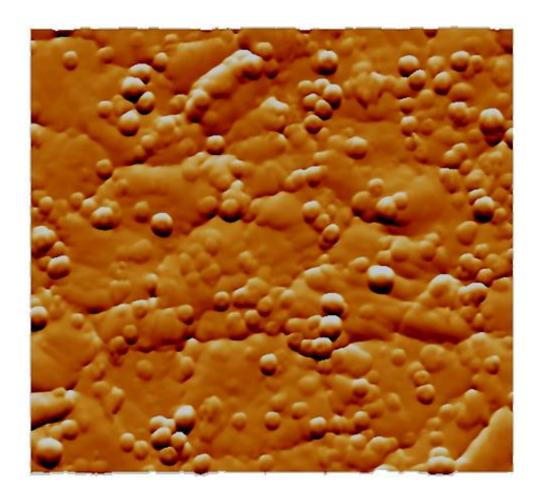
Capítulo 5

Bicapas de fosfolípidos soportadas sobre monocapas autoensambladas de ditiotreitol

> Las bicapas de DMPC se forman por fusión de vesículas sobre SAMs de DTT. El MB y FAD se emplean como sondas externas para verificar la calidad de las mismas y ZnPc como sonda interna.

Juan Donoso Cortés



"Come together"

The Beatles (1969)

5.1 Introducción

La base estructural de las membranas biológicas es la bicapa lipídica, la cual puede ser definida como una organización supramolecular consistente en un arreglo bidimensional constituido por moléculas de fosfolípidos.^[1, 2] Este conjunto de moléculas maximiza su estabilidad y se mantiene unido por los extremos de las cadenas hidrocarbonadas merced a las interacciones de van der Waals,^[3] formando de esta manera una bicapa. Según el modelo de mosaico fluido,^[1] aplicable a células eucariotas, la bicapa es una estructura bidimensional fluida en la que están insertadas y superficialmente asociadas diversas proteínas y péptidos que ejercen una gran diversidad de funciones (**Figura 5.1**).

Fluido extracelular

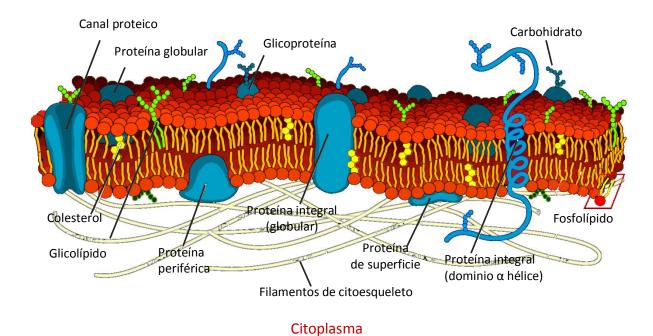


Figura 5.1. Esquema de una bicapa lipídica, donde se pueden apreciar distintos componentes como proteínas, glúcidos y lípidos.

Dado que la bicapa lipídica constituye una barrera de permeabilidad para iones y moléculas polares, su estabilidad es decisiva para el mantenimiento de la compartimentalización celular. La cohesión de la estructura y el establecimiento de un orden bidimensional de largo alcance, es consecuencia de las interacciones laterales entre las unidades de fosfolípidos. La estabilización de este sistema se produce principalmente por

dos contribuciones: la hidratación de los grupos funcionales constituyentes de las cabezas polares de los fosfolípidos y la consiguiente interacción de las moléculas de agua de las capas de hidratación con las fases acuosas compartimentalizadas por la membrana y, por otra parte, las interacciones de van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas. [3] Este tipo de organización está intrínsecamente relacionada con el diseño anfifílico de las moléculas de los fosfolípidos (Figura **5.2**). Estas moléculas tienen composición variable, mayoritariamente consisten en dos cadenas de ácidos grasos esterificadas con una molécula de glicerol, las cuales se unen a un grupo polar mediante un enlace fosfodiéster (Fig. 5.2a). Los grupos funcionales de las cabezas polares pueden tener carga positiva (etanolamina, colina, serina), negativa (fosfoderivados) o ser neutros (glicerol) de modo que la carga neta, teniendo en cuenta la carga negativa del grupo fosfato, resulta en general negativa o bien neutra (zwitterion). Las cadenas hidrofóbicas pueden tener distintos grados de insaturación, dependiendo de la funcionalidad de la membrana. [2]

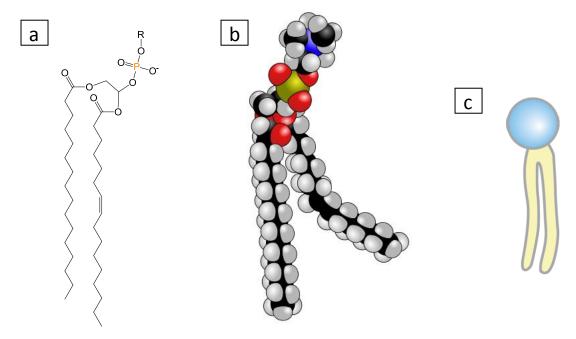


Figura 5.2. Representaciones de una molécula de fosfolípido. a) Fórmula química, donde R es el grupo funcional (etanolamina, colina, serina, glicerol, inositol bifosfato). b) Modelo estructural. c) Esquema habitual que resalta la cabeza polar (celeste) y las cadenas hidrofóbicas (amarillo).

Por su capacidad de autoorganización, los fosfolípidos han atraído la atención en la fabricación de sistemas biomiméticos para el estudio de propiedades básicas de membranas así como soporte de distinto tipo de macromoléculas en dispositivos de sensado, biocatálisis, transporte de fármacos, recubrimiento de implantes, etc.^[4]

5.1.1 Bicapas de fosfolípidos soportadas

Las bicapas de fosfolípidos pueden ser consideradas como sistemas modelo de las membranas celulares ya que preservan su fluidez bidimensional y pueden ser modificadas con proteínas de membrana, canales iónicos, receptores, transportadores y se pueden emplear en numerosas aplicaciones en el campo de la biotecnología. [4, 5] Los liposomas, en los cuales la composición, la estructura y la dinámica de los fosfolípidos pueden ser completamente controladas, son generalmente aceptados como modelos para estudios in vitro de las propiedades y estructura de las membranas celulares. [6, 7] Los liposomas son vesículas formadas por un bicapa lipídica, estructuralmente similar a la matriz lipídica de la membrana celular. Sin embargo, para un gran número de técnicas superficiales, como la microscopía de fuerzas atómicas (AFM) que permite el estudio morfológico y de propiedades mecánicas, es imprescindible la inmovilización de las bicapas lipídicas sobre una superficie sólida. [4, 8, 9]

Existen distintos métodos para inmovilizar fosfolípidos sobre sustratos sólidos de modo de obtener una bicapa soportada. [4, 8, 10] Entre los más ampliamente difundidos se encuentra la transferencia secuencial de dos monocapas desde la interfaz agua/aire por medio de la técnica de Langmuir-Blodgett (LB) y Langmuir-Schäfer (LS), [11] por esparción de bicapas^[12] y por fusión de vesículas.^[13] Si bien la transferencia LB provee una primera monocapa de buena calidad, la deposición de la segunda monocapa por esta misma técnica tiene inconvenientes que conllevan el desprendimiento de la primera monocapa depositada. La técnica de Langmuir-Schäfer^[14] involucra la transferencia de monocapas por deposición horizontal del sustrato paralelo a la superficie de la monocapa, brindando mejores resultados para la transferencia de la segunda capa de fosfolípidos. Esta metodología es muy útil, en especial para la formación de bicapas asimétricas, sin embargo, dado que se requiere un equipamiento especial (balanza de Langmuir-Blodgett) y un riguroso estudio de las condiciones para realizar una transferencia óptima, se han desarrollado estrategias más sencillas. En este sentido, el método de fusión de vesículas es el más ampliamente utilizado. Esta metodología, que involucra la adhesión y ruptura de las vesículas preformadas sobre una superficie suficientemente hidrofílica, será discutida en detalle en la siguiente sección.

Las membranas lipídicas soportadas sobre superficies de materiales inorgánicos, como oro, vidrio y mica, permiten por un lado obtener valiosa información relacionada con

la transición de fase, la estabilidad y la morfología de las capas y se las considera como estructuras prometedoras para el desarrollo de biosensores. [4, 8, 15] No obstante, las propiedades fisicoquímicas de las capas lipídicas sobre esta superficies son significativamente diferentes respecto de las membranas en su entorno natural fluido. [16, 17] Las monocapas autoorganizadas (SAMs) de alcanotioles constituyen una alternativa interesante para sortear este inconveniente, ya que actúan como un puente o espaciador que integra a la superficie inorgánica al ensamblado de las biomoléculas. La modificación de superficies metálicas con un espaciador molecular capaz de unirse a fosfolípidos de modo de formar bicapas permite alojar dominios hidrofílicos de proteínas o bien posibilita la transferencia de carga de un lado a otro de la membrana. [18, 19] En este sentido, existe un gran interés en soportar sistemas de bicapa en sustratos metálicos debido a que permite integrarlos a la amplia familia de los ya bien conocidos sensores electroquímicos.

Entre los sustratos metálicos, el oro es particularmente atractivo ya que es un material biocompatible e inerte y puede ser modificado por simple química de solución sin contaminaciones significativas. Se han empleado distintas estrategias para soportar bicapas de fosfolípidos sobre oro (Figura 5.3), las cuales de acuerdo a su diseño poseen distintas características respecto a su capacidad de barrera semipermeable y a la fluidez lateral de la bicapa, las cuales son propiedades fundamentales de las membranas biológicas.

Es posible formar bicapas directamente sobre la superficie de oro (**Fig. 5.3a**) mediante la combinación de técnicas LB y LS. [20] Por el contrario, se ha observado que la fusión espontánea de vesículas sobre esta superficie no es exitosa debido a su pobre hidrofilicidad. [21, 22] En efecto, si bien las vesículas consiguen adherirse, es necesario inducir la fusión mediante algún paso adicional. Así, el grupo de Lipkowski ha obtenido la fusión de vesículas sobre oro mediante la aplicación de un potencial en la superficie. [23, 24]

Otra estrategia para lograr la fusión consiste en modificar adecuadamente la superficie del oro aumentando su hidrofilicidad. Como se discutió en el Capítulo 3, el oro puede ser recubierto con SAMs de alcanotioles con funcionalidad hidrofílica (-OH, -COOH, -NH₂) de modo de proporcionar una superficie apta para la fusión de vesículas (**Fig. 5.3b**). Algunos autores^[25, 26] han reportado resultados favorables empleando SAMs de tioles de cadena larga ($C_n > 11$) ya sea utilizando una única funcionalidad o bien una mezcla de ellas (SAMs mixtas). Otro ejemplo en esta dirección es la modificación de la superficie con polímeros^[27]

(**Fig. 5.3c**), de modo de imitar ya sea el citoesqueleto o bien la matriz extracelular, un ambiente más similar al entorno natural de las bicapas lipídicas.

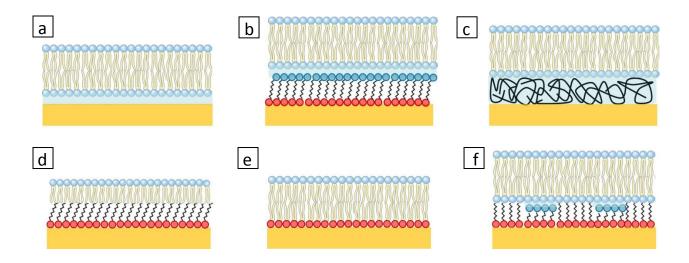


Figura 5.3. Modelos de bicapas lipídicas soportadas sobre oro. a) Bicapas sobre oro con capa de hidratación intermedia, b) bicapas sobre alcanotioles con grupos terminales hidrofílicos, c) bicapas sobre polímeros, d) bicapas híbridas alcanotiol/fosfolípido, e) bicapas híbridas tiofosfolípido/fosfolípido y f) bicapas "ancladas". En rojo se muestran los grupos tiol, en azul los grupos polares y en amarillo el sustrato de oro.

En los modelos planteados hasta el momento (Fig. 5.3 a-c), las bicapas se encuentran "libres", es decir, no poseen una conexión covalente con el sustrato, existiendo una capa de hidratación de ~10 Å entre la bicapa y el sustrato. [15] Para algunos estudios o aplicaciones, es necesario contar con una bicapa que actúe como barrera para la permeación de iones inorgánicos, lo cuales podrían difundir a través de la capa de hidratación. Con este objetivo se desarrollaron bicapas "híbridas", las cuales cuentan con una SAM que expone una superficie hidrofóbica a la cual se le deposita una monocapa de fosfolípidos ya sea por la técnica LB o LS o bien por fusión y ruptura de vesículas. [15] Las SAMs pueden ser de alcanotioles [28] (Fig. 5.3d), típicamente de $C_n > 12$ para minimizar los defectos expuestos en la superficie. En otros casos, con el fin de lograr mayor "biosimilitud" en cuanto a la interacción entre cadenas hidrofóbicas, se puede recurrir al empleo de SAMs de tiofosfolípidos [29] (Fig. 5.3e), que consisten en moléculas de fosfolípidos a las cuales se les ha añadido un grupo tiol por medio de síntesis orgánica. En ambos casos (Fig. 5.3 d-e), la fluidez lateral de la bicapa se ve comprometida respecto de los modelos de bicapa "libre" (Fig. 5.3 a-c), ya que la monocapa inferior está fuertemente restringida por el sustrato. Un modelo más versátil está constituido por las bicapas "ancladas" [30] (Fig. 5.3f), el cual posee una SAM

completa o mixta de tiofosfolípidos de espaciador largo. Las SAMs mixtas poseen además de estos tiofosfolípidos, alcanotioles de funcionalidad hidrofílica de modo que la bicapa sólo está conectada por algunas zonas al sustrato, conservando así la fluidez lateral y algunos reservorios de solvente de hidratación.

El empleo de un espaciador de cadena larga en sensores de tipo electroquímico, como los que se muestran en la **Fig. 5.3b,d-f**, trae como consecuencia una disminución considerable en la eficiencia de la transferencia de electrones entre el sustrato y las especies electroactivas que se deseen detectar. Por lo tanto, el uso de un espaciador de cadena corta que torne la superficie del oro lo suficientemente hidrofílica para permitir la fusión de vesículas y que a su vez no constituya una barrera para la transferencia de electrones sería la opción más atractiva para construir un biosensor electroquímico.

Desafortunadamente, las SAMs de alcanotioles de cadena corta, como el 2-mercaptoetanol, [32] el ácido mercaptoacético o la cisteamina, [33] tienen una baja estabilidad respecto de la desorción reductiva lo que estrecha su rango de uso en relación a su empleo al sensado electroquímico. Por el contrario, las SAMs de ditiotreitol (DTT) estudiadas en el Capítulo 3 poseen una mayor estabilidad y son adecuadas para estudios de transferencia de carga según se constató en el Capítulo 4. En este capítulo demostraremos que las SAMs de DTT sobre oro también proveen una superficie adecuada para la formación de bicapas por fusión de vesículas siendo pues una buena alternativa para la construcción de sensores electroquímicos.

5.1.2 Fusión de vesículas

Cuando una suspensión de fosfolípidos se dispersa mecánicamente en una solución acuosa, éstos pueden autoorganizarse en distintas formas esféricas, como micelas o liposomas, o bien formando láminas de bicapas (**Figura 5.4**). El tipo de estructura alcanzada por un fosfolípido puro o bien por una mezcla de ellos depende de diversos factores incluyendo la longitud y número de cadenas de ácidos grasos, el grado de insaturación y la temperatura. ^[2] En estas estructuras, el efecto hidrofóbico causa que las cadenas de ácidos grasos se agreguen y excluyan a las moléculas de agua del interior. ^[3] La formación de micelas (**Fig. 5.4a**) está favorecida cuando la sección transversal del grupo cabeza polar es mayor que

la región lipídica, como ocurre con los lisofosfolípidos que poseen sólo una cadena hidrocarbonada. La mayor parte de los fosfolípidos presentes en las células, en los cuales las secciones transversales polares e hidrofóbicas son similares, forman espontáneamente bicapas de aproximadamente 3 nm de espesor^[34] (**Fig. 5.4c**). Para evitar que las regiones hidrofóbicas expuestas en los bordes estén en contacto con el agua, las bicapas se pliegan para formar vesículas esféricas con un compartimiento acuoso en su interior (**Fig. 5.4b**).

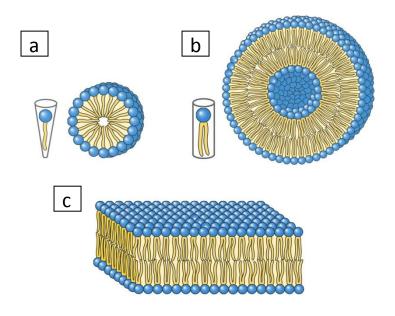


Figura 5.4. Vistas transversales de estructuras formadas por fosfolípidos. a) Micela, b) vesícula o liposoma y c) bicapa lipídica. (Adaptado de *Lehninger Principles of Biochemistry* 5 ed. [34]).

El tamaño de las vesículas depende de su forma de preparación, con diámetros que varían desde 25 nm^[35] hasta cientos de micrones (vesículas gigantes). ^[36] La lamelaridad, que se refiere al número de bicapas contenidas en una única vesícula, es una propiedad que también está controlada por el método de preparación. ^[37] Algunos métodos favorecen la producción de vesículas unilamelares mientras que otros resultan en la formación de vesículas con estructura de múltiples capas concéntricas (como una cebolla) denominadas multilamelares. Las vesículas multilamelares son las más sencillas de fabricar y poseen entre 0,1 y 10 µm y consisten en 5 o más bicapas concéntricas. ^[37] A partir de estas vesículas pueden obtenerse vesículas unilamelares sometiéndolas a agitación por vortex o sonicación, extrusión a través de filtros de policarbonato, ciclos de enfriamiento/calentamiento, inyección de etanol o uso de detergentes, entre otros. ^[37]

La fusión de membranas biológicas es un proceso espontáneo, aunque altamente regulado, que involucra la unión de dos vesículas separadas y la mezcla de su contenido acuoso. Dado que dichas vesículas son entidades estables, para que esta unión tenga lugar debe producirse un grado de estrés en la curvatura, tal que el nuevo sistema posea un nivel energético menor. En las células este proceso está mediado por péptidos y proteínas que promueven la agregación y el reordenamiento de la bicapa. [38]

En contacto con un sustrato, el cambio en la forma de una vesícula adsorbida se puede comparar con la gota de un líquido adhiriéndose a una superficie. Una forma simple de evaluar la unión y la estabilidad de las vesículas adsorbidas en la superficie fue desarrollada teóricamente por Seifert y Lipowsky. [39] Estos autores proponen que el balance entre el aumento en la energía de adhesión (determinada por el área de adhesión) y el costo energético en la curvatura de las vesículas (dado por la flexibilidad de la bicapa) determina la adsorción, la deformación y la ruptura de las vesículas.

A través de numerosas observaciones experimentales con distintas técnicas, entre las cuales caben destacar la microbalanza de cristal de cuarzo (QCM)^[22] y AFM,^[40] se puede describir el mecanismo de fusión de vesículas en una serie de pasos resumidos en la **Figura 5.5**.

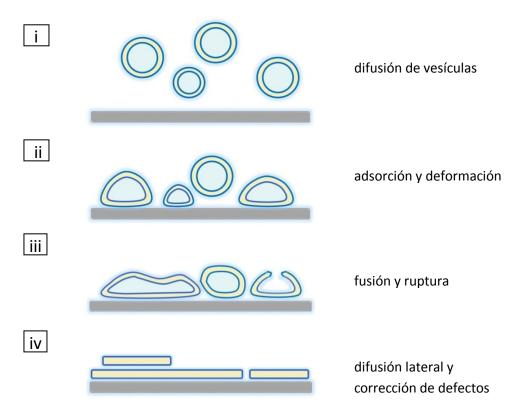


Figura 5.5. Mecanismo propuesto para la fusión de vesículas sobre una superficie.

Inicialmente las vesículas difunden desde la solución próxima a la superficie (**Fig. 5.5i**), con un coeficiente de difusión que puede ser aproximado por el modelo de Stokes-Einstein^[41] para la difusión de esferas rígidas. Una vez cerca de la superficie comienza la adsorción y procede hasta alcanzar una concentración crítica de vesículas adheridas (**Fig. 5.5ii**). Esencialmente, este requerimiento refleja la deformación de las vesículas debido a la adsorción y las interacciones estéricas entre ellas. La disminución en el radio de curvatura en los bordes de la zona de adhesión inicia un mecanismo de formación de poros que se propagan por la acción "catalítica" de los extremos hidrofóbicos provocando la unión de vesículas vecinas o bien la apertura de las mismas (**Fig. 5.5iii**). Las vesículas rotas difunden cerca de la superficie y su coeficiente de difusión ya no puede ser aproximado por el modelo de Stokes-Einstein ya que está afectado por las fuerzas atractivas de la superficie. Finalmente las islas de bicapas difunden lateralmente para minimizar la exposición de bordes hidrofóbicos, así como más vesículas pueden adsorberse de modo de cubrir por completo la superficie (**Fig. 5.5iv**).

Para completar esta simple descripción resta mencionar el efecto cooperativo entre vesículas vecinas así como la distribución dinámica de las especies lipídicas. Para la formación de bicapas es necesaria una concentración crítica, debajo de la cual las vesículas permanecen intactas. Este efecto es independiente del tamaño de las vesículas y está más bien relacionado con las interacciones estéricas (empaquetamiento de vesículas) que promueven su deformación. Una vez superado este valor crítico, la cinética de la fusión dependerá de la naturaleza del fosfolípido, o la mezcla de fosfolípidos si es el caso, siendo la temperatura y la presión osmótica los factores que más afectarán la velocidad del proceso. Durante la fusión pueden ocurrir fenómenos de redistribución de las moléculas de fosfolípidos, pero en general, la mayor parte de las moléculas presentes en la superficie externa de la bicapa soportada son aquellas que se encontraban en la capa interna de la vesícula.

Por último, el papel que juega el soporte sólido es el más debatido en la literatura, en particular su importancia en determinar la eficacia para la formación de las bicapas. Diferentes trabajos señalan que la hidrofilicidad es necesaria pero no una condición suficiente para favorecer la ruptura de las vesículas. Entre los sustratos más comúnmente empleados se encuentran la mica y los materiales derivados del silicio como el vidrio, Si_3N_4 o

SiO₂.^[45] El estado de hidroxilación de las superficies de SiO₂ varía considerablemente en función del tratamiento de la superficie tal como la exposición a altas temperaturas o a soluciones básicas, influyendo la carga y otras propiedades fisicoquímicas del soporte, así como también creando heterogeneidades locales que se transmiten a la bicapa soportada.^[45] Respecto de la rugosidad de la superficie, además de la formación sobre superficies atómicamente planas como la mica, es notable la formación de bicapas sobre sustratos de extrema rugosidad y porosidad en la nanoescala.^[46-48]

5.1.3 Objetivos del presente capítulo

Se buscará promover la fusión de vesículas de DMPC sobre la superficie hidrofílica provista por las SAMs de DTT sobre sustratos de oro con terrazas (111), policristalinos y nanoestructurados. La caracterización de las bicapas sobre sustratos planos se llevará a cabo mediante microscopía de fuerzas atómicas (AFM) in situ. Además de esta técnica local, se evaluará globalmente la fluidez y la presencia de defectos mediante el uso de dos sondas moleculares. Como sonda de fluidez se empleará el azul de metileno (MB), que es capaz de intercalarse entre cadenas hidrocarbonadas (Capítulo 4). Por otro lado, el dinucleótido de Flavina-Adenina (FAD), que posee un carácter más hidrofílico y sólo puede detectarse si existen defectos en la barrera (Capítulo 4), permitirá evaluar la presencia de poros o discontinuidades en la bicapa. En último lugar, se utilizarán vesículas de DMPC a las cuales se les incorporó durante su preparación una molécula hidrofóbica (ftalocianina de Zn) con propiedades ópticas y redox, analizando sus características para la transferencia de carga y su posible cuantificación mediante métodos electroquímicos.

5.2 Experimental

5.2.1 Sustratos de oro

Se utilizaron películas delgadas de Au evaporado sobre vidrio borosilicato "Robax" provistas por la firma Arrandee® de Werther, Alemania. Estas placas de oro se sometieron a un tratamiento térmico con llama de gas butano o hidrógeno para obtener la orientación preferencial (111), como ya se describió en el Capítulo 3 (sección 3.2.1), así como algunas de

ellas se emplearon sin el tratamiento térmico (policristalinas). Para estudios de espectroscopía Raman amplificada por superficies (SERS), se emplearon sustratos de oro nanoestructurados preparados en el laboratorio mediante un método electroquímico, ^[49] según se describió en el Capítulo 4 (sección 4.2.1).

5.2.2 Reactivos

El ditiotreitol (DTT), el ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico (HEPES) y el dinucleótido de Flavina-Adenina (FAD) fueron adquiridos de la marca Sigma. La dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) se adquirió de Avanti Polar Lipids y el azul de metileno (MB) se adquirió de Merck (grado Reag. Ph Eur). El 2,3,9,10,16,17,23,24-octakis[(N,N-dimetilamino)etilsulfanil]ftalocianinato de Zinc (II) (ZnPc) fue provisto y sintetizado por la Ing. Virginia Diz (perteneciente al grupo de Fotoquímica del Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física de INQUIMAE-UBA) según métodos descriptos en literatura. [50] El resto de los reactivos y solventes empleados fueron del mejor grado analítico disponible. Para las soluciones acuosas se empleó siempre agua MilliQ (18,2 MΩ).

5.2.3 Preparación de SAMs de DTT

Las SAMs de DTT se formaron por inmersión de las placas de Au en soluciones etanólicas 5mM durante 30 min a 60 °C. Después de este periodo, se las enjuagó con abundante etanol absoluto. Los restos de solvente se removieron por secado en un flujo de N₂.

5.2.4 Preparación de vesículas de DMPC

Las vesículas de DMPC se obtuvieron a partir de una solución de fosfolípido 10 mg/mL en cloroformo. El solvente se evaporó bajo una corriente de nitrógeno para formar una película sobre las paredes de un balón de vidrio. Las trazas de solvente restantes se eliminaron dejando el recipiente en un desecador conectado a una bomba de vacío. La película seca se reconstituyó con buffer HEPES 10 mM + NaCl 0,9% pH 7,4 y se sometió a agitación con vortex. La mezcla de vesículas multilamelares así obtenida, se sonicó brevemente y se pasó por un filtro de policarbonato de 400 nm de poro (Nuclepore) para formar vesículas unilamelares.

Las vesículas de DMPC contiendo ZnPc se obtuvieron con un procedimiento similar excepto que a la solución de fosfolípido inicial se le añadió ZnPc disuelta en tetrahidrofurano (THF) (~ 0,8 μg ZnPc/g DMPC). Para separar las moléculas de ZnPc libres de las vesículas unilamelares se realizó una cromatografía por permeación en gel en una columna de Sephadex G-50 usando el método de centrifugación en mini-columna. [50] La preparación de estas vesículas y su caracterización fotoquímica estuvieron a cargo de la Ing. Virginia Diz.

5.2.5 Preparación de bicapas de DMPC

Los sustratos de Au con o sin una SAM de DTT se sumergieron en una suspensión 10 mg/mL de vesículas unilamelares de DMPC durante al menos 90 min a 30 °C – 37 °C para permitir la fusión de vesículas. Luego de este periodo las placas se enjuagaron repetidas veces con buffer HEPES 10 mM + NaCl 0,9% para remover el material sin unir.

También se emplearon como sustratos para la formación de bicapas discos de 9,5 mm de diámetro de mica muscovita de grado V-1 (la más alta calidad disponible) de SPI Supplies[®]. Los sustratos de mica fueron exfoliados por eliminación de las capas superiores con una cinta adhesiva e inmediatamente sumergidos en la suspensión de vesículas.

Los sustratos modificados no se secaron bajo corriente de N_2 para evitar la posible ruptura o deformación de las bicapas y conservaron su humedad superficial durante su manipulación al aire. Para las medidas electroquímicas, a los sustratos de oro se les soldó previamente un alambre de oro que sirvió como contacto eléctrico, y este sí se secó mediante un papel absorbente antes de su conexión a la celda electroquímica.

5.2.6 Medidas de AFM y STM

Las medidas de AFM en modo contacto se llevaron a cabo en un microscopio PicoScan (Molecular Imaging) dentro de una celda de fluidos con control de temperatura (in situ), conteniendo buffer HEPES 10 mM + NaCl 0,9% pH 7,4. Se emplearon puntas de Si₃N₄ (cantilevers triangulares con constante elástica 0,12 N/m, Veeco Probes). Las imágenes se analizaron usando el programa VS x M 2,1 (Nanotec Electrónica).

Se realizaron además medidas in situ a temperatura ambiente en un microscopio Nanoscope V (Digital Instruments, Inc.) también en modo contacto, empleando también puntas de Si₃N₄ (cantilevers triangulares de 0,12 N/m, Veeco Probes). El programa de análisis de las imágenes fue el provisto por la empresa fabricante (versión 7.30).

Las medidas de STM se realizaron con un microscopio Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Inc.), empleando puntas comerciales de Pt/Ir y *scanners* que permiten barrer un campo máximo de unos 10 μ m. Se usaron voltajes túnel V_T positivos entre 0,1 y 0,5 V y corrientes de 0,5 - 1 nA. También en este caso se empleó el programa provisto por Veeco (versión 7.30).

5.2.7 Medidas electroquímicas

Las medidas de voltamperometría cíclica se realizaron con un potenciostato con capacidad de adquisición digital de datos. Se empleó una celda electroquímica de vidrio de tres electrodos. Como referencia se utilizaron electrodos de calomel saturado (SCE) y de Ag/AgCl preparados en el laboratorio, cuyos valores fueron contrastados con un SCE comercial de la marca Metrohm. El contraelectrodo fue una lámina de Pt de gran área y como electrodos de trabajo se emplearon las placas de Au modificadas. Las soluciones electrolíticas utilizadas consistieron en buffer fosfato 0,1 M pH 7,4 y H₂SO₄ 0,5 M, todas desoxigenadas mediante burbujeo de N₂ antes de medir. Además se utilizaron soluciones acuosas mixtas de FAD y MB en buffer fosfato 0,1 M a pH 7,4.

Todas las medidas están expresadas en densidad de corriente (*j*) respecto del área electroquímica del electrodo de oro, calculada a partir del pico de reducción del óxido de oro, excepto en las medidas de cuplas redox en solución donde se refirieron al área geométrica. Los voltamperogramas cíclicos que se muestran en este capítulo son representativos del comportamiento promedio observado mientras que los datos de densidad de carga son resultado del promedio de al menos 5 medidas independientes.

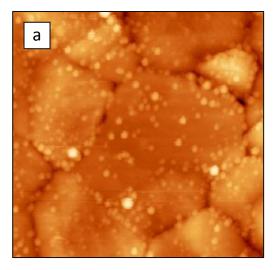
5.2.8 Medidas de SERS

Se hicieron medidas de Raman ex situ e in situ en un espectrómetro triple Jobin–Yvon T64000 operando en modo sustractivo y equipado con un dispositivo acoplado para enfriamiento con N_2 líquido. Las moléculas se excitaron con un laser de iones Ar-Kr empleando energías entre 1,834 eV (676 nm) y 2,707 eV (458 nm). Típicamente se usaron potencias de 10 mW concentradas en una línea de foco de 7 mm de largo y \sim 100 mm de

profundidad para evitar la degradación de las muestras inducida por fotones. Esta degradación (*photobleaching*) fue siempre < 5 % después de 100 s de adquisición de datos. Para evitar la acumulación de este efecto, se tomaron espectros en diferentes zonas de la muestra. Además, antes de cada medida se hicieron mapas espectrales de toda la superficie con bajas potencias y tiempos cortos de adquisición para excluir zonas de intensidades Raman demasiado distintas al valor promedio.

5.3 Fusión de vesículas de DMPC sobre SAMs de DTT

Si se pone en contacto una suspensión de vesículas de DMPC sobre sustratos de oro orientados (111) durante 3 h a 30 °C se puede observar que simplemente se adsorben sobre la superficie (**Figura 5.6**). Las imágenes de AFM in situ (**Fig. 5.6a**) muestran vesículas de entre 100 y 200 nm distribuidas al azar en la superficie del oro, con alguna acumulación preferencial en los bordes de grano. Si se examina con mayor detalle (**Fig. 5.6b**), además de la sección circular, algunas de ellas aparecen deformadas en el centro por la interacción con la punta. Esta apariencia cóncava ha sido pocas veces reportada^[52] y denota la elasticidad de las vesículas. Es necesario aplicar fuerzas mayores para formar poros e inducir su ruptura mecánica.



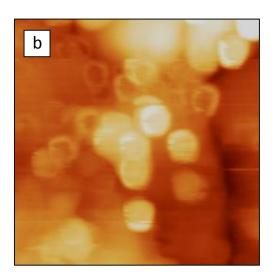


Figura 5.6. a) Imagen de AFM in situ en modo contacto de 4,5 μ m x 4,5 μ m de la superficie de Au(111) después de la inmersión en una suspensión de vesículas de DMPC durante 3 h (Z = 100 nm). b) Imagen de 1,5 μ m x 1,5 μ m donde se pueden observar en detalle las vesículas, algunas aparecen deformadas por la interacción con la punta (Z = 40 nm).

Por otro lado, si la suspensión de vesículas se pone en contacto durante 60 min a 30 °C con una superficie de mica recién exfoliada el comportamiento difiere respecto de la superficie de oro (Figura 5.7a). La mica es una superficie plana a nivel atómico y según se discutió en la sección 5.1.2 su química superficial permite la formación de bicapas por fusión espontánea de vesículas.^[53] La imagen de AFM in situ muestra una zona completamente cubierta por una bicapa de DMPC sobre la cual se pueden apreciar algunas vesículas deformadas y parches de bicapa (algunas de ellas señaladas con flechas en la Fig. 5.7a) cuyo perfil característico se muestra en la Fig. 5.7b. Estas vesículas y parches adicionales que forman multicapas pueden ser removidos por enjuagues adicionales ya que se encuentran débilmente adsorbidos sobre la cara superior de la bicapa soportada sobre la mica.

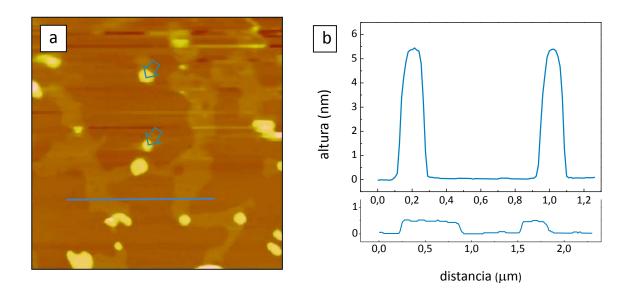
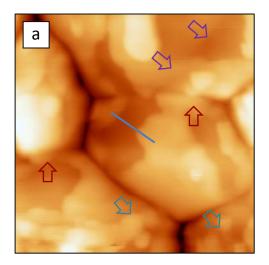


Figura 5.7. a) Imagen de AFM in situ en modo contacto de 4 μ m x 4 μ m de la superficie de mica después de la inmersión en una suspensión de vesículas de DMPC durante 60 min (Z = 10 nm) tomada a ~25 °C. b) Perfiles de altura de los discos de bicapas (*sup.*) y de dominios de diferente fase para la traza horizontal en a) (*inf.*).

En la bicapa inferior, en contacto con la superficie de mica, pueden observarse zonas con distinto contraste (**Fig. 5.7a**), cuya diferencia de altura es de tan sólo 0,5 nm. Estas zonas corresponden a dominios de distintas fases para DMPC, cuya proporción depende de la temperatura. Por debajo de los 22 °C, la bicapa se encuentra puramente en estado "gel" (mayor altura) mientras que por encima de los 32 °C, la fase predominante es "líquida" (menor altura). [53] Por lo tanto, a la temperatura en que se tomó la imagen (~ 25 °C) se puede observar una coexistencia entre ambas fases.

Para formar bicapas sobre la superficie de Au(111) modificado con una SAM de DTT se empleó el mismo procedimiento que el seguido para la formación de bicapas a partir de fusión de vesículas sobre mica (60 min de inmersión a 30 °C). La superficie de Au de esta manera expone grupos –OH según se discutió en el Capítulo 3, ofreciendo una superficie hidrofílica que podría permitir la fusión. La **Figura 5.8a** muestra la formación de parches de bicapas cuyo perfil de altura característico (**Fig. 5.8b**) corresponde a ~ 5nm. Este valor está de acuerdo a los datos de espesor de bicapa de DMPC reportados en literatura, los cuales oscilan entre 4,2 - 5 nm. [53,54] En la zona inferior de la imagen seleccionada puede apreciarse además algunas vesículas en proceso de fusión (indicadas con flechas celestes en la **Fig. 5.8a**).



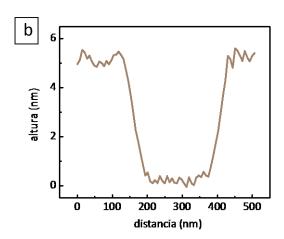


Figura 5.8. a) Imagen de AFM in situ en modo contacto de 2,5 μ m x 2,5 μ m de la superficie de Au(111) modificada con una SAM de DTT después de la inmersión en una suspensión de vesículas de DMPC durante 60 min (Z = 20 nm) tomada a 22 °C. b) Perfil de altura de la bicapa de DMPC para la traza mostrada en a).

Por otro lado, se seleccionó una zona totalmente cubierta por la bicapa y se le aplicó a un sector de 1 μ m x 1 μ m una fuerza mayor con la punta del AFM de modo de remover el material (zona superior derecha de la **Fig. 5.8a**). Para llevar a cabo este procedimiento se barrió al menos 5 veces la zona a \sim 18 °C, de modo de favorecer la fase "gel" y disminuir la difusión lateral de la bicapa. Esta zona "limpia" revela un escalón (indicado con la flecha superior violeta) cuya topografía se transmite a la bicapa de DMPC (flecha inferior violeta). Sin embargo, los bordes de grano constituyen grietas profundas en las cuales la bicapa podría discontinuarse. Algunos de estos bordes aparecen cubiertos (indicados con flechas

rojas en la **Fig. 5.8a**), no obstante en la mayoría de los bordes evaluados la bicapa pareciera interrumpirse.

Si bien es evidente que la SAM de DTT favorece la formación de las bicapas (comparando la **Fig. 5.8** con la **Fig. 5.6**) se intentó mejorar el cubrimiento de la superficie por la bicapa aumentando el tiempo de contacto del sustrato con la suspensión de vesículas a 90 min y la temperatura a ~ 37 °C. Además, se sustituyó el sustrato tratado térmicamente por el oro sin tratamiento térmico para eliminar el efecto observado en los borde de grano. En la **Figura 5.9a** se puede observar el resultado para la bicapa de DMPC formada sobre un sustrato de oro policristalino modificado con una SAM de DTT.

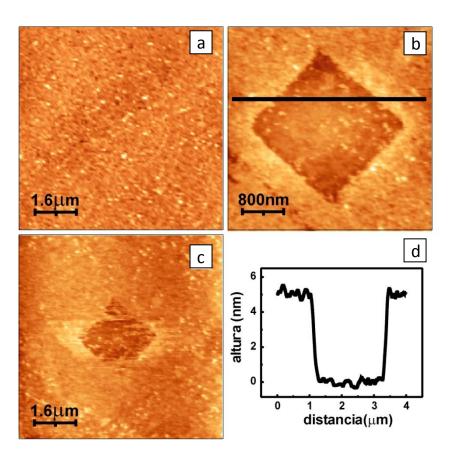


Figura 5.9. Imágenes de AFM en modo contacto de la bicapa de DMPC formada sobre la SAM de DTT sobre oro policristalino. a) Área de 7,5 μ m x 7,5 μ m cubierta con la bicapa lipídica a 18 °C (Z = 10 nm). b) Ventana cuadrada de 2 μ m x 2 μ m definida por la remoción de la bicapa por medio de la punta de AFM a 18 °C. c) Bicapa de DMPC volviendo a cubrir la superficie de la ventana cuadrada, tomada 120 s después de la imagen en b) a 20 °C. d) Perfil de la sección transversal correspondiente a la traza de la imagen en b).

En todas las zonas examinadas se pudo observar un cubrimiento completo de la superficie, es decir, con ausencia de discontinuidades. Para demostrar la presencia de la

bicapa se recurrió al procedimiento de remoción de una zona de la misma abriendo una ventana con la punta del AFM de modo de evaluar el espesor (Fig. 5.9b). El perfil de altura (Fig. 5.9d) revela un espesor similar al hallado en la superficie del Au(111) modificado (Fig. 5.8b). Al retornar a la zona de la imagen inicial (Fig. 5.9a,c), aumentando paulatinamente la temperatura, se puede observar cómo la zona removida comienza a cubrirse por difusión lateral impulsada por el efecto hidrofóbico, la cual en parte está favorecida por el movimiento de la punta al tomar la imagen. La ventana formada no llega a cerrarse completamente ya que la difusión está autolimitada debido a que se perderían las interacciones intermoleculares en el resto de la bicapa y no hay disponible material adicional para volver a cubrir por completo esta zona.

Se utilizaron las medidas de AFM a fin de estimar un coeficiente de difusión de la bicapas sobre el sustrato de DTT-oro mediante la toma secuencial de imágenes cronometrada, previamente a que cese por completo el movimiento lateral. La relación de Einstein para la difusión de fluidos interfaciales^[55] establece:

$$D = \frac{x^2}{2\Delta t} \tag{5.1}$$

donde D es el coeficiente de difusión para un desplazamiento neto x en un intervalo de tiempo Δt . Siguiendo el frente de desplazamiento para imágenes tomadas a distintos tiempos se obtiene un valor promedio $D \approx 10^{-11} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, que es comparable al estimado por medidas de FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*, recuperación de la fluorescencia tras el fotoblanqueo) para liposomas de DMPC marcados con sondas fluorescentes, con valores de 1,5 x $10^{-11} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ a 9,6 °C y 2,0 x $10^{-10} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ a 22,5 °C sobre sustratos de vidrio. [56]

5.4 Interacción con MB y FAD

En la sección 5.3 se demostró mediante medidas de AFM la formación de una bicapa fluida de DMPC sobre los sustratos de oro modificados con una SAM de DTT. Sin embargo, si bien valiosa, esta técnica sólo brinda información local. Por lo tanto para caracterizar las

propiedades promedio de la bicapa recurriremos a medidas electroquímicas utilizando sondas moleculares.

En primer término se evaluarán las características de fluidez utilizando moléculas lipofílicas. Tal como se comentó en el Capítulo 4 (sección 4.1.2), el azul de metileno (MB) es capaz de difundir a través de membranas biológicas así como a través de la bicapa de vesículas unilamelares de DOPC (dioleoilpalmitoilcolina). Por lo tanto, el MB debería ser capaz de difundir a través de nuestro sistema modelo de bicapa, si ésta retiene su fluidez lateral.

La **Figura 5.10a** muestra un voltamperograma cíclico de MB inmovilizado en una SAM de DTT sobre un sustrato de Au(111) mediante inmersión del sustrato en una solución acuosa de MB 100 μM durante 30 min, tal como se describió en el Capítulo 4.

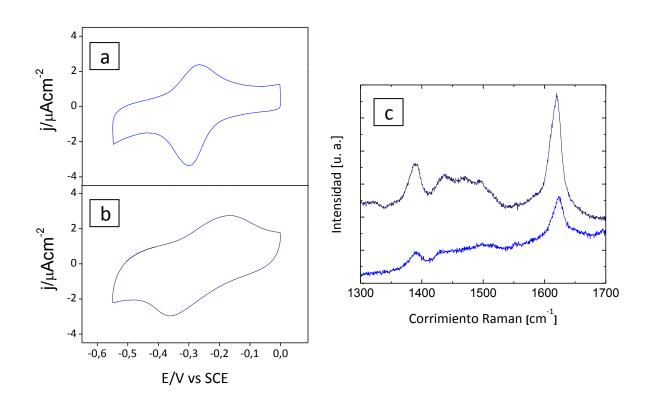


Figura 5.10. Voltamperogramas cíclicos de MB inmovilizado sobre Au(111) modificado con a) DTT y b) DMPC-DTT realizados en buffer fosfato 0,1 M pH 7,0 a 0,05 Vs $^{-1}$ a 25 °C. c) Espectros SERS ex situ correspondientes a MB inmovilizado sobre DTT (inf.) y DMPC-DTT (sup.) sobre Au(111) tomados con un laser de excitación de 568 nm, un tiempo de adquisición de 120 s y 10 mW de potencia. La inmovilización de MB se efectuó en todos los casos con $t_i^{\rm MB}$ = 30 min en solución acuosa 100 μM.

Mediante el mismo procedimiento de inmovilización de MB, empleando los sustratos modificados con bicapas de DMPC sobre SAMs de DTT, la cupla redox detectada exhibe un

comportamiento marcadamente distinto (**Fig. 5.10b**), con una amplia separación en los E_p de oxidación y reducción. Por otro lado, las cargas asociadas a los picos de reducción (4,1 μ C cm⁻²) y oxidación (4,6 μ C cm⁻²) son comparables a la halladas para MB sobre la SAM de DTT (5,7 y 4,2 μ Ccm⁻², respectivamente). La carga calculada corresponde a aquellas moléculas que fueron capaces de transferir electrones al sustrato de oro. Para verificar si estas moléculas corresponden a la totalidad de MB inmovilizado en el sistema de bicapa, se realizaron medidas de SERS con sustratos de Au(111) preparados en idénticas condiciones que aquellos empleados en la **Fig. 5.10a,b**. La **Fig. 5.10c** muestra que la intensidad de las bandas Raman es ~ 3 veces mayor para el MB inmovilizado en la bicapa de DMPC respecto del MB sobre la SAM de DTT. Este resultado indica que se encuentran presentes una mayor cantidad de moléculas de MB inmovilizadas además de aquellas que fueron capaces de transferir carga en las medidas electroquímicas.

Hasta ahora asumimos que el MB transfiere carga a través de la bicapa debido a que la cupla redox tiene una apariencia distinta a la hallada para MB inmovilizado sobre la SAM de DTT. Sin embargo, la transferencia de carga podría llevarse a cabo además a través de zonas de discontinuidad debidas a la fusión incompleta de las vesículas o bien a los límites de grano (**Fig. 5.8a**). Para identificar globalmente estos posibles defectos se recurrió al dinucleótido de Flavina-Adenina (FAD), el cual es incapaz de difundir a través de bicapas lipídicas debido a la presencia de dos grupos fosfato con carga negativa a pH = 7,0.

La **Figura 5.11a** muestra el voltamperograma cíclico de la cupla redox de FAD detectada sobre un sustrato de Au(111) modificado con una SAM de DTT empleando el mismo procedimiento de inmovilización que para MB (30 min de inmersión en una solución acuosa de FAD 100 μ M). Es evidente que el FAD es electroquímicamente activo sobre DTT, sin embargo, empleando este mismo procedimiento para inmovilizar FAD sobre la bicapa de DMPC, no fue posible detectar la cupla redox del FAD (**Fig. 5.11b**), ni aún aumentando el tiempo de inmersión ($t_i^{FAD} \approx 5$ h). El aspecto del voltamperograma es idéntico al de las bicapas de DMPC sin FAD inmovilizado, observándose solo corrientes capacitivas de la doble capa eléctrica.

Un aspecto que vale la pena destacar está relacionado con la capacidad de la doble capa de los sustratos de Au(111) modificados con DMPC-DTT. Si bien la bicapa lipídica constituye una barrera de permeabilidad, las bicapas soportadas sobre sustratos hidrofílicos conservan

una capa intermedia de hidratación de ~ 10 Å. ^[15] Por esta razón, el ancho de la doble capa para el sistema DMPC-DTT-Au es similar al hallado para las SAMs de DTT ($\sim 14~\mu F$ cm⁻²).

Si bien la detección de FAD en el sustrato modificado con la bicapa hubiera sido prueba suficiente para confirmar la presencia de discontinuidades, la afirmación inversa podría ser desacertada, ya que cargas menores a $\approx 0.5~\mu C~cm^{-2}$, el cual corresponde al límite de detección de la técnica, podrían pasar desapercibidas y éstas equivalen a un 4 % de cubrimiento de la superficie con una monocapa de FAD.

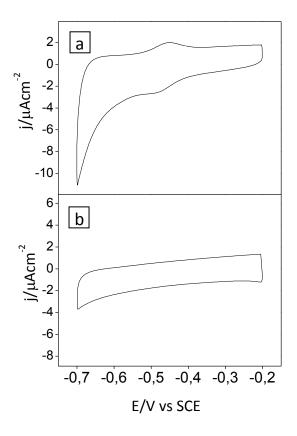


Figura 5.11. Voltamperogramas cíclicos de FAD inmovilizado sobre a) DTT y b) DMPC-DTT sobre Au(111) realizados en buffer fosfato 0,1 M pH 7,0 a 0,05 Vs⁻¹. La inmovilización de FAD se efectuó con t_i^{FAD} = 30 min en solución 100 μ M en ambos casos.

Desafortunadamente, tampoco es posible detectar el FAD mediante medidas de SERS sobre sustratos de Au(111) debido a que la señal Raman sobre esta superficie no es lo suficientemente intensa. Según se discutió en el Capítulo 4 (sección 4.3), la detección de FAD es posible sobre sustratos de oro nanoestructurados. De esta manera, el siguiente objetivo constituyó la formación de bicapas de DMPC sobre estos sustratos de alta área modificados con una SAM de DTT.

La **Figura 5.12** muestra la comparación del comportamiento de ambos sustratos (Au(111) y nanoestructurado) respecto de la formación de la bicapa de DMPC evaluada mediante el uso de ambas sondas (MB y FAD) en solución. De este modo, también podemos descartar que la ausencia de FAD en las bicapas sea debido a un rápida pérdida de las moléculas inmovilizadas debida al gradiente de concentración al enfrentar los sustratos al gran volumen de buffer fosfato de la celda electroquímica (~ 50 mL) libre de FAD. En primer lugar, se verificó la posibilidad de detectar ambas cuplas conjuntamente en 3 sistemas blanco tanto para los sustratos de Au(111) como para el oro nanoestructurado (**Fig. 5.12a,b i-iii**). Tanto el MB como el FAD fueron detectados sin dificultad sobre las superficies de oro sin modificar (**Fig. 5.12a,b i**), oro con una SAM de DTT (**Fig. 5.12a,b ii**) y oro sumergido 3 h en una suspensión de vesículas de DMPC a 37 °C (**Fig. 5.12a,b ii**), empleando como electrolito buffer fosfato 0,1 M con MB 5 x 10⁻⁶ M + FAD 10⁻⁵ M.

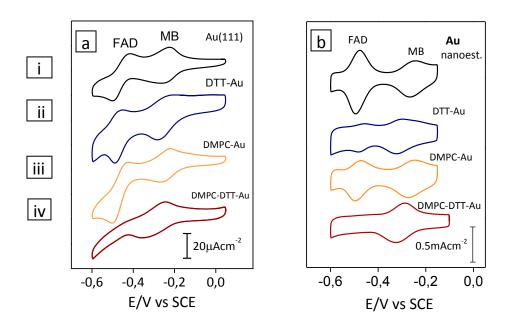


Figura 5.12. Voltamperogramas cíclicos medidos en una solución de MB $5x10^{-6}$ M + FAD 10^{-5} M en buffer fosfato 0,1M a pH = 7,4 a 25 °C sobre a) Au(111) a v = 0,20 Vs⁻¹ y b) oro nanoestructurado a v = 0,10 Vs⁻¹. i) Au sin modificiar, ii) DTT-Au, iii) DMPC-Au y iv) DMPC-DTT-Au. Las densidades de corriente están referidas al área geométrica de los electrodos.

En concordancia con los resultados de las **Fig. 5.10b** y **Fig. 5.11b**, para el Au(111) fue posible detectar la cupla de MB mientras que la de FAD no fue perceptible (**Fig. 5.12a iv**). El sustrato de oro nanoestructurado, no sólo permite las medidas de FAD por SERS sino

también aumenta la capacidad de detección electroquímica por su mayor área real. Sin embargo, tampoco en este caso, fue posible detectar la cupla redox del FAD mientras que sí la de MB (Fig. 5.12b iv).

Pasemos ahora a las medidas de SERS realizadas en sustratos de oro nanoestructurados modificados en idénticas condiciones que para la **Fig. 5.12b iv**, con el objetivo de obtener una bicapa de DMPC. La **Figura 5.13** muestra en negro el espectro SERS de la bicapa soportada sobre la SAM de DTT, la cual exhibe algunas bandas poco intensas relacionadas con los modos de vibración de las moléculas de fosfolípidos. [58] El espectro SERS del MB inmovilizado en la bicapa con t_i^{MB} = 30 min en solución acuosa 100 μ M sobre este sustrato (**Fig. 5.13** en azul) presenta una intensidad muy superior, razón por la cual se dividió 20 veces para poder mostrarlo en el mismo gráfico. Siguiendo el mismo procedimiento de inmovilización para el FAD, fue posible detectar su espectro SERS (**Fig. 5.13** en rojo) con una intensidad comparable a la hallada para FAD inmovilizado en sustratos de oro nanoestructurado sin bicapa (**Fig. 4.9b**).

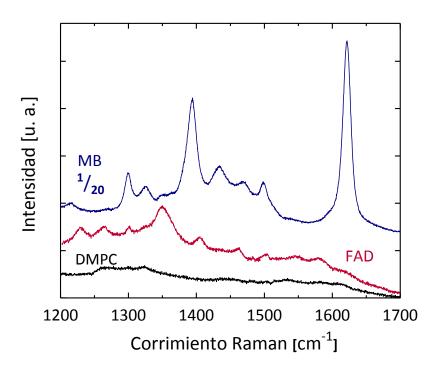


Figura 5.13. Espectros SERS ex situ correspondientes a sustratos de oro nanoestructurados modificados con una bicapa de DMPC sobre una SAM de DTT tomados con un laser de excitación de 647 nm, un tiempo de adquisición de 60 s y 70 mW de potencia. El espectro azul (20 veces más intenso que los otros) posee MB inmovilizado, el rojo es para FAD inmovilizado y el negro, para la bicapa de DMPC sola.

Para hallar la relación entre la cantidad de moléculas que transfieren carga y aquellas detectadas espectroscópicamente, se realizaron medidas de SERS in situ con control electroquímico. La **Figura 5.14** muestra los espectros SERS de MB obtenidos secuencialmente mediante la aplicación de potenciales escalonados. El procedimiento consistió en barrer a v = 0,01 Vs⁻¹ yendo de -0,1 V a -0,5 V y luego volviendo a -0,1 V, deteniéndose cada 0,1 V durante 1s a fin de adquirir el espectro asociado. El primer espectro corresponde a la molécula en su estado oxidado (**Fig. 5.14** primer espectro superior). A medida que se aplican potenciales más catódicos, el MB⁺ (oxidado) se reduce a MBH. El MBH es incoloro y no presenta bandas Raman con el laser de excitación empleado (568,1 nm), debido a la pérdida de su aromaticidad. [59] Si se invierte el sentido del barrido del potencial se recupera el espectro de la especie oxidada. Sin embargo, la intensidad de las señales es apenas la cuarta parte respecto del primer espectro registrado. Por lo tanto, tres cuartas partes de la cantidad de MB inmovilizada inicialmente se pierde en el primer ciclo.

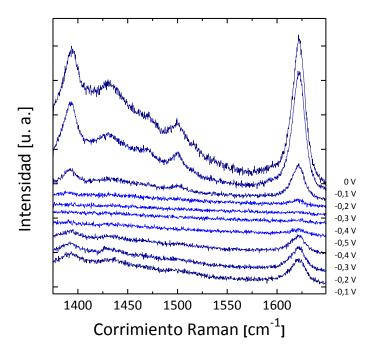


Figura 5.14. Espectros SERS in situ de MB inmovilizado en una bicapa de DMPC soportada sobre una SAM de DTT sobre oro nanoestructurado medidos en buffer fosfato 0,1 M a pH = 7,4 a 20 °C en función del potencial aplicado durante un primer voltamperograma cíclico. Los espectros se tomaron con un laser de excitación de 568,1 nm, un tiempo de adquisición de 1 s y una potencia de 70 mW. Los potenciales (referidos al electrodo de Ag/AgCl) se aplicaron durante la medida del espectro y se utilizó v = 0,01 Vs⁻¹ entre ellos.

Si se continúa ciclando, la cantidad de material perdido es mucho menor (se conserva un 75 %) y prácticamente se mantiene en ciclos sucesivos, siendo posible oxidar y reducir la totalidad de estas moléculas. Este resultado se puede interpretar si se considera que inicialmente existen moléculas de MB inmovilizadas que no transfieren carga por encontrarse alejadas de la superficie del oro. Estas moléculas se encuentran como MB⁺ a OCP (potencial de circuito abierto), por lo tanto pueden detectarse en el primer espectro. Debido a que a -0,5 V el espectro corresponde únicamente a MBH, el MB⁺ alejado se pierde rápidamente antes que las moléculas capaces de transferir carga se reduzcan.

La pérdida de estas moléculas ocurre únicamente cuando se aplica el potencial ya que a OCP no se detectó una pérdida significativa durante la toma de espectros en distintas zonas del sustrato. Por lo tanto, la liberación está relacionada a un cambio en la bicapa debido al potencial aplicado. Mediante medidas de PM-IRRAS con control electroquímico, Horswell *et al.*^[23] pudieron determinar que existen cambios en la orientación de las cadenas de DMPC en bicapas soportadas sobre oro, para el rango de potenciales que se empleó para el estudio de la cupla de MB. Esta reorientación del DMPC puede ser la causa de la liberación de las moléculas de MB más débilmente adsorbidas en la bicapa, mientras que para aquellas moléculas capaces de transferir carga, más cercanas al sustrato, estos cambios parecieran no ser suficientes para inducir su liberación.

Tratemos ahora el caso del FAD, el cual no había podido ser detectado por medidas electroquímicas mientras que sí se observó su espectro SERS para la especie oxidada. Tomando espectros a OCP (**Figura 5.15**, primer espectro superior) en distintas zonas de la muestra, se obtuvieron espectros de similar intensidad, indicando una distribución uniforme de moléculas en la superficie. A diferencia del MB, la especie reducida del FAD (FADH₂) posee bandas Raman de similar^[60] o mayor intensidad^[61] que la especie oxidada para el mismo laser de excitación (647,1 nm), de manera que si las moléculas de FAD son capaces de transferir carga al sustrato de oro, podrían ser detectadas espectroscópicamente.

Aplicando potenciales escalonados tal como se procedió para el MB, yendo de -0,25 V a -0,65 V y retornando a -0,25 V, se puede observar que el espectro de FAD oxidado disminuye en intensidad, sin embargo no aparecen nuevos picos (**Fig. 5.15**). En el barrido inverso tampoco es posible recuperar el espectro de la especie oxidada. Para verificar que la

ausencia de los picos característicos no se deba a fenómenos de *photobleaching*¹, se examinaron otras zonas del sustrato, las cuales exhibían el mismo espectro.

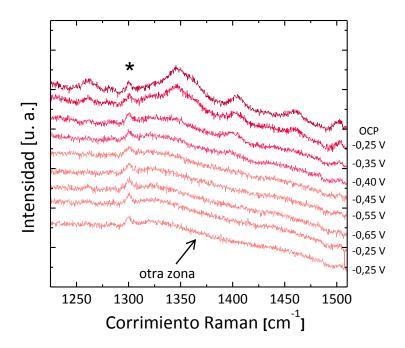


Figura 5.15. Espectros SERS in situ de FAD inmovilizado en una bicapa de DMPC soportada sobre una SAM de DTT sobre oro nanoestructurado medidos en buffer fosfato 0,1 M a pH = 7,4 a 20 °C en función del potencial aplicado durante un primer voltamperograma cíclico. Los espectros se tomaron con un laser de excitación de 647,1 nm, un tiempo de adquisición de 60s y una potencia de 70 mW. Los potenciales (referidos al electrodo de Ag/AgCl) se aplicaron durante la medida del espectro y utilizó v = 0,01 Vs⁻¹ entre ellos. El asterisco muestra una línea de plasma.

Por lo tanto podemos concluir que las moléculas de FAD débilmente adsorbidas, incapaces de transferir carga al sustrato porque se encuentran en la parte externa, se liberarían al aplicar un potencial debido a los cambios de orientación en las cadenas de DMPC como en el caso de las moléculas de MB⁺ débilmente inmovilizadas, razón por la cual es imposible recuperar el espectro de FAD oxidado al invertir el potencial de barrido. Sin embargo, al contrario de lo observado con el MB, la ausencia de señal electroquímica en estos sustratos de alta área implicaría que no existen moléculas capaces de atravesar la bicapa. De este modo, podríamos descartar la existencia de discontinuidades en la bicapa de DMPC que permitan el pasaje de moléculas como el FAD. Un esquema que permite explicar la situación de las moléculas de MB y FAD se muestra en la **Figura 5.16**.

170

¹ El fenómeno de *photobleaching* (fotoblanqueo) se refiere en este caso a la destrucción fotoquímica del FAD por irradiación con el laser de modo que pierda sus propiedades ópticas.

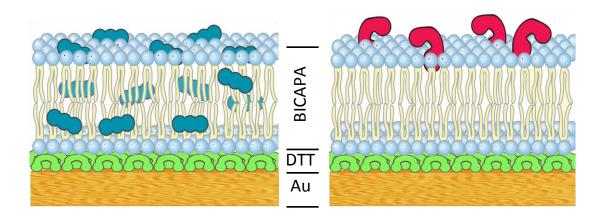


Figura 5.16. Esquema propuesto para la localización de MB (izq.) y FAD (der.) en el sistema DMPC-DTT-Au. Las moléculas en la cara exterior de la bicapa se liberan después de la aplicación de potencial.

5.5 Interacción con ftalocianina de Zn

Las ftalocianinas (**Figura 5.17**) tienen interesantes propiedades fotofísicas y fotoquímicas para su utilización en terapia fotodinámica (PDT, *photodynamic therapy*). ^[62] Sin embargo, estas moléculas son hidrofóbicas y su solubilidad en agua en condiciones fisiológicas constituye el principal inconveniente para su administración in vivo. ^[63] Actualmente se intenta encapsular las ftalocianinas en formulaciones liposomales debido a que estos sistemas han probado su efectividad para la administración de fármacos de carácter hidrofóbico en ensayos clínicos. ^[63] Uno de los objetivos es lograr su cuantificación una vez inmovilizadas en liposomas de modo de conocer con certeza la cantidad de ftalocianina que se suministrará al paciente.

Siendo las ftalocianinas capaces de transferir electrones al oro, [64] se contempló la posibilidad de cuantificarlas por métodos electroquímicos una vez inmovilizadas en los liposomas. Para ello, se optó por el método de fusión de vesículas sobre las superficies de oro cubiertas por una SAM de DTT, tal como se discutió en las secciones anteriores. La ftalocianina (ZnPc) se incorporó durante la preparación de las vesículas de DMPC y debido a su virtual insolubilidad en agua, se localiza entre las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos. [65, 66] A pesar que la fusión de vesículas implica la reorganización de la bicapa lipídica, se supondrá que la relación de ZnPc por unidad de área de bicapa en el liposoma será similar a la relación estimada en la bicapa soportada.

Figura 5.17. Estructura de 2,3,9,10,16,17,23,24-octakis[(N,N-dimetilamino) etilsulfanil]ftalocianinato de Zinc (II) (ZnPc).

Los procesos de oxidación y reducción en las ftalocianinas de Zn tienen lugar únicamente en el anillo central, ya que el centro metálico no ofrece electroactividad para los potenciales empleados en medidas de películas de ZnPc sobre sustratos de oro. [64] Para medidas en soluciones acuosas, está reportado que las ZnPc ponen en juego un solo electrón por molécula en cada onda voltamétrica. [64, 67]

En la **Figura 5.18** se muestran los voltamperogramas cíclicos medidos en buffer fosfato 0,1 M a pH 7,4 para ZnPc adsorbida en la superficie de oro (por inmersión del sustrato durante 1 h en ZnPc 10⁻⁷ M en THF) (**Fig. 5.18a**) e inmovilizada en la bicapa de DMPC (**Fig. 5.18b**). Se puede observar que en ambos casos, la repuesta voltamperométrica en el intervalo de potenciales seleccionado está pobremente definida y consta de al menos dos ondas de reducción y dos de oxidación asociadas a ZnPc. Si bien la segunda onda es más intensa, la cual podría emplearse para cuantificar ZnPc, se encuentra muy cerca de la HER y compromete la integridad de la bicapa. Por lo tanto, se optó por cambiar la solución electrolítica con el fin de obtener una cupla redox más definida.

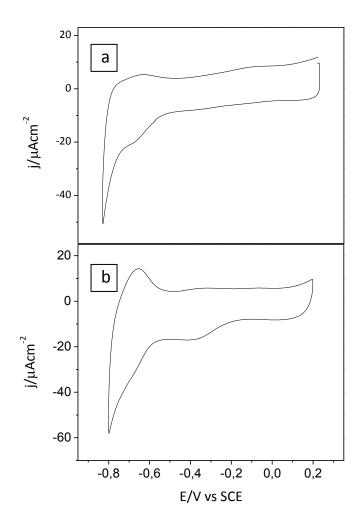


Figura 5.18. Voltamperogramas cíclicos de ZnPc sobre a) Au(111) y b) bicapa de DMPC sobre una SAM de DTT realizados en buffer fosfato $0.1 \text{ M pH } 7.4 \text{ a v} = 0.20 \text{ Vs}^{-1}$.

Las medidas de voltamperometría cíclica en medio ácido para ZnPc adsorbida sobre oro muestran una única cupla bien definida, [67, 68] razón por la cual se eligió H_2SO_4 0,5 M para obtener resultados más satisfactorios. De hecho, ha sido previamente observado que una disminución en el pH del medio produce la protonación de los N periféricos, brindando cuplas más definidas al comparar los voltamperogramas registrados a pH \leq 2 respecto a los obtenidos en medios neutros. [69, 70]

La **Figura 5.19a** muestra un voltamperograma cíclico de Au(111) en H_2SO_4 0,5 M, en el cual se puede apreciar la doble capa característica en este medio. ^[51] Después de la inmersión del mismo sustrato durante 1 h en una solución ZnPc 10^{-7} M en THF se obtiene un voltamperograma como el que se muestra en la **Fig. 5.19b**, en el cual se puede observar, en el rango de potenciales seleccionado, una única cupla redox reversible con $E_p^{\frac{14}{2}} = -0,096$ V. Si

se integran los picos anódico y catódico se obtiene cargas de 2,8 y 3,2 μC cm $^{\text{-}2}$, respectivamente.

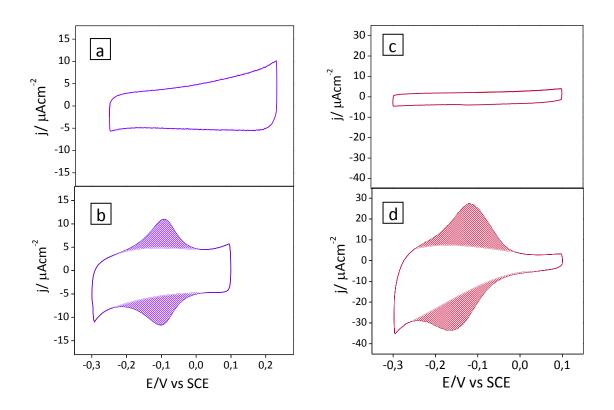


Figura 5.19. Voltamperogramas cíclicos efectuados en H_2SO_4 0,5 M a v = 0,2 Vs⁻¹. a) Au (111), b) Au(111) modificado con ZnPc, c) bicapa de DMPC sobre una SAM de DTT sobre Au(111) y d) bicapa de DMPC con ZnPc sobre una SAM de DTT sobre Au(111).

Para relacionar la carga obtenida con el cubrimiento de la superficie, supongamos que las ZnPc se autoensamblan en forma ordenada y compacta en una superficie de oro plana, con el anillo central paralelo a la superficie (**Figura 5.20a**). De este modo, las moléculas forman una celda unidad que puede ser determinada, por ejemplo, mediante medidas de STM, cuyos valores oscilan entre 2,40 nm² [68] y 6,76 nm², [71] de acuerdo al número, geometría y tamaño de las cadenas sustituyentes. Según estos valores de celda unidad, las cargas asociadas a una monocapa de ZnPc paralelas a la superficie corresponderían a 6,7 μC cm² (para 2,40 nm²) y 2,4 μC cm² (para 6,76 nm²).

Por otro lado, si se contempla un arreglo de moléculas perpendiculares a la superficie (**Figura 5.20b**), el área ocupada por molécula es mucho menor, con valores determinados por balanza de Langmuir-Blodgett que oscilan entre 0,5 nm² y 1,0 nm², [72] dependiendo

también de los sustituyentes laterales. Estos valores implican cargas de 32,0 μ C cm⁻² (para 0,5 nm²) y 16,0 μ C cm⁻² (para 1,0 nm²). De acuerdo a estas estimaciones, sobre la superficie de oro empleada, policristalina con terrazas orientadas (111), las moléculas se acomodarían preferentemente paralelas a la superficie, como ya ha sido reportado, [68] y los cubrimientos alcanzados con el procedimiento de inmovilización serían cercanos a la monocapa.

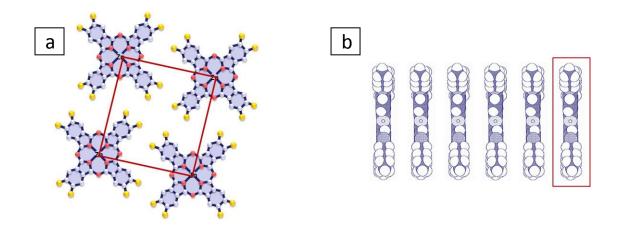


Figura 5.20. Esquema del arreglo de las ZnPc adsorbidas. a) Moléculas paralelas a la superficie (en rojo se marca la celda unidad) y b) moléculas perpendiculares a la superficie.

Las imágenes de STM de sustratos de oro con ZnPc adsorbida, preparados en idénticas condiciones que para la **Fig. 5.19b**, revelan una superficie uniformemente cubierta (**Figura 5.21a**). Para imágenes tomadas en campos más pequeños (**Fig. 5.21b**), no se llegó a definir una red ordenada, sin embargo si se tiene en cuenta que cada punto brillante de ~ 2,5 nm de diámetro corresponde a una molécula de ZnPc, podemos confirmar un cubrimiento cercano a la monocapa.

Las medidas con la bicapa de DMPC soportada no presentaron procesos faradaicos en la ventana de potenciales seleccionada (**Fig. 5.19c**) y además no ofrecieron inconvenientes respecto a su estabilidad a pH ácido, manteniéndose el mismo voltamperograma con sucesivos ciclados. Para las bicapas formadas con vesículas que contenían ZnPc, el voltamperograma presentó una cupla redox (**Fig. 5.19d**) con $E_p^{1/2}$ = -0,140 V. Integrando los picos anódico y catódico, las cargas obtenidas son de 8,4 y 10,8 μ Ccm⁻². Estos valores son significativamente superiores a los hallados para ZnPc adsorbidos sobre oro. De acuerdo a los modelos planteados en la **Fig. 5.20**, en este caso las moléculas se deberían ubicar

orientadas perpendiculares a la superficie. A partir de los datos de carga, se tienen unas 6×10^{13} moléculas de ZnPc/cm².

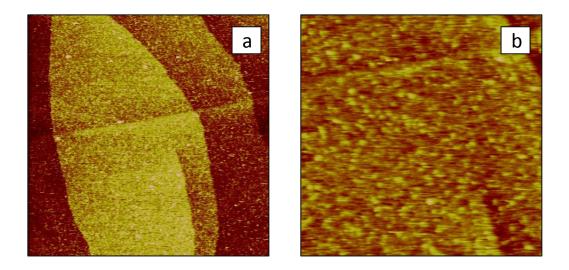


Figura 5.21. Imágenes de STM ex situ de un sustrato de Au(111) después de 1h de inmersión en una solución de ZnPc 10^{-7} M en THF de a) 300 nm x 300 nm (Z = 0,8 nm) y b) 100 nm x 100 nm (Z = 0,8 nm).

El diámetro efectivo promedio, determinado a través de medidas de dispersión de luz estática (SLS, *static light scattering*), de las vesículas de DMPC conteniendo ZnPc fue de 99,0 \pm 0,9 nm. [50] Siendo el área superficial promedio de cada vesícula de 3,1 x 10^4 nm², habría 1,85 x 10^4 moléculas de ZnPc por cada vesícula.

Finalmente se realizaron medidas de SERS para verificar si la relación hallada entre las cargas voltamétricas para ZnPc adsorbida sobre oro y la hallada en las bicapas se corresponde con la totalidad de las moléculas en la superficie. La ZnPc tiene una fuerte intensidad de bandas Raman sobre oro policristalino,^[67] por lo tanto no fue necesario recurrir a medidas en sustratos de oro nanoestructurado.

La **Figura 5.22** muestra los espectros SERS ex situ para ZnPc adsorbida sobre oro (espectro inferior) y para ZnPc inmovilizada en la bicapa de DMPC (espectro superior), registrándose una mayor intensidad en este caso. Las bandas a 1312 y 1527 cm⁻¹ corresponden a modos de vibración de los anillos pirrol mientras que las bandas alrededor de 1430 cm⁻¹ se asignan a vibraciones C-N.^[67]

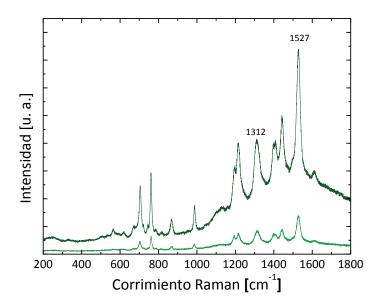


Figura 5.22. Espectros SERS ex situ de ZnPc inmovilizado sobre Au(111) (inf.) y en una bicapa de DMPC soportada sobre una SAM de DTT (sup.) medidos con un laser de excitación de 647 nm, un tiempo de adquisición de 10 s y una potencia de 20 mW.

5.6 Conclusiones

Es posible formar bicapas de DMPC sobre sustratos de oro orientados (111), policristalinos y nanoestructurados. Las bicapas formadas conservan una fluidez lateral tal que permiten el pasaje de MB, el cual es capaz de transferir carga al sustrato de oro. Por otro lado, el número de discontinuidades es lo suficientemente bajo, ya que no fue posible detectar FAD electroquímicamente.

Mediante medidas de SERS in situ con control electroquímico, se determinó que además de las moléculas de MB capaces de oxidarse y reducirse existe otra cantidad que se libera rápidamente al aplicar el potencial. En el caso del FAD, también existían moléculas inmovilizadas que no eran capaces de transferir carga, que luego se liberaban al aplicar el potencial. Resultan interesantes las aplicaciones de este modelo de bicapa para estudios de liberación controlada de fármacos.

Por otro lado, se empleó el procedimiento de formación de bicapas para la cuantificación de una molécula (ZnPc) previamente encapsulada en las vesículas de DMPC, logrando estimar el número de moléculas presentes en cada vesícula.

5.7 Referencias

- 1. Gennis, R. B. (1989) *Biomembranes: Molecular Structure and Function*, Springer-Verlag, New York.
- 2. Lodish, H.; Berk, A.; Kaiser, C. A.; Krieger, M.; Scott, M. P.; Bretscher, A.; Ploegh, H.; Matsudaira, P. (2007) *Molecular Cell Biology*, 6th ed., W. H. Freeman.
- 3. Tanford, C. (1980) *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, 2nd ed., Wiley.
- 4. Martin, D. K. (2007) The Significance of Biomimetic Membrane Nanobiotechonology to Biomedical Applications, in *Nanobiotechnology of Biomimetic Membranes* (Martin, D. K., Ed.), Springer, New York.
- 5. Chan, Y.-H. M.; Boxer, S. G. (2007) Model membrane systems and their applications, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11, 581-587.
- 6. Sessa, G.; Weissmann, G. (1968) Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes, *J. Lipid Res. 9*, 310-318.
- 7. Lipowsky, R. (1998) Vesicles and Biomembranes, *Encycl. Appl. Phys. 23*, 199-222.
- 8. Sackmann, E. (1996) Supported Membranes: Scientific and Practical Applications, *Science* 271, 43-48.
- 9. Dufrêne, Y. F.; Lee, G. U. (2000) Advances in the characterization of supported lipid films with the atomic force microscope, *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes 1509*, 14-41.
- 10. Kiessling, V.; Domanska, M. K.; Murray, D.; Wan, C.; Tamm, L. K. (2008) Supported Lipid Bilayers: Development and Applications in Chemical Biology, in *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology Vol. 4* (Begley, T. P., Ed.), John Wiley & Sons, Inc.
- 11. Tamm, L. K.; McConnell, H. M. (1985) Supported phospholipid bilayers, *Biophys. J. 47*, 105-113.
- 12. Rädler, J.; Strey, H.; Sackmann, E. (1995) Phenomenology and Kinetics of Lipid Bilayer Spreading on Hydrophilic Surfaces, *Langmuir* 11, 4539-4548.
- 13. Brian, A. A.; McConnell, H. M. (1984) Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 81*, 6159-6163.
- 14. Langmuir, I.; Schaefer, V. J. (1938) Activities of Urease and Pepsin Monolayers, *J. Am. Chem. Soc. 60*, 1351-1360.
- 15. Castellana, E. T.; Cremer, P. S. (2006) Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design, *Surf. Sci. Rep. 61*, 429-444.
- 16. Tokumasu, F.; Jin, A. J.; Feigenson, G. W.; Dvorak, J. A. (2003) Nanoscopic Lipid Domain Dynamics Revealed by Atomic Force Microscopy, *Biophys. J. 84*, 2609-2618.
- 17. Scomparin, C.; Lecuyer, S.; Ferreira, M.; Charitat, T.; Tinland, B. (2009) Diffusion in supported lipid bilayers: Influence of substrate and preparation technique on the internal dynamics, *Eur. Phys. J.*, *E* 28, 211-220-220-211-220-220.
- 18. Naumann, R.; Jonczyk, A.; Hampel, C.; Ringsdorf, H.; Knoll, W.; Bunjes, N.; Gräber, P. (1997) Coupling of proton translocation through ATPase incorporated into supported lipid bilayers to an electrochemical process, *Bioelectrochem. Bioenerget.* 42, 241-247.
- 19. Cullison, J. K.; Hawkridge, F. M.; Nakashima, N.; Yoshikawa, S. (1994) A Study of Cytochrome c Oxidase in Lipid Bilayer Membranes on Electrode Surfaces, *Langmuir 10*, 877-882.
- 20. Garcia-Araez, N.; Brosseau, C. L.; Rodriguez, P.; Lipkowski, J. (2006) Layer-by-Layer PMIRRAS Characterization of DMPC Bilayers Deposited on a Au(111) Electrode Surface[†], *Langmuir 22*, 10365-10371.
- Cho, N.-J.; Kanazawa, K. K.; Glenn, J. S.; Frank, C. W. (2007) Employing Two Different Quartz Crystal Microbalance Models To Study Changes in Viscoelastic Behavior upon Transformation of Lipid Vesicles to a Bilayer on a Gold Surface, *Anal. Chem. 79*, 7027-7035.

- 22. Keller, C. A.; Kasemo, B. (1998) Surface Specific Kinetics of Lipid Vesicle Adsorption Measured with a Quartz Crystal Microbalance, *Biophys. J. 75*, 1397-1402.
- 23. Horswell, S. L.; Zamlynny, V.; Li, H.-Q.; Merrill, A. R.; Lipkowski, J. (2002) Electrochemical and PM-IRRAS studies of potential controlled transformations of phospholipid layers on Au(111) electrodes, *Faraday Discuss.* 121, 405-422.
- Zawisza, I.; Bin, X.; Lipkowski, J. (2004) Spectroelectrochemical studies of bilayers of phospholipids in gel and liquid state on Au(111) electrode surface, *Bioelectrochemistry 63*, 137-147.
- Cha, T.; Guo, A.; Zhu, X. Y. (2006) Formation of Supported Phospholipid Bilayers on Molecular Surfaces: Role of Surface Charge Density and Electrostatic Interaction, *Biophys. J. 90*, 1270-1274.
- 26. Twardowski, M.; Nuzzo, R. G. (2003) Molecular Recognition at Model Organic Interfaces: Electrochemical Discrimination Using Self-Assembled Monolayers (SAMs) Modified via the Fusion of Phospholipid Vesicles, *Langmuir 19*, 9781-9791.
- 27. Zhang, L.; Vidu, R.; Waring, A. J.; Lehrer, R. I.; Longo, M. L.; Stroeve, P. (2002) Electrochemical and Surface Properties of Solid-Supported, Mobile Phospholipid Bilayers on a Polyion/Alkylthiol Layer Pair Used for Detection of Antimicrobial Peptide Insertion, *Langmuir* 18, 1318-1331.
- 28. Plant, A. L. (1993) Self-assembled phospholipid/alkanethiol biomimetic bilayers on gold, *Langmuir 9*, 2764-2767.
- 29. Lang, H.; Duschl, C.; Vogel, H. (1994) A new class of thiolipids for the attachment of lipid bilayers on gold surfaces, *Langmuir 10*, 197-210.
- 30. Raguse, B.; Braach-Maksvytis, V.; Cornell, B. A.; King, L. G.; Osman, P. D. J.; Pace, R. J.; Wieczorek, L. (1998) Tethered Lipid Bilayer Membranes: Formation and Ionic Reservoir Characterization, *Langmuir* 14, 648-659.
- 31. Bard, A. J.; Faulkner, L. R. (2001) *Electrochemical methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York.
- 32. Weisshaar, D. E.; Walczak, M. M.; Porter, M. D. (1993) Electrochemically induced transformations of monolayers formed by self-assembly of mercaptoethanol at gold, *Langmuir 9*, 323-329.
- 33. Zhang, J.; Bilic, A.; Reimers, J. R.; Hush, N. S.; Ulstrup, J. (2005) Coexistence of Multiple Conformations in Cysteamine Monolayers on Au(111), *The Journal of Physical Chemistry B* 109, 15355-15367.
- 34. Nelson, D. L.; Cox, M. M. (2008) *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5th ed., W. H. Freeman and Company, New York.
- 35. New, R. R. C. (1990) Preparation of liposomes, in *Liposomes: a Practical Approach* (New, R. R. C., Ed.), IRL Press at Oxford University Press, Oxford.
- 36. Akashi, K.; Miyata, H.; Itoh, H.; Kinosita Jr, K. (1996) Preparation of giant liposomes in physiological conditions and their characterization under an optical microscope, *Biophys. J.* 71, 3242-3250.
- 37. Valenzuela, S. M. (2007) Liposome Techniques for Synthesis of Biomimetic Lipid Membranes, in *Nanobiotechnology of Biomimetic Membranes* (Martin, D. K., Ed.), Springer, New York.
- 38. Blumenthal, R.; Clague, M. J.; Durell, S. R.; Epand, R. M. (2003) Membrane Fusion, *Chem. Rev.* 103, 53-70.
- 39. Seifert, U.; Lipowsky, R. (1990) Adhesion of vesicles, *Physical Review A 42*, 4768-4768.
- 40. Reviakine, I.; Brisson, A. (2000) Formation of Supported Phospholipid Bilayers from Unilamellar Vesicles Investigated by Atomic Force Microscopy, *Langmuir 16*, 1806-1815.
- 41. Einstein, A. (1905) Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen, *Ann. Phys. 322*, 549-560.
- 42. Keller, C. A.; Glasmästar, K.; Zhdanov, V. P.; Kasemo, B. (2000) Formation of Supported Membranes from Vesicles, *Phys. Rev. Lett.* 84, 5443-5443.

- 43. Reimhult, E.; Höök, F.; Kasemo, B. (2003) Intact Vesicle Adsorption and Supported Biomembrane Formation from Vesicles in Solution: Influence of Surface Chemistry, Vesicle Size, Temperature, and Osmotic Pressure†, *Langmuir 19*, 1681-1691.
- 44. Johnson, J. M.; Ha, T.; Chu, S.; Boxer, S. G. (2002) Early Steps of Supported Bilayer Formation Probed by Single Vesicle Fluorescence Assays, *Biophys. J. 83*, 3371-3379.
- 45. Richter, R. P.; Bérat, R.; Brisson, A. R. (2006) Formation of Solid-Supported Lipid Bilayers: An Integrated View, *Langmuir 22*, 3497-3505.
- 46. Cunin, F.; Milhiet, P.-E.; Anglin, E.; Sailor, M. J.; Espenel, C.; Le Grimellec, C.; Brunel, D.; Devoisselle, J.-M. (2007) Continuous planar phospholipid bilayer supported on porous silicon thin film reflector, *Ultramicroscopy 107*, 1048-1052.
- 47. Goksu, E. I.; Hoopes, M. I.; Nellis, B. A.; Xing, C.; Faller, R.; Frank, C. W.; Risbud, S. H.; Satcher Jr, J. H.; Longo, M. L. (2010) Silica xerogel/aerogel-supported lipid bilayers: Consequences of surface corrugation, *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes 1798*, 719-729.
- 48. Roiter, Y.; Ornatska, M.; Rammohan, A. R.; Balakrishnan, J.; Heine, D. R.; Minko, S. (2009) Interaction of Lipid Membrane with Nanostructured Surfaces, *Langmuir 25*, 6287-6299.
- 49. Salvarezza, R. C.; Arvia, A. J. (1996) A Modern Approach to Surface Roughness Applied to Electrochemical Systems, in *Modern Aspects of Electrochemistry* (Conway, B. E., Bockris, J. O. M., and White, R. E., Eds.), pp 289-373, Plenum Press, New York.
- 50. Diz, V. E.; Gauna, G. A.; Strassert, C. A.; Awruch, J.; Dicelio, L. E. (2010) Photophysical properties of microencapsulated phthalocyanines, *J. Porphyrins Phthalocyanines* 14, 278-283.
- 51. Hamelin, A. (1996) Cyclic voltammetry at gold single-crystal surfaces. Part 1. Behaviour at low-index faces, *J. Electroanal. Chem. 407*, 1-11.
- 52. Mao, G.; Liang, X.; Simon Ng, K. Y. (2004) Direct Force Measurement of Liposomes by Atomic Force Microscopy, in *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, Marcel Dekker, Inc.
- 53. Tokumasu, F.; Jin, A. J.; Feigenson, G. W.; Dvorak, J. A. (2003) Atomic force microscopy of nanometric liposome adsorption and nanoscopic membrane domain formation, *Ultramicroscopy 97*, 217-227.
- 54. Garcia-Manyes, S.; Redondo-Morata, L.; Oncins, G.; Sanz, F. (2010) Nanomechanics of Lipid Bilayers: Heads or Tails?, *J. Am. Chem. Soc.* 132, 12874-12886.
- 55. Adamson, A. W.; Gast, A. P. (1997) *Physical Chemistry of Surfaces*, 6th ed., John Wiley & Sons, New York.
- 56. Smith, B. A.; McConnell, H. M. (1978) Determination of molecular motion in membranes using periodic pattern photobleaching, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75*, 2759-2763.
- 57. Caetano, W.; Haddad, P. S.; Itri, R.; Severino, D.; Vieira, V. C.; Baptista, M. S.; Schröder, A. P.; Marques, C. M. (2007) Photo-Induced Destruction of Giant Vesicles in Methylene Blue Solutions, *Langmuir 23*, 1307-1314.
- 58. Lee, C.; Bain, C. D. (2005) Raman spectra of planar supported lipid bilayers, *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes 1711*, 59-71.
- 59. Hutchinson, K.; Hester, R. E.; Albery, W. J.; Hillman, A. R. (1984) Raman spectroscopic studies of a thionine-modified electrode, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1 80*, 2053-2053.
- 60. Xu, J.; Birke, R. L.; Lombardi, J. R. (1987) Surface-enhanced Raman spectroscopy from flavins adsorbed on a silver electrode: observation of the unstable semiquinone intermediate, *J. Am. Chem. Soc.* 109, 5645-5649.
- 61. Abdelsalam, M.; Bartlett, P. N.; Russell, A. E.; Baumberg, J. J.; Calvo, E. J.; Tognalli, N. s. G.; Fainstein, A. (2008) Quantitative Electrochemical SERS of Flavin at a Structured Silver Surface, *Langmuir 24*, 7018-7023.
- 62. Van Lier, J. E. (1990) Phthalocyanines as sensitizers for PDT of cancer, *Photodynamic Therapy* of Neoplastic Disease 1, 279-291.

- 63. Detty, M. R.; Gibson, S. L.; Wagner, S. J. (2004) Current Clinical and Preclinical Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy, *J. Med. Chem.* 47, 3897-3915.
- 64. Green, J. M.; Faulkner, L. R. (1983) Reversible oxidation and rereduction of entire thin films of transition-metal phthalocyanines, *J. Am. Chem. Soc.* 105, 2950-2955.
- 65. Rodriguez, M. E.; Awruch, J.; Dicelio, L. (2002) Photophysical properties of Zn(II) phthalocyaninates incorporated into liposomes, *J. Porphyrins Phthalocyanines* 6, 122-129.
- 66. Nunes, S. M. T.; Sguilla, F. S.; Tedesco, A. C. (2004) Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37, 273-284.
- 67. Palys, B. J.; Puppels, G. J.; van den Ham, D.; Feil, D. (1992) Raman spectra of zinc phthalocyanine monolayers adsorbed on glassy carbon and gold electrodes by application of a confocal Raman microspectrometer, *J. Electroanal. Chem. 326*, 105-112.
- 68. Yoshimoto, S.; Tsutsumi, E.; Suto, K.; Honda, Y.; Itaya, K. (2005) Molecular assemblies and redox reactions of zinc(II) tetraphenylporphyrin and zinc(II) phthalocyanine on Au(1 1 1) single crystal surface at electrochemical interface, *Chem. Phys.* 319, 147-158.
- 69. Golovin, M. N.; Seymour, P.; Jayaraj, K.; Fu, Y. S.; Lever, A. B. P. (1990) Perchlorinated phthalocyanines: spectroscopic properties and surface electrochemistry, *Inorg. Chem. 29*, 1719-1727.
- 70. Kubota, L. T.; Gushikem, Y.; Perez, J.; Tanaka, A. A. (1995) Electrochemical Properties of Iron Phthalocyanine Immobilized on Titanium(IV) Oxide Coated on Silica Gel Surface, *Langmuir 11*, 1009-1013.
- 71. Yang, Z.-Y.; Gan, L.-H.; Lei, S.-B.; Wan, L.-J.; Wang, C.; Jiang, J.-Z. (2005) Self-Assembly of PcOC8 and Its Sandwich Lanthanide Complex Pr(PcOC8)2 with Oligo(Phenylene-ethynylene) Molecules, *The Journal of Physical Chemistry B* 109, 19859-19865.
- 72. Bourgoin, J.-P.; Doublet, F.; Palacin, S.; Vandevyver, M. (1996) High In-Plane Anisotropy in Phthalocyanine LB Films, *Langmuir 12*, 6473-6479.