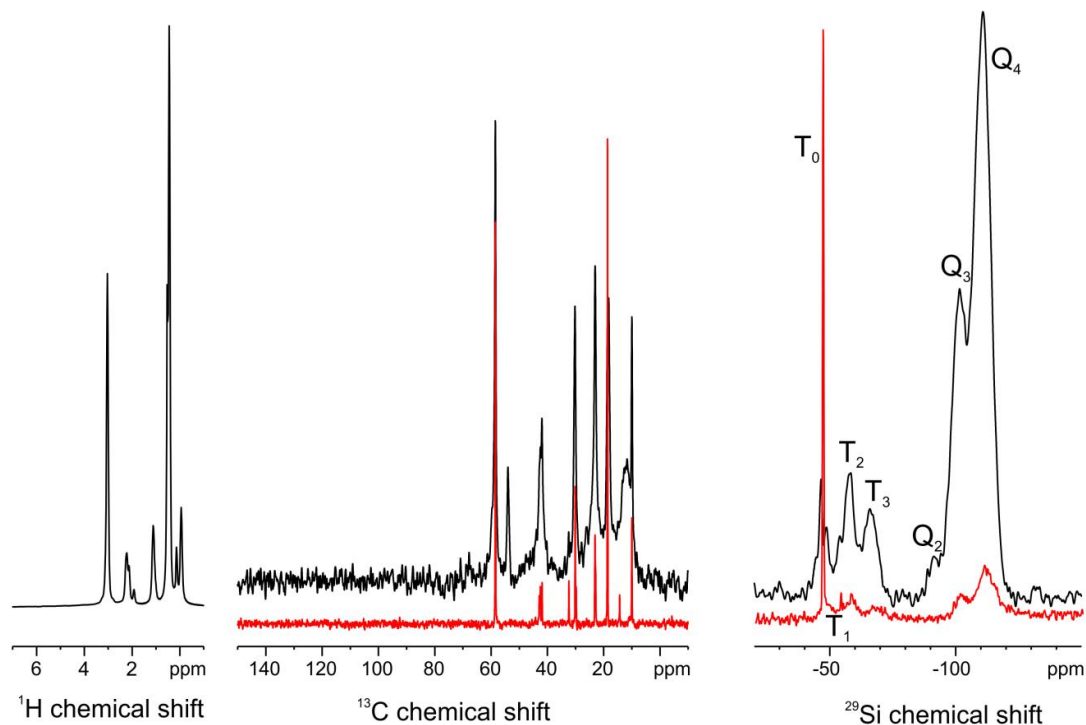
Los espectros de  $^{29}\text{Si}$ -RMN muestran señales a -110 y -100 ppm correspondientes a las unidades  $\text{Q}^4$  y  $\text{Q}^3$  ( $\text{Q}^n$ :  $\text{Si}(\text{OSi})_n(\text{OH})_{4-n}$ ), respectivamente. El alto porcentaje de la señal  $\text{Q}^4$  ( $\text{Q}^4 > 55\%$  para las muestras control y  $\text{Q}^4 \geq 85\%$  para todas las nanocápsulas híbridas) confirmó la formación exitosa de la red de silicatos por puentes de siloxano (Figura A. 5). En comparación con las  $\text{NC}_{\text{aceite}}$ , el porcentaje de la señal  $\text{Q}^4$  para las  $\text{NC}_{\text{agua}}$  incrementó levemente, lo que indica que los alcoxisilanos se hidrolizaron aún más cuando el núcleo inicial de cloroformo se intercambiaba con agua. Además, el porcentaje de señal  $\text{Q}^4$  también está relacionado con la permeabilidad de la cubierta de sílica. Cuando la señal  $\text{Q}^4$  aumentó desde 56% para las NC control hasta el 85% para  $\text{NC}_{\text{aceite-2S-25\%}}$ , la eficiencia de encapsulación de DXM aumentó más del 50% debido al mayor grado de polimerización en la cubierta de sílica. La ausencia de alcoxisilanos libres ( $\text{Q}^0$ ) y mono-reaccionados ( $\text{Q}^1$ ), y una resonancia muy baja correspondiente a  $\text{Q}^2$  (1% para  $\text{NC}_{\text{aceite}}$  y 3% para  $\text{NC}_{\text{agua}}$ ) mostraron que los alcoxisilanos reaccionaron eficientemente. Además, las señales observadas a -68 y -58 ppm se corresponden con las unidades  $\text{T}^3$  y  $\text{T}^2$  respectivamente de los alcoxisilanos que contienen grupos sulfuro ( $\text{T}^m$ :  $\text{CSi}(\text{OSi})_m(\text{OH})_{3-m}$ ), (Figura A. 6 a-f). Las señales T junto con las señales de  $^{13}\text{C}$  a 12,1; 23,3 y 41,8 ppm correspondientes a  $^1\text{C}$ ,  $^2\text{C}$  y  $^3\text{C}$  en la serie de  $\text{Si-}^1\text{C-}^2\text{C-}^3\text{C-SS-}^3\text{C-}^2\text{C-}^1\text{C-Si}$ , respectivamente, demostraron la integración de los alcoxisilanos que contienen sulfuro dentro de la cubierta de  $\text{SiO}_2$ , formando un marco híbrido orgánico-inorgánico de silsesquioxano. La señal  $\text{T}^0$  indicó alcoxisilanos funcionales no condensados, probablemente debido a su mayor hidrofobicidad en comparación con TEOS.

Muestra	Contenido de sitios $\text{Q}_n$ y $\text{T}_n$ (%) <sup>a</sup>						
	$\text{Q}_2$	$\text{Q}_3$	$\text{Q}_4$	$\text{T}_0$	$\text{T}_1$	$\text{T}_2$	$\text{T}_3$
$\text{NC}_{\text{aceite}}$	1	43	56	-	-	-	-
$\text{NC}_{\text{agua}}$	3	41	56	-	-	-	-
$\text{NC}_{\text{aceite-2S-25\%}}$	0	15	85	34	1	29	36
$\text{NC}_{\text{aceite-2S-50\%}}$	0	15	85	76	2	10	12
$\text{NC}_{\text{agua-2S-25\%}}$	0	11	89	77	2	10	11
$\text{NC}_{\text{agua-2S-50\%}}$	0	14	86	72	2	15	11
$\text{NC}_{\text{aceite-4S-25\%}}$	0	25	75	30	2	38	30
$\text{NC}_{\text{agua-4S-25\%}}$	0	14	86	64	2	27	7

Figura A. 5. Grado de hidrólisis de los alcoxisilanos emulsionados.

(a)  $\text{SiO}_2$  NC<sub>accite</sub>-2S-25%(b)  $\text{SiO}_2$  NC<sub>accite</sub>-2S-50%

(c)  $\text{SiO}_2\text{NC}_{\text{aceite-4S-25\%}}$ (d)  $\text{SiO}_2\text{NC}_{\text{agua-2S-25\%}}$ 

(e)  $\text{SiO}_2\text{NC}_{\text{agua}}\text{-2S-50\%}$ (f)  $\text{SiO}_2\text{NC}_{\text{agua}}\text{-4S-25\%}$ **Figura A. 6. Espectros de  $^1\text{H}$  MAS RMN,  $^{13}\text{C}$  CP-MAS RMN, y  $^{29}\text{Si}$  MAS RMN.**

Desde (a) hasta (f) pueden observarse los espectros registrados para todas las nanocápsulas de sílica que contienen distintas proporciones de enlaces disulfuro o tetrasulfuro. Adquiridos a 300 MHz  $^1\text{H}$  frecuencia Larmor.

### **Información técnica**

Los espectros cuantitativos  $^{29}\text{Si}$  MAS-NMR se registraron con un espectrómetro Bruker Avance II que funciona a una frecuencia Larmor de 300,23 MHz  $^1\text{H}$  utilizando una sonda MAS comercial de doble resonancia que soporta rotores MAS con un diámetro exterior de 7 mm. Los espectros de excitación directa se adquirieron con un pequeño ángulo de excitación de  $\approx 20^\circ$  a una frecuencia de nutación de rf de 25 kHz y un retraso de relajación de 60 s entre transitorios posteriores. Para evitar la ampliación de la línea debido a los acoplamientos dipolares, se aplicó un desacoplamiento hetero-nuclear SPINAL64 a una frecuencia de nutación rf de 50 kHz<sup>240</sup>. Las señales de RMN  $^{29}\text{Si}$  utilizaron como referencia al tetrakis(trimetilsilil)silano<sup>241</sup> y las asignaciones de los grupos  $\text{T}^{(n)}$  y  $\text{Q}^{(n)}$  se tomaron de la literatura<sup>242</sup>. El contenido de los grupos  $\text{T}^{(n)}$  y  $\text{Q}^{(n)}$  se cuantificó mediante la deconvolución de los espectros  $^{29}\text{Si}$  MAS-RMN utilizando el programa DMfit de *Massiot et al.*,<sup>243</sup> porque las señales de RMN superpuestas de diferentes  $\text{T}^{(n)}$  y  $\text{Q}^{(n)}$  los grupos no pudieron cuantificarse por integración.



# Referencias

1. Whitesides, G. M., The 'right' size in nanobiotechnology. *Nature Biotechnology* **2003**, *21* (10), 1161-1165.
2. Jain, K. K., The role of nanobiotechnology in drug discovery. *Drug Discovery Today* **2005**, *10* (21), 1435-1442.
3. Wong, J. K. L.; Mohseni, R.; Hamidieh, A. A.; MacLaren, R. E.; Habib, N.; Seifalian, A. M., Will Nanotechnology Bring New Hope for Gene Delivery? *Trends in Biotechnology* **2017**, *35* (5), 434-451.
4. Morais, M. G. d.; Martins, V. G.; Steffens, D.; Pranke, P.; da Costa, J. A. V., Biological applications of nanobiotechnology. *Journal of nanoscience and nanotechnology* **2014**, *14* (1), 1007-1017.
5. Sutariya, V. B.; Pathak, Y., *Biointeractions of nanomaterials*. CRC Press: 2014.
6. Siegel, R. W.; Hu, E., *Nanostructure science and technology: R & D status and trends in nanoparticles, nanostructured materials and nanodevices*. Springer Science & Business Media: 1999.
7. Maggio, B.; Fanani, M. L.; Rosetti, C. M.; Wilke, N., Biophysics of sphingolipids II. Glycosphingolipids: An assortment of multiple structural information transducers at the membrane surface. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2006**, *1758* (12), 1922-1944.
8. Blanco, A., *Química Biológica*. El Ateneo: 2006.
9. Alberts, B.; Wilson, J. H.; Johnson, A.; Hunt, T.; Lewis, J.; Roberts, K.; Raff, M.; Walter, P., *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science: 2008.
10. Bagatolli, L.; Mouritsen, O. G., *Vida¿ una cuestión de grasas?: Una perspectiva desde la biofísica de membranas*. Yachay: 2014.
11. Seddon, J. M.; Templer, R. H., Chapter 3 - Polymorphism of Lipid-Water Systems. In *Handbook of Biological Physics*, Lipowsky, R.; Sackmann, E., Eds. North-Holland: 1995; Vol. 1, pp 97-160.
12. Giudice, F. Caracterización estructural de liposomas y su interacción con moléculas anfifílicas de interés farmacológico. Doctorado, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 2016.
13. Heimburg, T., *Thermal Biophysics of Membranes*. Wiley-VCH: Weinheim, 2007.

14. McIntosh, T. J., Differences in hydrocarbon chain tilt between hydrated phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine bilayers. A molecular packing model. *Biophysical journal* **1980**, 29 (2), 237-245.
15. Caruso, B.; Sánchez, J. M.; García, D. A.; de Paula, E.; Perillo, M. A., Probing the Combined Effect of Flunitrazepam and Lidocaine on the Stability and Organization of Bilayer Lipid Membranes. A Differential Scanning Calorimetry and Dynamic Light Scattering Study. *Cell biochemistry and biophysics* **2013**, 66 (3), 461-475.
16. Marsh, D., *Handbook of lipid bilayers*. CRC press: 2013.
17. Perillo, M. A.; Scarsdale, N. J.; Yu, R. K.; Maggio, B., Modulation by gangliosides of the lamellar-inverted micelle (hexagonal II) phase transition in mixtures containing phosphatidylethanolamine and dioleoylglycerol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, 91 (21), 10019-23.
18. Israelachvili, J. N., *Intermolecular and surface forces*. 3rd ed.; Academic press Elsevier: 2011.
19. Epand, R. M., Studies of membrane physical properties and their role in biological function. *Biochemical Society transactions* **1997**, 25 (3), 1073-9.
20. Cullis, P. R.; Hope, M. J.; Bally, M. B.; Madden, T. D.; Mayer, L. D.; Fenske, D. B., Influence of pH gradients on the transbilayer transport of drugs, lipids, peptides and metal ions into large unilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1997**, 1331 (2), 187-211.
21. Epand, R. F.; Kraayenhof, R.; Sterk, G. J.; Wong Fong Sang, H. W.; Epand, R. M., Fluorescent probes of membrane surface properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1996**, 1284 (2), 191-195.
22. Sanchez, J. M.; Perillo, M. A.,  $\alpha$ -Amylase kinetic parameters modulation by lecithin vesicles: binding versus entrapment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2000**, 18 (1), 31-40.
23. Perillo, M. A.; Guidotti, A.; Costa, E.; Yu, R. K.; Maggio, B., Modulation of phospholipases A2 and C activities against dilauroylphosphorylcholine in mixed monolayers with semisynthetic derivatives of ganglioside and sphingosine. *Molecular Membrane Biology* **1994**, 11 (2), 119-126.
24. Li, J.; Miller, R.; Möhwald, H., Characterisation of phospholipid layers at liquid interfaces. 1. Dynamics of adsorption of phospholipids at the chloroform/water interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1996**, 114 (0), 113-121.
25. Stuchlik, M.; Zak, S., Lipid-based vehicle for oral drug delivery. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* **2001**, 145 (2), 17-26.
26. Almeida, A. J.; Souto, E., Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2007**, 59 (6), 478-490.

- 27.Skeie, S., Developments in microencapsulation science applicable to cheese research and development. A review. *International Dairy Journal* **1994**, *4* (7), 573-595.
- 28.Kheadr, E. E.; Vuillemand, J. C.; El-Deeb, S. A., Impact of liposome-encapsulated enzyme cocktails on cheddar cheese ripening. *Food Research International* **2003**, *36* (3), 241-252.
- 29.Caboi, F.; Amico, G. S.; Pitzalis, P.; Monduzzi, M.; Nylander, T.; Larsson, K., Addition of hydrophilic and lipophilic compounds of biological relevance to the monoolein/water system. I. Phase behavior. *Chemistry and Physics of Lipids* **2001**, *109* (1), 47-62.
- 30.Lindstrom, M.; Ljusberg-Wahren, H.; Larsson, K.; Borgstrom, B., Aqueous lipid phases of relevance to intestinal fat digestion and absorption. *Lipids* **1981**, *16* (10), 749-54.
- 31.Norling, T.; Lading, P.; Engstrom, S.; Larsson, K.; Krog, N.; Nissen, S. S., Formulation of a drug delivery system based on a mixture of monoglycerides and triglycerides for use in the treatment of periodontal disease. *Journal of clinical periodontology* **1992**, *19* (9 Pt 2), 687-92.
- 32.Larsson, K., Lipid phase transitions in membranes involving intrinsic periodic curvature. *Chemistry and Physics of Lipids* **1988**, *49* (1-2), 65-67.
- 33.McClements, D. J.; Rao, J., Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical reviews in food science and nutrition* **2011**, *51* (4), 285-330.
- 34.Huang, Q.; Yu, H.; Ru, Q., Bioavailability and Delivery of Nutraceuticals Using Nanotechnology. *Journal of Food Science* **2010**, *75* (1), R50-R57.
- 35.Shakeel, F.; Ramadan, W., Transdermal delivery of anticancer drug caffeine from water-in-oil nanoemulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2010**, *75* (1), 356-362.
- 36.Ishii, F.; Nii, T., Properties of various phospholipid mixtures as emulsifiers or dispersing agents in nanoparticle drug carrier preparations. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **2005**, *41* (4), 257-62.
- 37.Pasquali, R. C.; Sacco, N.; Bregni, C., The studies on hydrophilic-lipophilic balance (HLB): Sixty years after William C. Griffin's pioneer work (1949-2009). *Lat Am J Pharm* **2009**, *28* (2), 313-317.
- 38.Abbott, S., *Surfactant science: principles and practice*. Creative commons: 2018; p 2-252.
- 39.Rosen, M. J.; Kunjappu, J. T., Emulsification by Surfactants. In *Surfactants and Interfacial Phenomena*, 2012; pp 336-367.
- 40.Kale, S. N.; Deore, S. L., Emulsion micro emulsion and nano emulsion: a review. *Systematic Reviews in Pharmacy* **2017**, *8* (1), 39.

- 41.Schulman, J. H.; Stoeckenius, W.; Prince, L. M., Mechanism of Formation and Structure of Micro Emulsions by Electron Microscopy. *The Journal of Physical Chemistry* **1959**, *63* (10), 1677-1680.
- 42.Salager, J. L.; Antón, R.; Andérez, J.; Aubry, J. M., Formulación de Microemulsiones por el Método HLD. In *Traducido de Techniques de l'Ingénieur, Génie Chimique, artículo J2 157 (2001)* [Online] Laboratorio FIRP: Escuela de Ingeniería Química, Universidad de Los Andes, 2015.
- 43.Bruschi, M. L., *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*. Elsevier Science: 2015.
- 44.McClements, D. J., Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter* **2012**, *8* (6), 1719-1729.
- 45.Hunter, R., *Foundations of Colloid Science*, Vol. I and Vol. II. Oxford Science Publications, Clarendon Press, Oxford, England: 1989.
- 46.Evilevitch, A.; Jönsson, B.; Olsson, U.; Wennerström, H., Molecular Transport in a Nonequilibrium Droplet Microemulsion System. *Langmuir* **2001**, *17* (22), 6893-6904.
- 47.Wennerström, H.; Balogh, J.; Olsson, U., Interfacial tensions in microemulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2006**, *291* (1), 69-77.
- 48.Tadros, T. F., Emulsion Formation and Stability. In *Emulsion Formation, Stability, and Rheology*, Tadros, T. F., Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2013; pp 1-75.
- 49.Myers, D., *Surfactant science and technology*. John Wiley & Sons: 2005.
- 50.Antonietti, M.; Landfester, K., Polyreactions in miniemulsions. *Progress in Polymer Science* **2002**, *27* (4), 689-757.
- 51.Piradashvili, K.; Alexandrino, E. M.; Wurm, F. R.; Landfester, K., Reactions and Polymerizations at the Liquid–Liquid Interface. *Chemical reviews* **2016**, *116* (4), 2141-2169.
- 52.Vladisavljević, G.; Kobayashi, I.; Nakajima, M., Production of uniform droplets using membrane, microchannel and microfluidic emulsification devices. *Microfluidics and nanofluidics* **2012**, *13* (1), 151-178.
- 53.Crespy, D.; Landfester, K., Miniemulsion polymerization as a versatile tool for the synthesis of functionalized polymers. *Beilstein journal of organic chemistry* **2010**, *6* (1), 1132-1148.
- 54.Anton, N.; Benoit, J.-P.; Saulnier, P., Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—a review. *Journal of Controlled Release* **2008**, *128* (3), 185-199.
- 55.Vitale, S. A.; Katz, J. L., Liquid droplet dispersions formed by homogeneous liquid–liquid nucleation:“The ouzo effect”. *Langmuir* **2003**, *19* (10), 4105-4110.

56. Fernandez, P.; André, V.; Rieger, J.; Kühnle, A., Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2004**, *251* (1–3), 53-58.
57. Rayleigh, Surface Tension. *Nature* **1891**, *43*, 437.
58. Davies, J. T.; Rideal, E. K., *Interfacial phenomena*. Academic Press: New York, 1963.
59. Möhwald, H., Surfactant layers at water surfaces. *Reports on Progress in Physics* **1993**, *56* (5), 653.
60. Stefaniu, C.; Brezesinski, G.; Möhwald, H., Langmuir monolayers as models to study processes at membrane surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science* **2014**, *208*, 197-213.
61. Thoma, M.; Möhwald, H., Phospholipid Monolayers at Hydrocarbon/Water Interfaces. *Journal of colloid and interface science* **1994**, *162* (2), 340-349.
62. Alexander, A.; Teorell, T.; Rideal, E. K., A study of films at the liquid/liquid interface. *Trans. Faraday Soc.* **1939**, *35*, 727-737.
63. Zhang, L. Y.; Xu, Z.; Masliyah, J. H., Characterization of Adsorbed Athabasca Asphaltene Films at Solvent–Water Interfaces Using a Langmuir Interfacial Trough. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2005**, *44* (5), 1160-1174.
64. Heertjes, P. M.; de Smet, E. C.; Witvoet, W. C., The determination of interfacial tensions with the Wilhelmy plate method. *Chemical Engineering Science* **1971**, *26* (9), 1479-1480.
65. Taylor, J. A. G.; Mingins, J., Properties of the non-polar oil/water interface. Part 1.- Procedures for the accurate measurement of the interfacial pressure of an insoluble monolayer. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases* **1975**, *71* (0), 1161-1171.
66. Mingins, J.; Pethica, B. A., Intermolecular Forces in Spread Phospholipid Monolayers at Oil/Water Interfaces. *Langmuir* **2004**, *20* (18), 7493-7498.
67. Mottola, M.; Caruso, B.; Perillo, M. A., Langmuir films at the oil/water interface revisited. *Scientific Reports* **2019**, *9* (1), 2259.
68. Fendler, J. H., *Membrane mimetic chemistry: characterizations and applications of micelles, microemulsions, monolayers, bilayers, vesicles, host-guest systems, and polyions*. Wiley New York: 1982.
69. Gaines Jr., G. L., *Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces*. John Wiley & Sons, Inc: New York, 1966.
70. Solovyev, A.; Zhang, L. Y.; Xu, Z.; Masliyah, J. H., Langmuir Films of Bitumen at Oil/Water Interfaces. *Energy & Fuels* **2006**, *20* (4), 1572-1578.

- 
- 71.Theumer, M. G.; Clop, P. D.; Rubinstein, H. R.; Perillo, M. A., Effect of Surface Charge on the Interfacial Orientation and Conformation of FB1 in Model Membranes. *The Journal of Physical Chemistry B* **2012**, *116* (49), 14216-14227.
- 72.Theumer, M. G.; Clop, E. M.; Rubinstein, H. R.; Perillo, M. A., The lipid-mediated hypothesis of fumonisin B1 toxicodynamics tested in model membranes. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **2008**, *64* (1), 22-33.
- 73.Clop, E. M.; Chattah, A. K.; Perillo, M. A., Water and Membrane Dynamics in Suspensions of Lipid Vesicles Functionalized with Poly(ethylene glycol)s. *The Journal of Physical Chemistry B* **2014**, *118* (23), 6150-6158.
- 74.Clop, E. M.; Corvalán, N. A.; Perillo, M. A., Langmuir films of dipalmitoyl phosphatidylethanolamine grafted poly(ethylene glycol). In-situ evidence of surface aggregation at the air-water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2016**, *148*, 640-649.
- 75.KSV NIMA. Langmuir and Langmuir-Blodgett Deposition Troughs. <https://www.biolinscientific.com/ksvnima>.
- 76.Gaines, G. L., *Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces*. John Wiley & Sons, Inc.: New York, 1966.
- 77.Weis, R. M.; McConnell, H. M., Two-dimensional chiral crystals of phospholipid. *Nature* **1984**, *310* (5972), 47-9.
- 78.Lösche, M.; Sackmann, E.; Möhwald, H., A fluorescence microscopic study concerning the phase diagram of phospholipids. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* **1983**, *87* (10), 848-852.
- 79.Hönig, D.; Möbius, D., Direct visualization of monolayers at the air-water interface by Brewster angle microscopy. *The Journal of Physical Chemistry* **1991**, *95* (12), 4590-4592.
- 80.Hénon, S.; Meunier, J., Microscope at the Brewster angle: Direct observation of first-order phase transitions in monolayers. *Review of Scientific Instruments* **1991**, *62* (4), 936-939.
- 81.Dluhy, R. A.; Mendelsohn, R., Emerging techniques in biophysical FT-IR. *Analytical chemistry* **1988**, *60* (4), 269A-278A.
- 82.Grandbois, M.; Desbat, B.; Blaudez, D.; Salesse, C., Polarization-modulated infrared reflection absorption spectroscopy measurement of phospholipid monolayer hydrolysis by phospholipase C. *Langmuir* **1999**, *15* (19), 6594-6597.
- 83.Kjaer, K.; Als-Nielsen, J.; Helm, C.; Laxhuber, L.; Möhwald, H., Ordering in lipid monolayers studied by synchrotron x-ray diffraction and fluorescence microscopy. *Physical review letters* **1987**, *58* (21), 2224.

84. Dutta, P.; Peng, J.; Lin, B.; Ketterson, J. B.; Prakash, M.; Georgopoulos, P.; Ehrlich, S., X-ray diffraction studies of organic monolayers on the surface of water. *Physical review letters* **1987**, *58* (21), 2228.
85. Helm, C.; Möhwald, H.; Kjaer, K.; Als-Nielsen, J., Phospholipid monolayer density distribution perpendicular to the water surface. A synchrotron X-ray reflectivity study. *EPL (Europhysics Letters)* **1987**, *4* (6), 697.
86. Blodgett, K. B.; Langmuir, I., Built-up films of barium stearate and their optical properties. *Physical Review* **1937**, *51* (11), 964.
87. Kuhn, H.; Möbius, D., Systems of monomolecular layers—Assembling and physico-chemical behavior. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1971**, *10* (9), 620-637.
88. Zasadzinski, J. A.; Viswanathan, R.; Madsen, L.; Garnæs, J.; Schwartz, D., Langmuir-blodgett films. *Science* **1994**, *263* (5154), 1726-1733.
89. Moehwald, H.; Brezesinski, G., From Langmuir Monolayers to Multilayer Films. *Langmuir* **2016**, *32* (41), 10445-10458.
90. Wu, D.; Scott, C.; Ho, C.-C.; Co, C. C., Aqueous-Core Capsules via Interfacial Free Radical Alternating Copolymerization. *Macromolecules* **2006**, *39* (17), 5848-5853.
91. Cheng, R.; Feng, F.; Meng, F.; Deng, C.; Feijen, J.; Zhong, Z., Glutathione-responsive nano-vehicles as a promising platform for targeted intracellular drug and gene delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2011**, *152* (1), 2-12.
92. Lovell, P. A.; El-Aasser, M. S., *Emulsion polymerization and emulsion polymers*. Wiley: 1997.
93. Weiss, C. K.; Landfester, K., Miniemulsion polymerization as a means to encapsulate organic and inorganic materials. In *Advances in Polymer Science*, 2010; Vol. 233, pp 185-236.
94. Landfester, K., Miniemulsion Polymerization and the Structure of Polymer and Hybrid Nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48* (25), 4488-4507.
95. Belbekhouche, S.; Hamaide, T.; Dulong, V.; Picton, L.; Le Cerf, D.; Desbrières, J., Evolution of the water–monomer dynamic interfacial properties during methyl methacrylate radical polymerization in a single monomer droplet: dependence on the chemical structure of the surfactant. *Polymer International* **2013**, *62* (11), 1617-1623.
96. Estupinan, D.; Bannwarth, M. B.; Mylon, S. E.; Landfester, K.; Muñoz-Espi, R.; Crespy, D., Multifunctional clickable and protein-repellent magnetic silica nanoparticles. *Nanoscale* **2016**, *8* (5), 3019-3030.

- 97.Singh, R.; Whitesides, G. M., Comparisons of rate constants for thiolate-disulfide interchange in water and in polar aprotic solvents using dynamic proton NMR line shape analysis. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112* (3), 1190-1197.
- 98.Mulhearn, D. C.; Bachrach, S. M., Selective nucleophilic attack of trisulfides. An ab Initio study. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118* (39), 9415-9421.
- 99.Hogg, P. J., Disulfide bonds as switches for protein function. *Trends in biochemical sciences* **2003**, *28* (4), 210-214.
- 100.Lee, M. H.; Yang, Z.; Lim, C. W.; Lee, Y. H.; Dongbang, S.; Kang, C.; Kim, J. S., Disulfide-Cleavage-Triggered Chemosensors and Their Biological Applications. *Chemical reviews* **2013**, *113* (7), 5071-5109.
- 101.Vila, A.; Gill, H.; McCallion, O.; Alonso, M. a. J., Transport of PLA-PEG particles across the nasal mucosa: effect of particle size and PEG coating density. *Journal of Controlled Release* **2004**, *98* (2), 231-244.
- 102.Min, K. H.; Park, K.; Kim, Y.-S.; Bae, S. M.; Lee, S.; Jo, H. G.; Park, R.-W.; Kim, I.-S.; Jeong, S. Y.; Kim, K.; Kwon, I. C., Hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles-encapsulated camptothecin enhance the drug stability and tumor targeting in cancer therapy. *Journal of Controlled Release* **2008**, *127* (3), 208-218.
- 103.Kang, B.; Okwieka, P.; Schottler, S.; Seifert, O.; Kontermann, R. E.; Pfizenmaier, K.; Musyanovych, A.; Meyer, R.; Diken, M.; Sahin, U.; Mailander, V.; Wurm, F. R.; Landfester, K., Tailoring the stealth properties of biocompatible polysaccharide nanocontainers. *Biomaterials* **2015**, *49*, 125-34.
- 104.Caruso, B.; Maestri, D. M.; Perillo, M. A., Phosphatidylcholine/vegetable oil pseudo-binary mixtures at the air-water interface. Predictive formulation of oil blends with selected surface behavior. *Colloid & Surfaces: Biointerfaces* **2010**, *75*, 57-66.
- 105.Galet, L.; Pezron, I.; Kunz, W.; Larpent, C.; Zhu, J.; Lheveder, C., Selective complexation of copper ions in monolayers of a new amphiphilic cage molecule at the liquid/air and liquid/liquid interfaces. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1999**, *151*, 85-96.
- 106.Zhang, L. Y.; Lopetinsky, R.; Xu, Z.; Masliyah, J. H., Asphaltene Monolayers at a Toluene/Water Interface†. *Energy & Fuels* **2005**, *19* (4), 1330-1336.
- 107.Blodgett, K. B., Monomolecular films of fatty acids on glass. . *Journal of the American Chemical Society* **1934**, *56* (2), 495-495.
- 108.Clop, E. M.; Clop, P. D.; Sanchez, J. M.; Perillo, M. A., Molecular Packing Tunes the Activity of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -Galactosidase Incorporated in Langmuir-Blodgett Films. *Langmuir* **2008**, *24* (19), 10950-10960.
- 109.Felsztyna, I.; Turina, A. V.; Perillo, M. A.; Clop, E. M., Sensing molecular organizational changes through the catalytic activity of acetylcholinesterase from



- erythrocyte membranes in Langmuir-Blodgett films. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2020**, 183188.
110. Petty, M. C., *Langmuir-Blodgett films: an introduction*. Cambridge University Press: 1996.
111. Vargaftik, N. B.; Volkov, B. N.; Voljak, L. D., International Tables of the Surface Tension of Water. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **1983**, *12* (3), 817-820.
112. Fidelio, G. D.; Maggio, B.; Cumar, F. A., Molecular parameters and physical state of neutral glycosphingolipids and gangliosides in monolayers at different temperatures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1986**, *854* (2), 231-239.
113. [http://www.engineersedge.com/fluid\\_flow/fluid\\_date.thm](http://www.engineersedge.com/fluid_flow/fluid_date.thm).
114. Negishi, M.; Seto, H.; Hase, M.; Yoshikawa, K., How Does the Mobility of Phospholipid Molecules at a Water/Oil Interface Reflect the Viscosity of the Surrounding Oil? *Langmuir* **2008**, *24* (16), 8431-8434.
115. Walder, R. B.; Honciuc, A.; Schwartz, D. K., Phospholipid Diffusion at the Oil–Water Interface. *The Journal of Physical Chemistry B* **2010**, *114* (35), 11484-11488.
116. Lheveder, C., Meunier, J., Henon, S., Brewster Angle Microscopy. In *Physical Chemistry of Biological Interfaces.*, Baszkin, A., Norde, W., Ed. Marcel Dekker, Inc., : New York, 2000; pp 559 - 575.
117. Mercado, F. V.; Maggio, B.; Wilke, N., Phase diagram of mixed monolayers of stearic acid and dimyristoylphosphatidylcholine. Effect of the acid ionization. *Chemistry and physics of lipids* **2011**, *164* (5), 386-392.
118. Fichter, M.; Baier, G.; Dedters, M.; Pretsch, L.; Pietrzak-Nguyen, A.; Landfester, K.; Gehring, S., Nanocapsules generated out of a polymeric dexamethasone shell suppress the inflammatory response of liver macrophages. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* **2013**, *9* (8), 1223-34.
119. Yalkowsky, H.; Press, Y. H. C., *Handbook of Aqueous Solubility Data*. By Samuel. 2003.
120. O'Neil, M. J.; Smith, A.; Heckelman, P. E.; Budavari, S., *The merck index-An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. whitehouse station, NJ: Merck and Co. *Inc* **2001**, *767*, 4342.
121. Stetefeld, J.; McKenna, S. A.; Patel, T. R., Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev* **2016**, *8* (4), 409-427.
122. Brunauer, S.; Emmett, P. H.; Teller, E., Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *Journal of the American Chemical Society* **1938**, *60* (2), 309-319.

- 123.Naderi, M., Chapter Fourteen - Surface Area: Brunauer–Emmett–Teller (BET). In *Progress in Filtration and Separation*, Tarleton, S., Ed. Academic Press: Oxford, 2015; pp 585-608.
- 124.Bhattacharjee, S., DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* **2016**, 235, 337-351.
- 125.Laouini, A.; Jaafar-Maalej, C.; Limayem-Blouza, I.; Sfar, S.; Charcosset, C.; Fessi, H., Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology* **2012**, 1 (2), 147-168.
- 126.McNeil, S. E., Nanoparticle therapeutics: a personal perspective. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2009**, 1 (3), 264-271.
- 127.ANMAT, Farmacopea Argentina. In *Monografías de producto terminado y apartados.*, 7ma ed.; Ministerio de Salud de la Nación: Argentina, 2013; Vol. III, p 789.
- 128.Jolly, E. R.; Sloughfy, C. A., Clinical evaluation of baby oil. *J Soc Cosmet Chem* **1975**, 26, 227-34.
- 129.Tanaka, S.; Takashima, Y.; Murayama, H.; Tsuchiya, S., Solubility and distribution of dexamethasone acetate in oil-in-water creams and its release from the creams. *Chemical and pharmaceutical bulletin* **1985**, 33 (9), 3929-3934.
- 130.Magdassi, S.; Frenkel, M.; Garti, N., Correlation Between Nature of Emulsifier and Multiple Emulsion Stability. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **1985**, 11 (4), 791-798.
- 131.Choi, J. H.; Kim, J. H.; Li, Z.; Oh, H. J.; Ahn, K. Y.; Yoon, K. C., Efficacy of the mineral oil and hyaluronic acid mixture eye drops in murine dry eye. *Korean Journal of Ophthalmology* **2015**, 29 (2), 131-137.
- 132.Magdassi, S., Formation of oil-in-polyethylene glycol/water emulsions. *JOURNAL OF DISPERSION SCIENCE AND TECHNOLOGY* **1988** 9(4), 391-399.
- 133.Royer, G.; Lee, T.; Sokoloski, T., Entrapment of bioactive compounds within native albumin beads. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* **1983**, 37 (2), 34-37.
- 134.D'onofrio, G.; Oppenheim, R.; Bateman, N., Encapsulated microcapsules. *International journal of pharmaceuticals* **1979**, 2 (2), 91-99.
- 135.Rowe, R. C.; Sheskey, P. J.; Cook, W. G.; Fenton, M. E.; Association, A. P., Handbook of pharmaceutical excipients. **2012**.
- 136.Sweetman, S. C., Paraffins and Similar Bases. In *Martindale: the complete drug reference*, Pharmaceutical press London: 2009; Vol. 3709.
- 137.Brown, R. E.; Brockman, H. L., Using monomolecular films to characterize lipid lateral interactions. *Methods Mol Biol* **2007**, 398, 41-58.

138. Balci, M., 3 - Chemical Shift. In *Basic <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR Spectroscopy*, Balci, M., Ed. Elsevier Science: Amsterdam, 2005; pp 25-85.
139. Balci, M., Absorption and Resonance. In *Basic <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy*, Elsevier: 2005; Vol. Part II: <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy, pp 241-251.
140. Balci, M., Introduction. In *Basic <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy*, Elsevier: 2005; Vol. Part II: <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy, pp 235-239
141. Claridge, T. D. W., Chapter 4 - One-Dimensional Techniques. In *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry (Third Edition)*, Claridge, T. D. W., Ed. Elsevier: Boston, 2016; pp 133-169.
142. Karunakaran, C.; Santharaman, P.; Balamurugan, M., Chapter Two - <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. In *Spin Resonance Spectroscopy*, Karunakaran, C., Ed. Elsevier: 2018; pp 49-110.
143. Balci, M., 12 - Chemical Shift. In *Basic <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR Spectroscopy*, Balci, M., Ed. Elsevier Science: Amsterdam, 2005; pp 283-292.
144. Thoma, M.; Möhwald, H., Monolayers of dipalmitoylphosphatidylcholine at the oil-water interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1995**, 95 (2-3), 193-200.
145. Pichot, R.; Watson, R. L.; Norton, I. T., Phospholipids at the Interface: Current Trends and Challenges. *International Journal of Molecular Sciences* **2013**, 14, 11767-11794.
146. Campana, M.; Hosking, S. L.; Petkov, J. T.; Tucker, I. M.; Webster, J. R.; Zorbakhsh, A.; Lu, J. R., Adsorption of Bovine Serum Albumin (BSA) at the Oil/Water Interface: A Neutron Reflection Study. *Langmuir* **2015**, 31 (20), 5614-5622.
147. Beaman, D. K.; Robertson, E. J.; Richmond, G. L., Unique assembly of charged polymers at the oil-water interface. *Langmuir* **2011**, 27 (6), 2104-2106.
148. Gao, P.; Xing, X.; Li, Y.; Ngai, T.; Jin, F., Charging and discharging of single colloidal particles at oil/water interfaces. *Scientific Reports* **2014**, 4, 4778.
149. Aveyard, R.; Clint, J. H.; Nees, D.; Paunov, V. N., Compression and Structure of Monolayers of Charged Latex Particles at Air/Water and Octane/Water Interfaces. *Langmuir* **2000**, 16 (4), 1969-1979.
150. Johnson, M. C.; Saunders, L., Adsorption of phosphatidylcholine at the benzene-water interface. *Journal of Pharmaceutics and Pharmacology* **1971**, 23, 89S-94S.
151. Shimada, K.; Kawano, K.; Ishi, J.; Nakamura, T., Structure of Inclusion Complexes of Cyclodextrins with Triglyceride at Vegetable Oil/Water Interface. *Journal of Food Science* **1992**, 57 (3), 655-656.
152. Li, J.; Miller, R.; Möhwald, H., Characterisation of phospholipid layers at liquid interfaces 2. Comparison of isotherms of insoluble and soluble films of phospholipids at

different fluid/water interfaces. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1996**, *114* (0), 123-130.

153.Li, J.; Miller, R.; Wüstneck, R.; Möhwald, H.; Neumann, A. W., Use of pendant drop technique as a film balance at liquid/liquid interfaces. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1995**, *96* (3), 295-299.

154.Thoma, M.; Pfohl, T.; Moehwald, H., Thermodynamic Relation of an Insoluble Monolayer at the Oil/Water Interface and at the Air/Water Interface in Contact with Oil. *Langmuir* **1995**, *11* (8), 2881-2888.

155.Brooks, J. H.; Pethica, B. A., Properties of ionized monolayers. Part 6.-Film pressures for ionized spread monolayers at the heptane/water interface. *Transactions of the Faraday Society* **1964**, *60* (0), 208-215.

156.Mingins, J.; Taylor, J. A. G.; Pethica, B. A.; Jackson, C. M.; Yue, B. Y. T., Phospholipid monolayers at non-polar oil/water interfaces. Part 3.-Effect of chain length on phase transitions in saturated di-acyl lecithins at the n-heptane/aqueous sodium chloride interface. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases* **1982**, *78* (2), 323-339.

157.Sudheesh, S.; Ahmad, J., Effect of Wilhelmy Plate Material on Hysteresis of Langmuir Film Isotherms. *Asian Journal of Chemistry* **2013**, *25* (7), 3535.

158.Walder, R. B.; Honciuc, A.; Schwartz, D. K., Phospholipid Diffusion at the Oil–Water Interface. *Journal of Physical Chemistry B* **2010**, *114* (35), 11484–11488.

159.Ghanadzadeh Gilani, A.; Moghadam, M.; Zakerhamidi, M. S., Solvatochromism of Nile red in anisotropic media. *Dyes and Pigments* **2012**, *92* (3), 1052-1057.

160.Greenspan, P.; Fowler, S. D., Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. *J Lipid Res* **1985**, *26* (7), 781-9.

161.Mani, V.; Mohanty, K. K., Effect of the Spreading Coefficient on Three-Phase Flow in Porous Media. *Journal of Colloid and Interface Science* **1997**, *187*, 45–56.

162.Harkins, W. D.; Feldman, A., Films. The spreading of liquids and the spreading coefficient. *J. Am. Chem. Soc* **1922**, *44* (12), 2665–2685.

163.Miguel, V.; Perillo, M. A.; Villarreal, M. A., Improved prediction of bilayer and monolayer properties using a refined BMW-MARTINI force field. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2016**, *1858* (11), 2903-2910.

164.Zuo, Y. Y.; Chen, R.; Wang, X.; Yang, J.; Policova, Z.; Neumann, A. W., Phase Transitions in Dipalmitoylphosphatidylcholine Monolayers. *Langmuir* **2016**, *32* (33), 8501-8506.

165.Duncan, S. L.; Larson, R. G., Comparing Experimental and Simulated Pressure-Area Isotherms for DPPC. *Biophysical journal* **2008**, *94* (8), 2965-2986.

166. Perillo, M. a. A.; Garcia, D. A., Flunitrazepam induces geometrical changes at the lipid–water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2001**, *20* (1), 63-72.
167. Rideal, E. K.; Davies, J. T., *Interfacial phenomena*. 2nd ed.; Academic Press: London, 1963.
168. Lipowsky, R.; Sackmann, E., *Structure and dynamics of membranes: I. from cells to vesicles/II. generic and specific interactions*. Elsevier: 1995; Vol. 1.
169. Klopfer, K. J.; Vanderlick, T. K., Isotherms of Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) Monolayers: Features Revealed and Features Obscured. *Journal of colloid and interface science* **1996**, *182* (1), 220-229.
170. Maget-Dana, R., The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1999**, *1462* (1), 109-140.
171. McConlogue, C. W.; Vanderlick, T. K., A Close Look at Domain Formation in DPPC Monolayers. *Langmuir* **1997**, *13* (26), 7158-7164.
172. Fanani, M. L.; Wilke, N., Regulation of phase boundaries and phase-segregated patterns in model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2018**, *1860* (10), 1972-1984.
173. Schulman, J.; Cockbain, E., Part I. Molecular complex formation and the stability of oil in water emulsions. *Trans Faraday Soc* **1940**, *36*, 651.
174. Davies, J.; Mayers, G., Studies on the interfacial viscosities of monolayers. *Transactions of the Faraday Society* **1960**, *56*, 691-696.
175. Vold, M. J., Mechanism for the ultracentrifugal demulsification of O/W emulsions. *Langmuir* **1985**, *1* (1), 74-78.
176. Tadros, T. F., Stability of xylene-in-water emulsions in the presence of cetyltrimethyl ammonium bromide/cetyl alcohol mixtures. *Colloids and Surfaces* **1980**, *1* (1), 3-16.
177. Ghaicha, L.; Leblanc, R. M.; Villamagna, F.; Chattopadhyay, A. K., Monolayers of Mixed Surfactants at the Oil-Water Interface, Hydrophobic Interactions, and Stability of Water-in-Oil Emulsions. *Langmuir* **1995**, *11* (2), 585-590.
178. Ahmad, S. I.; Shinoda, K.; Friberg, S., Microemulsions and phase equilibria. Mechanism of the formation of so-called microemulsions studied in connection with phase diagram. *Journal of colloid and interface science* **1974**, *47* (1), 32-37.
179. Tadros, T. F., *Emulsions: Formation, stability, industrial applications*. Walter de Gruyter GmbH & Co KG: 2016.

180. Wiacek, A. E., Influence of dipalmitoylphosphatidylcholine (or dioleoylphosphatidylcholine) and phospholipase A2 enzyme on the properties of emulsions. *Journal of colloid and interface science* **2012**, 373 (1), 75-83.
181. Simon, S. A.; McIntosh, T. J., Interdigitated hydrocarbon chain packing causes the biphasic transition behavior in lipid/alcohol suspensions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1984**, 773 (1), 169-172.
182. Tenchov, B. G.; Yao, H.; Hatta, I., Time-resolved x-ray diffraction and calorimetric studies at low scan rates: I. Fully hydrated dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and DPPC/water/ethanol phases. *Biophysical journal* **1989**, 56 (4), 757.
183. Rowe, E. S., Thermodynamic reversibility of phase transitions. Specific effects of alcohols on phosphatidylcholines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1985**, 813 (2), 321-330.
184. Rowe, E. S., Lipid chain length and temperature dependence of ethanol-phosphatidylcholine interactions. *Biochemistry* **1983**, 22 (14), 3299-3305.
185. Takino, T.; Konishi, K.; Takakura, Y.; HASHIDA, M., Long circulating emulsion carrier systems for highly lipophilic drugs. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **1994**, 17 (1), 121-125.
186. Hörmann, K.; Zimmer, A., Drug delivery and drug targeting with parenteral lipid nanoemulsions — A review. *Journal of Controlled Release* **2016**, 223, 85-98.
187. Jiang, S.; Mottola, M.; Han, S.; Thiramanas, R.; Graf, R.; Lieberwirth, I.; Mailänder, V.; Crespy, D.; Landfester, K., Versatile Preparation of Silica Nanocapsules for Biomedical Applications. *Particle & Particle Systems Characterization* **2020**, 37 (4), 1900484.
188. Jiang, S.; Prozeller, D.; Pereira, J.; Simon, J.; Han, S.; Wirsching, S.; Fichter, M.; Mottola, M.; Lieberwirth, I.; Morsbach, S.; Mailänder, V.; Gehring, S.; Crespy, D.; Landfester, K., Controlling protein interactions in blood for effective liver immunosuppressive therapy by silica nanocapsules. *Nanoscale* **2020**, 12 (4), 2626-2637.
189. Kannan, R.; Nance, E.; Kannan, S.; Tomalia, D. A., Emerging concepts in dendrimer-based nanomedicine: from design principles to clinical applications. *J. Intern. Med.* **2014**, 276 (6), 579-617.
190. Heidel, J. D.; Davis, M. E., Clinical Developments in Nanotechnology for Cancer Therapy. *Pharm. Res.* **2011**, 28 (2), 187-199.
191. Lammers, T.; Kiessling, F.; Hennink, W. E.; Storm, G., Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *J. Controlled Release* **2012**, 161 (2), 175-187.
192. Wang, A. Z.; Langer, R.; Farokhzad, O. C., Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs. *Annu. Rev. Med.* **2012**, 63 (1), 185-198.

- 193.Xie, J.; Lee, S.; Chen, X., Nanoparticle-based theranostic agents. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2010**, *62* (11), 1064-1079.
- 194.Janib, S. M.; Moses, A. S.; MacKay, J. A., Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2010**, *62* (11), 1052-1063.
- 195.Bardhan, R.; Lal, S.; Joshi, A.; Halas, N. J., Theranostic nanoshells: from probe design to imaging and treatment of cancer. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (10), 936-946.
- 196.Lammers, T.; Aime, S.; Hennink, W. E.; Storm, G.; Kiessling, F., Theranostic nanomedicine. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (10), 1029-1038.
- 197.Yoo, D.; Lee, J.-H.; Shin, T.-H.; Cheon, J., Theranostic magnetic nanoparticles. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (10), 863-874.
- 198.Kim, J.; Piao, Y.; Hyeon, T., Multifunctional nanostructured materials for multimodal imaging, and simultaneous imaging and therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (2), 372-390.
- 199.Li, Z.; Barnes, J. C.; Bosoy, A.; Stoddart, J. F.; Zink, J. I., Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2590-2605.
- 200.Yang, P.; Gai, S.; Lin, J., Functionalized mesoporous silica materials for controlled drug delivery. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (9), 3679-3698.
- 201.Slowing, I. I.; Vivero-Escoto, J. L.; Wu, C.-W.; Lin, V. S. Y., Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60* (11), 1278-1288.
- 202.Maity, A.; Polshettiwar, V., Dendritic Fibrous Nanosilica for Catalysis, Energy Harvesting, Carbon Dioxide Mitigation, Drug Delivery, and Sensing. *ChemSusChem* **2017**, *10* (20), 3866-3913.
- 203.Tang, F.; Li, L.; Chen, D., Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Biocompatibility and Drug Delivery. *Adv. Mater.* **2012**, *24* (12), 1504-1534.
- 204.Wibowo, D.; Hui, Y.; Middelberg, A. P. J.; Zhao, C.-X., Interfacial engineering for silica nanocapsules. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2016**, *236*, 83-100.
- 205.Chang, F.-P.; Hung, Y.; Chang, J.-H.; Lin, C.-H.; Mou, C.-Y., Enzyme Encapsulated Hollow Silica Nanospheres for Intracellular Biocatalysis. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2014**, *6* (9), 6883-6890.
- 206.Chang, F. P.; Chen, Y. P.; Mou, C. Y., Intracellular Implantation of Enzymes in Hollow Silica Nanospheres for Protein Therapy: Cascade System of Superoxide Dismutase and Catalase. *Small* **2014**, *10* (22), 4785-4795.
- 207.Jiang, S.; Lv, L.; Li, Q.; Wang, J.; Landfester, K.; Crespy, D., Tailoring nanoarchitectonics to control the release profile of payloads. *Nanoscale* **2016**, *8* (22), 11511-11517.

208. Jiang, S.; Landfester, K.; Crespy, D., Control of the release of functional payloads from redox-responsive nanocapsules. *RSC Advances* **2016**, *6* (106), 104330-104337.
209. Fickert, J.; Rupper, P.; Graf, R.; Landfester, K.; Crespy, D., Design and characterization of functionalized silica nanocontainers for self-healing materials. *Journal of Materials Chemistry* **2012**, *22* (5), 2286-2291.
210. Wibowo, D.; Zhao, C.-X.; Middelberg, A. P., Emulsion-templated silica nanocapsules formed using bio-inspired silicification. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (77), 11325-11328.
211. Qian, K.; Shi, T.; He, S.; Luo, L.; Liu, X.; Cao, Y., Release kinetics of tebuconazole from porous hollow silica nanospheres prepared by miniemulsion method. *Microporous Mesoporous Mater.* **2013**, *169*, 1-6.
212. Hayashi, K.; Nakamura, M.; Ishimura, K., In situ synthesis and photoresponsive rupture of organosilica nanocapsules. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (5), 1518-1520.
213. Jiang, S.; Ma, B. C.; Reinholz, J.; Li, Q.; Wang, J.; Zhang, K. A.; Landfester, K.; Crespy, D., Efficient Nanofibrous Membranes for Antibacterial Wound Dressing and UV Protection. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (44), 29915-29922.
214. Chen, H.; He, J.; Tang, H.; Yan, C., Porous Silica Nanocapsules and Nanospheres: Dynamic Self-Assembly Synthesis and Application in Controlled Release. *Chem. Mater.* **2008**, *20* (18), 5894-5900.
215. Jakhmola, A.; Vecchione, R.; Guarnieri, D.; Belli, V.; Calabria, D.; Netti, P. A., Bioinspired oil core/silica shell nanocarriers with tunable and multimodal functionalities. *Adv. Healthcare Mater.* **2015**, *4* (17), 2688-2698.
216. Erni, P.; Dardelle, G.; Sillick, M.; Wong, K.; Beaussoubre, P.; Fieber, W., Turning coacervates into biohybrid glass: Core/shell capsules formed by silica precipitation in protein/polysaccharide scaffolds. *Angew. Chem.* **2013**, *125* (39), 10524-10528.
217. Hans, M.; Lowman, A., Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2002**, *6* (4), 319-327.
218. Philipse, A. P.; Van Bruggen, M. P.; Pathmamanoharan, C., Magnetic silica dispersions: preparation and stability of surface-modified silica particles with a magnetic core. *Langmuir* **1994**, *10* (1), 92-99.
219. Landfester, K., Polyreactions in miniemulsions. *Macromol. Rapid Commun.* **2001**, *22* (12), 896-936.
220. Hoshyar, N.; Gray, S.; Han, H.; Bao, G., The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine (London, England)* **2016**, *11* (6), 673-692.
221. Landfester, K., Synthesis of colloidal particles in miniemulsions. *Annu. Rev. Mater. Res.* **2006**, *36*, 231-279.



222. Staff, R. H.; Schaeffel, D.; Turshatov, A.; Donadio, D.; Butt, H. J.; Landfester, K.; Koynov, K.; Crespy, D., Particle Formation in the Emulsion-Solvent Evaporation Process. *Small* **2013**, *9* (20), 3514-3522.
223. Crespy, D.; Stark, M.; Hoffmann-Richter, C.; Ziener, U.; Landfester, K., Polymeric Nanoreactors for Hydrophilic Reagents Synthesized by Interfacial Polycondensation on Miniemulsion Droplets. *Macromolecules* **2007**, *40* (9), 3122-3135.
224. Dorresteijn, R.; Billecke, N.; Schwendy, M.; Pütz, S.; Bonn, M.; Parekh, S. H.; Klapper, M.; Müllen, K., Polylactide-block-Polypeptide-block-Polylactide Copolymer Nanoparticles with Tunable Cleavage and Controlled Drug Release. *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24* (26), 4026-4033.
225. Doyle, L. W.; Ehrenkranz, R. A.; Halliday, H. L., Dexamethasone treatment in the first week of life for preventing bronchopulmonary dysplasia in preterm infants: a systematic review. *Neonatology* **2010**, *98* (3), 217-224.
226. Cheng, R.; Feng, F.; Meng, F.; Deng, C.; Feijen, J.; Zhong, Z., Glutathione-responsive nano-vehicles as a promising platform for targeted intracellular drug and gene delivery. *J. Controlled Release* **2011**, *152* (1), 2-12.
227. Owens, D. E.; Peppas, N. A., Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International journal of pharmaceutics* **2006**, *307* (1), 93-102.
228. Winzen, S.; Schwabacher, J. C.; Müller, J.; Landfester, K.; Mohr, K., Small Surfactant Concentration Differences Influence Adsorption of Human Serum Albumin on Polystyrene Nanoparticles. *Biomacromolecules* **2016**, *17* (11), 3845-3851.
229. Zhou, M.; Du, X.; Li, W.; Li, X.; Huang, H.; Liao, Q.; Shi, B.; Zhang, X.; Zhang, M., One-pot synthesis of redox-triggered biodegradable hybrid nanocapsules with a disulfide-bridged silsesquioxane framework for promising drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B* **2017**, *5* (23), 4455-4469.
230. Quinn, J. F.; Whittaker, M. R.; Davis, T. P., Glutathione responsive polymers and their application in drug delivery systems. *Polym. Chem.* **2017**, *8* (1), 97-126.
231. Yang, C.; Guo, W.; Cui, L.; An, N.; Zhang, T.; Guo, G.; Lin, H.; Qu, F., Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@mSiO<sub>2</sub> core-shell nanocomposite capped with disulfide gatekeepers for enzyme-sensitive controlled release of anti-cancer drugs. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3* (6), 1010-1019.
232. Chwatko, G.; Kuźniak, E.; Kubalczyk, P.; Borowczyk, K.; Wyszczelska-Rokiel, M.; Głowacki, R., Determination of cysteine and glutathione in cucumber leaves by HPLC with UV detection. *Analytical Methods* **2014**, *6* (19), 8039-8044.
233. Lipsa, D.; Cacho, C.; Leva, P.; Barrero-Moreno, J.; Aguar, P., Development of a HPLC-UV method for the simultaneous determination of intracellular glutathione species in human cells. *J. Anal. Bioanal. Tech* **2015**, *6* (4).

234. Yoshida, T., Determination of reduced and oxidized glutathione in erythrocytes by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1996**, 678 (2), 157-164.
235. Appala, R.; Chigurupati, S.; Appala, R.; Krishnan Selvarajan, K.; Mohammad, J., A Simple HPLC-UV Method for the Determination of Glutathione in PC-12 Cells. *Scientifica* **2016**, 2016, 1-6.
236. Gotti, R.; Andrisano, V.; Cavrini, V.; Bongini, A., Determination of glutathione in pharmaceuticals and cosmetics by HPLC with UV and fluorescence detection. *Chromatographia* **1994**, 39 (1), 23-28.
237. Senft, A. P.; Dalton, T. P.; Shertzer, H. G., Determining Glutathione and Glutathione Disulfide Using the Fluorescence Probe o-Phthalaldehyde. *Analytical Biochemistry* **2000**, 280 (1), 80-86.
238. Hamad, A.; Elshahawy, M.; Negm, A.; Mansour, F. R., Analytical methods for determination of glutathione and glutathione disulfide in pharmaceuticals and biological fluids. *Reviews in Analytical Chemistry* **2019**, 38 (4), 20190019.
239. Fickert, J.; Schaeffel, D.; Koynov, K.; Landfester, K.; Crespy, D., Silica nanocapsules for redox-responsive delivery. *Colloid and Polymer Science* **2014**, 292 (1), 251-255.
240. Fung, B.; Khitrin, A.; Ermolaev, K., An improved broadband decoupling sequence for liquid crystals and solids. *J. Magn. Reson.* **2000**, 142 (1), 97-101.
241. Marsmann, H.; Raml, W.; Hengge, E., <sup>29</sup>Si-Kernresonanzmessungen an Polysilanen. 2. Isotetrasilane/<sup>29</sup>Si NMR Measurements on Polysilanes. 2. Isotetrasilanes. *Z. Naturforsch., B: Chem. Sci.* **1980**, 35 (12), 1541-1547.
242. Engelhardt, G.; Michel, D., *High-resolution solid-state NMR of silicates and zeolites*. 1987.
243. Massiot, D.; Fayon, F.; Capron, M.; King, I.; Le Calvé, S.; Alonso, B.; Durand, J. O.; Bujoli, B.; Gan, Z.; Hoatson, G., Modelling one- and two-dimensional solid-state NMR spectra. *Magn. Reson. Chem.* **2002**, 40 (1), 70-76.

*“La ciencia no es perfecta, con frecuencia se utiliza mal, no es más que una herramienta, pero es la mejor herramienta que tenemos, se corrige a sí misma, está siempre evolucionando y se puede aplicar a todo. Con esta herramienta conquistamos lo imposible”.*

*Carl Sagan*