



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral

**Estudio de interacciones de nanopartículas de
plata con sistemas biomiméticos.**

Julie Viviana Maya Girón

Directora: María Elena Vela
Co – Directora: Raquel Vico

2016

El presente trabajo de Tesis Doctoral se realizó bajo la dirección de la Dra. María Elena Vela y la codirección de la Dra. Raquel Vico en el Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA) (CONICET–UNLP), en el Instituto de Investigaciones en Físicoquímica de Córdoba (INFIQC–CONICET) y el Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC–CONICET). El mismo se presenta a consideración de las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP para acceder al título de Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas – Área Química.

La Plata (Argentina), Octubre de 2016.

Qca. Julie V. Maya Girón
e-mail:julitamaya@gmail.com

A mis padres, Fabián y Vilma

A mi hermana, Ana María

ÍNDICE GENERAL

Resumen.....	V
--------------	---

Capítulo 1.

Introducción General.....	1
1.1. Nanopartículas de plata: Propiedades, aplicaciones y toxicidad.....	1
1.2. Características y Propiedades.....	3
1.3. Aplicaciones.....	6
1.4. Toxicidad.....	8
1.4.1. Tamaño.....	10
1.4.2. Superficie específica.....	10
1.4.3. Estado de aglomeración.....	10
1.4.4. Forma.....	11
1.4.5. Solubilidad.....	11
1.4.6. Carga superficial.....	12
1.5. Sistemas biomiméticos.....	15
1.6. Ejemplos de sistemas modelo de membrana celular.....	19
1.6.1. Bicapas Lipídicas Soportadas (SLBs).....	20
1.6.2. Monocapas Lipídicas.....	20
1.6.3. Liposomas.....	21
Referencias Bibliográficas.....	26

Capítulo 2.

Sección Experimental.....	31
2.1. Técnicas Electroquímicas.....	31
2.1.1. Voltamperometría Cíclica.....	35
2.1.2. Arreglo experimental utilizado en las medidas electroquímicas...39	
2.2. Espectroscopia de fotoelectrones generados por rayos X (XPS).....	40

2.2.1.	Condiciones experimentales para la adquisición de los espectros XPS.....	45
2.3.	Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	46
2.4.	Espectroscopia UV–Visible.....	49
2.5.	Microscopía de Fuerzas Atómicas (AFM).....	50
2.5.1.	Operación del AFM.....	52
2.5.2.	AFM modo contacto.....	55
2.5.3.	AFM en el análisis de muestras biológicas.....	58
2.5.4.	Arreglo Experimental.....	59
2.6.	Balanza de Langmuir o de Langmuir–Blodgett.....	60
2.6.1.	Películas de Langmuir.....	61
2.6.2.	Arreglo Experimental de una balanza de Langmuir.....	67
2.6.3.	Films de Langmuir–Blodgett.....	68
2.7.	Microscopía de Ángulo de Brewster (BAM).....	70
2.7.1.	Arreglo Experimental.....	72
	Referencias Bibliográficas.....	74

Capítulo 3.

	Autoensamblado de tioles sobre superficies planas.....	77
3.1.	Introducción.....	78
3.2.	Depósito de plata metálica a subpotencial (Ag–UPD).....	83
3.3.	Parte Experimental.....	85
3.3.1.	Preparación de sustratos de Ag–UPD.....	85
3.3.2.	Preparación de SAMs.....	86
3.3.3.	Espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS).....	87
3.3.4.	Experimentos de electrodesorción de tioles.....	88
3.3.5.	Estudios mediante cálculos teóricos empleando la teoría funcional de la densidad DFT.....	88
3.4.	Caracterización de las superficies planas.....	90
3.4.1.	Caracterización por XPS.....	90
3.4.2.	Datos de electrodesorción de tioles.....	92
3.4.3.	Resultados de DFT.....	94

CONCLUSIONES.....	100
Referencias Bibliográficas.....	101

Capítulo 4.

Síntesis y caracterización fisicoquímica de nanopartículas de plata (AgNPs).105

4.1. Introducción.....	105
4.2. Síntesis de AgNPs.....	107
4.3. Estructura y forma de las nanopartículas metálicas.....	108
4.4. Parte Experimental: Métodos de síntesis para las AgNPs.....	110
4.4.1 Síntesis I: CIT–AgNPs y MBA–AgNPs.....	110
4.4.1.1 Caracterización de las AgNPs.....	110
4.4.2 Síntesis II: CIT–AgNPs y MBA–AgNPs de mayor concentración.....	118
4.4.2.1 Caracterización de las AgNPs.....	119

CONCLUSIONES.....	125
Referencias Bibliográficas.....	126

Capítulo 5.

Interacción de CIT–AgNPs y MBA–AgNPs con bicapas del fosfolípido DMPC, soportadas sobre superficies lisas.....129

5.1. Introducción.....	129
5.2. Fusión de vesículas.....	133
5.3. Caracterización mecánica de membranas lipídicas.....	138
5.4. Parte Experimental.....	139
5.4.1. Reactivos.....	139
5.4.2. Preparación de vesículas de DMPC.....	139
5.4.3. Preparación de bicapas de DMPC.....	139
5.4.4. Caracterización mediante AFM.....	140
5.5. Fusión de vesículas de DMPC sobre mica.....	140
5.6. Caracterización de CIT–AgNPs y MBA–AgNPs sobre mica.....	144
5.7. Interacción de DMPC con CIT–AgNPs y MBA–AgNPs.....	147

CONCLUSIONES.....	155
Referencias Bibliográficas.....	156

Capítulo 6.

Interacción de AgNPs hidrofílicas con DMPC, como una biomembrana modelo.....161

6.1. Introducción.....	161
6.2. Parte Experimental.....	164
6.2.1. Monocapas en la interfase aire/buffer.....	164
6.2.2. Adsorción de las AgNPs en la interfase aire/buffer e interacción con monocapas de fosfolípido.....	166
6.2.3. Visualización de la microscopía de ángulo de Brewster.....	169
6.2.4. Cálculos DFT.....	170
6.3. Caracterización de las monocapas de DMPC.....	171
6.3.1. Adsorción de las CIT–AgNPs y MBA–AgNPs a la interfase de monocapas de DMPC.....	171
6.3.2. Estructura superficial del citrato y del MBA adsorbidos en AgNPs.....	181

CONCLUSIONES.....	187
Referencias Bibliográficas.....	188

Capítulo 7.

Conclusiones Generales.....193

Apéndice.....197

Agradecimientos.....199

Resumen

El estudio del transporte y la interacción de nanopartículas (NPs) con membranas biológicas es un aspecto relevante para su empleo en el campo de la nanomedicina, en diagnóstico de enfermedades y otras aplicaciones de la nanotecnología. La variedad enorme de diseños de NPs en cuanto a formas, tamaños y modificadores superficiales abre numerosas preguntas acerca de cómo es la interfase y cómo se modifican las membranas interactuando con las NPs en cuánto a posible formación de poros, defectos o fenómenos de permeación de agua o especies iónicas. Dentro de los diversos campos en los que se aplican actualmente conceptos de biomimetismo, son de gran interés los procesos y sistemas asociados con las membranas celulares. Estos sistemas tienen como base estructural la bicapa lipídica, la cual puede ser definida como una organización supramolecular consistente en un arreglo bidimensional de moléculas de fosfolípidos. Las bicapas de fosfolípidos pueden ser consideradas como sistemas modelo de las membranas celulares ya que preservan su fluidez bidimensional y pueden modificarse con proteínas de membrana, canales iónicos, receptores, transportadores y emplearse en numerosas aplicaciones en el campo de la biotecnología. Estos sistemas soportados se pueden caracterizar muy bien y constituyen el sustrato con el cual se estudiarán las interacciones con NPs, que por su parte deben ser sondas adecuadas para discutir los distintos aspectos de las interacciones que se pretenden dilucidar. Otro de los sistemas comúnmente empleados como sistemas modelo de biomembrana son las monocapas lipídicas que son películas que se obtienen mediante la deposición de las moléculas de los lípidos en una balanza de Langmuir donde es posible controlar tanto la organización y composición de la fase lipídica, como la de la subfase. De esta forma resultan particularmente útiles en el marco de la presente tesis ya que permiten investigar los distintos factores que intervienen en las interacciones NP-membrana.

En este marco, este trabajo de Tesis se centra en el estudio de la interacción de nanopartículas de plata (AgNPs) recubiertas con citrato

trisódico de sodio (CIT-AgNPs) y con ácido 4-mercaptobenzoico (MBA-AgNPs) con sistemas modelo de biomembrana constituidos por monocapas de Langmuir o bicapas soportadas del lípido dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC).

La caracterización de las CIT-AgNPs y de las MBA-AgNPs, se realizó mediante Espectroscopia ultravioleta-visible(UV-Vis), Espectroscopia de Fluorescencia, Espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS), Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HRTEM), AFM y medida de su potencial zeta. Esta caracterización permitió conocer su tamaño, morfología, la naturaleza y estructura del recubrimiento superficial, las propiedades ópticas y las características de su carga superficial. Se realizaron estudios mediante XPS, HRTEM, técnicas electroquímicas y modelos teóricos de DFT de monocapas de MBA adsorbidas sobre superficies planas de Ag depositadas a subpotenciales sobre Au(111) para comprender la estructura superficial de las SAMs en los planos predominantes de las nanopartículas de Ag tal como son los de orientación (111).

Para la construcción de sistemas biomiméticos se prepararon bicapas lipídicas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) por fusión de vesículas sobre mica para estudiar la adsorción/inserción de las nanopartículas en las distintas regiones de la bicapa tales como bordes, defectos y zonas planas mediante microscopía de fuerzas atómicas (AFM). En el caso de usar como sistema modelo de biomembrana las monocapas soportadas de DMPC en balanza de Langmuir se buscó comprender el rol del orden/desorden de la monocapa en función de la presión lateral aplicada pudiendo cuantificar las interacciones de las nanopartículas en la subfase acuosa con la monocapas lipídicas a través de las isothermas de adsorción y las imágenes de microscopía de ángulo de Brewster (BAM).

Los resultados obtenidos mostraron que las AgNPs exhibieron comportamientos distintos dependiendo de la naturaleza química del recubrimiento superficial y del ordenamiento de la capa de fosfolípidos. Se propone una explicación basada en la densidad de carga superficial y la naturaleza química del recubrimiento de las AgNPs.

Capítulo 1

Introducción General

1.1. Nanopartículas de plata: Propiedades, aplicaciones y toxicidad.

El uso de nanopartículas (NPs) sintéticas se ha incrementado enormemente en los últimos años debido a su creciente uso en aplicaciones biomédicas y en nanomedicina. Por este motivo es que resulta sumamente importante el estudio de las interacciones entre las nanopartículas con las membranas celulares. En muchos casos las NPs necesitan unirse, romper y penetrar la membrana celular para inducir una respuesta lo cual depende fuertemente de su tamaño, forma, carga superficial y funcionalidad química superficial.¹⁻³ Las NPs con dimensiones menores que 5 nm pueden penetrar en las membranas celulares mientras que las de mayor tamaño alteran la estructura de la membrana, lo cual puede afectar fuertemente su permeabilidad, el potencial de membrana y sus funciones principales.⁴⁻⁷

De manera general, los métodos de preparación de NPs se clasifican como *top-down* (utilizan métodos físicos, procesos de molienda por ejemplo) y como *bottom-up* (métodos químicos en solución coloidal, procesos de formación de partículas a partir

de una solución) (**Figura 1.1**). Los métodos *top-down* son aquellos que reducen el tamaño de agregación del material hasta llegar a un tamaño nanométrico con un consumo considerable de energía, mientras que los métodos *bottom-up* involucran la obtención de un estado de agregación nanométrico partiendo de una dispersión molecular, es decir, un proceso inverso al anterior.

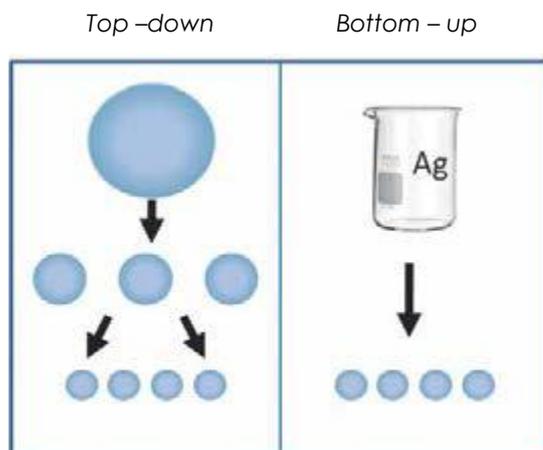


Figura 1.1. Métodos generales de obtención de NPs. Método de obtención a partir de una entidad más grande *top-down* y método de obtención a partir de entidades más pequeñas *bottom-up*.

Mientras que los métodos físicos (*top-down*), tienen la ventaja de ser capaces de producir grandes cantidades de NPs, a su vez, tienen la desventaja de no tener un suficiente control sobre el tamaño de la partícula, produciendo NPs con un amplio intervalo de tamaños que pueden originar un efecto poco controlable y predecible cuando son administradas en un sistema biológico.

Las NPs metálicas en particular, poseen propiedades interesantes con aplicaciones en diversas áreas tecnológicas. A medida que la dimensión de las partículas se reduce, sobre todo en el intervalo de 1 a 10 nm los efectos de tamaño y de superficie son cada vez más notables. Entre los efectos de tamaño más importantes se ha determinado el confinamiento de los electrones, y esto en NPs metálicas y semiconductoras, tiene interesantes implicancias, como es la manifestación de efectos cuánticos en el material, y que pueden percibirse a través de sus propiedades magnéticas y/o de conducción electrónica, por ejemplo, así como de algunas propiedades termodinámicas, como la capacidad calorífica.⁸

Por otro lado, también los efectos de superficie son de gran importancia, ya que en las nanopartículas pequeñas se tiene un incremento en el área superficial por unidad de volumen respecto de los sólidos volumétricos.^{7, 9} Debido a que los átomos en la superficie de la nanopartícula están menos “enlazados” que el resto de sus átomos, y su esfera de coordinación está incompleta, se incrementa su energía libre superficial, afectando propiedades como temperatura de fusión y reactividad química. Por otra parte, la absorción óptica en NPs también es un fenómeno de superficie que se modifica, y se puede modelar dependiendo de las características de la partícula (composición, tamaño, protectores de superficie, etc.).^{10, 11}

El conocimiento de este tipo de propiedades y características ha hecho posibles numerosas aplicaciones de NPs en diversas tecnologías, en áreas como electrónica, medicina y catálisis, pero también existen otras áreas en donde las NPs han sido empleadas, no sólo para crear dispositivos sofisticados o de alta precisión.¹⁰ Aunque se ha marcado como línea prioritaria en un futuro inmediato la aplicación de NPs (de metales y semiconductores principalmente) en áreas de almacenamiento, producción y conversión de energía,¹² en la actualidad se encuentran ya formando parte de productos, equipos y sistemas de uso común para la población, aunque en múltiples ocasiones esto no sea evidente. Uno de los sectores industriales en donde se ha observado un rápido crecimiento con base en nanopartículas de plata (AgNPs), es el área de deportes.¹³⁻¹⁵

1.2. Características y Propiedades.

Una de las características de las NPs en general, es que la relación entre el número de átomos superficiales y el tamaño de la partícula es de carácter exponencial ⁷ (**Figura 1.2**). Por ello, las propiedades relacionadas con la superficie, como las eléctricas, mecánicas, magnéticas, ópticas o químicas de los nanomateriales son diferentes a las de los mismos materiales a escala no nanométrica (materiales masivos o *bulk*). Esas propiedades son importantes conocerlas para entender, predecir y gestionar el riesgo potencial que presentan para las personas.

Cuanta más pequeña sea una partícula de cualquier material, mayor es su superficie en relación con su masa. Con frecuencia, su reactividad y por tanto su toxicidad se ven también aumentadas (ya que el número de átomos en contacto con la superficie es mayor). Si, además, la superficie de una partícula se ha modificado para lograr un determinado comportamiento, esto puede dar lugar a interacciones inesperadas con moléculas biológicas relevantes.¹⁶ El aumento de la actividad biológica en nanopartículas modificadas superficialmente puede ser diseñado para acciones específicas tales como por ejemplo la actividad antioxidante, la capacidad de transportar para la terapéutica, la penetración de barreras celulares), pero también puede tener efectos adversos tales como la toxicidad, la inducción de estrés oxidativo y/o la disfunción celular.⁷

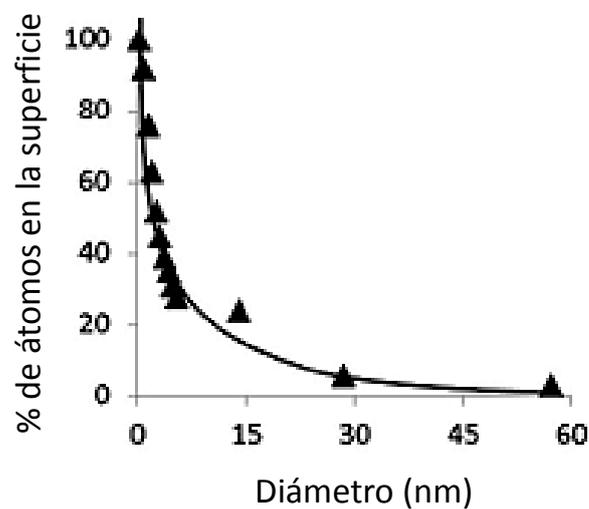


Figura 1.2. Porcentaje de átomos superficiales en función del diámetro de las nanopartículas. Para diámetros inferiores a 1 nm todos los átomos se encuentran en la superficie. El número de átomos superficiales disminuye exponencialmente con el aumento del diámetro reflejando la importancia del área superficial para el aumento de la actividad química y biológica de las partículas de las partículas más pequeñas. Figura adaptada de Singh, A.K.(2016).¹⁷

Los principales parámetros característicos de las NPs son su forma, tamaño, características de la superficie y la estructura interna.

Las NPs tienen diferentes maneras de interactuar entre sí. Estas pueden permanecer libres o agruparse en función de las fuerzas de interacción atractiva o repulsiva entre ellas. Estas interacciones siguen siendo difíciles de caracterizar, pero se deben tener en cuenta tanto para los fenómenos de coalescencia y precipitación, que conducirían a la disminución de la concentración de NPs en solución. Esto

también tiene implicancias en el momento en el que las NPs interaccionen con sistemas biológicos debido a que operará un mecanismo diferente respecto al de las NPs individuales.

Debido a que las NPs metálicas poseen propiedades ópticas y electromagnéticas únicas y que metales como el oro, la plata, el paladio y el cobre, han sido empleados para producir nanopartículas de diversas formas y tamaños; este Trabajo de Tesis centra su interés en la síntesis y caracterización de nanopartículas de plata (AgNPs). El método más común para la preparación de AgNPs, consiste en la reducción de una solución salina de plata con un agente reductor como el borohidruro de sodio, el citrato o el ascorbato.^{18, 19} La tendencia de los métodos de síntesis, actualmente, se enfoca en el uso de compuestos que no causan daño al medio ambiente.²⁰⁻²² Otros métodos consisten en la condensación de gases, irradiación láser y deposición sonoquímica.²⁰

Es importante señalar que la acción antibacteriana de las AgNPs es altamente dependiente del tamaño de la partícula, morfología y dosis.²³ Las NPs deben de ser lo suficientemente pequeñas para penetrar las membranas celulares y con ello afectar el proceso intracelular. Es razonable pensar que la interacción de las NPs con la bacteria depende del área superficial disponible (partículas pequeñas con una mayor área superficial disponible para la interacción tienen más efecto bactericida que las partículas grandes).²⁴ Además de la selección de un método de preparación de las NPs apropiado para garantizar un tamaño de partícula pequeño, es esencial la elección del agente estabilizante superficial para mantener un tamaño de partícula uniforme y una dispersión estable en el transcurso del tiempo (**Figura 1.3**).

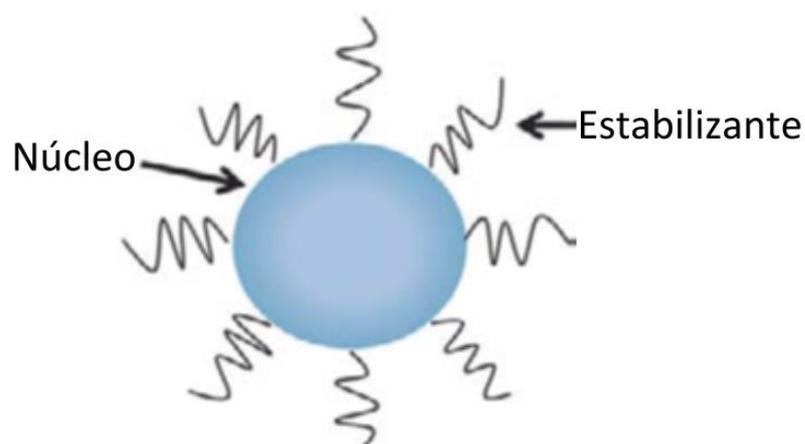


Figura 1.3. Representación esquemática de la estructura de una NP.

Para evaluar la calidad de las distintas metodologías propuestas en la síntesis de AgNPs, se realizaron medidas del tamaño de la partícula, la morfología, el potencial zeta y la estabilidad, y el perfil de resonancia de plasmones. La determinación de la distribución del tamaño de la partícula se realiza mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS), y el estudio de su morfología y tamaño mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM). La caracterización de las NPs obtenidas por diferentes vías sintéticas se realizó también analizando el registro del perfil de resonancia de plasmones superficiales mediante espectroscopia UV-Vis (esta banda es atribuida a la excitación colectiva del gas de electrones en las partículas, con un cambio periódico en la densidad de electrones en la superficie), entre otros.

1.3. Aplicaciones.

La plata (Ag) ha sido ampliamente utilizada desde hace miles de años en la historia de la humanidad, en aplicaciones como la joyería, utensilios, fotografía, etc. Incluso civilizaciones antiguas como la de los griegos utilizaban la plata para cocinar y mantener la seguridad del agua. Sus propiedades antimicrobianas ya se explotaban antiguamente con la medicina tradicional.²⁵

En los últimos años, las AgNPs se están convirtiendo en uno de los productos de mayor crecimiento en la industria de la nanotecnología, debido a su buena conductividad, estabilidad química y su actividad catalítica y antibacteriana.

Su fuerte actividad antimicrobiana es la principal característica para el desarrollo de una amplia variedad de productos con AgNPs, que actualmente, se encuentran disponibles en el mercado. En el ámbito médico, existen apósitos para heridas, dispositivos anticonceptivos, instrumental quirúrgico y prótesis óseas, todos ellos recubiertos o integrados con AgNPs para así evitar el crecimiento bacteriano.^{24, 26} Además, también se está evaluando la utilización de las AgNPs para el tratamiento de enfermedades que requieren una concentración sostenida de fármaco en sangre o con un direccionamiento específico a células u órganos,²⁷ como ocurre con el virus del VIH-1. Ha sido demostrado que en el tratamiento *in vitro* con AgNPs, éstas interaccionan con el virus e inhiben su capacidad para unirse a las células del

huésped.²⁸ En la vida diaria la población puede tener contacto con las AgNPs contenidas en aerosoles, detergentes, refrigeradores, lavadoras, chupetes, sistemas de purificación de aguas, pinturas para paredes y productos cosméticos.²⁹ Las AgNPs también están incorporadas en la industria textil para la fabricación de prendas de vestir, ropa interior y calcetines.³⁰ Mediante la introducción de AgNPs en fibras sintéticas o naturales se consigue una potenciación de la actividad iónica gracias a la liberación de iones plata. El resultado es la obtención de rápidos efectos antimicrobianos y la disminución del olor.¹⁴

El efecto bactericida de los iones de Ag en los microorganismos es bien conocido; sin embargo el mecanismo no es aún muy claro.¹⁶ Algunas propuestas han sido desarrolladas para explicar los efectos inhibitorios de iones plata y plata metálica en microorganismos.³¹ Se plantea que los iones plata interaccionan fuertemente con los grupos tiol de enzimas vitales, provocando su inactivación.³² Es posible también que el ADN de bacterias tratadas con AgNPs pierda su capacidad de réplica, esto por la afinidad de la plata a interaccionar con grupos fosforilados y azufrados.³³ En otros estudios se ha reportado que los iones plata provocan cambios estructurales irreversibles en la membrana celular de las bacterias, afectando drásticamente sus funciones propias como permeabilidad y respiración.^{31, 34}

Algunas características como el tamaño y la forma de las AgNPs influyen de manera importante en la eficacia bactericida. Se ha reportado que cuanto más pequeña es la nanopartícula, mayor es la superficie de contacto, y por lo tanto mayor es el poder bactericida. La inhibición bacteriana depende también de la concentración de las AgNPs y de la cantidad de microorganismos presentes.³⁵

Sin duda el interés por seguir adquiriendo conocimiento acerca de las propiedades biocidas de los nanomateriales metálicos, se justifica por la aparición de nuevas y más agresivas enfermedades, así como por la resistencia a los antibióticos que presentan muchos microorganismos patógenos.²⁵

Finalmente, las AgNPs también tienen su aplicación en el sector alimentario, concretamente en agricultura y en el envasado de los alimentos. Dentro del campo de la agricultura, las AgNPs se emplean para prolongar la conservación de frutos, ya

que además de su actividad antibacteriana presentan un efecto fungistático que retarda el crecimiento de hongos fitopatógenos. Estas AgNPs pueden aplicarse junto con un recubrimiento biodegradable en los frutos, mediante la inmersión de los mismos en la solución formadora de recubrimiento.³⁶ Además, las AgNPs también son empleadas en la fabricación de materiales en contacto con los alimentos, eliminando hasta en un 90% el crecimiento de microorganismos, siendo una alternativa a otros métodos de conservación que emplean la radiación, tratamiento térmico, almacenamiento a baja temperatura, o la introducción de aditivos antimicrobianos.³⁷

1.4. Toxicidad.

En el caso de los nanomateriales, sus características de toxicidad pueden ser diferentes, en magnitud y en efectos, de las de los materiales masivos con la misma composición química.

La información toxicológica del material en escala macroscópica puede servir como base para las estimaciones preliminares sobre la toxicidad de una nanopartícula, junto con los estudios toxicológicos in vivo e in vitro y los estudios epidemiológicos que hayan podido realizarse.

Los estudios experimentales en microorganismos han mostrado que la respuesta biológica a ciertas nanopartículas puede ser mayor que la encontrada para la misma masa de partículas más grandes de composición química similar, debido probablemente al aumento del área superficial. Además del número de partículas y del área superficial, otras características podrían influir en la respuesta biológica, incluyendo la solubilidad, forma, carga, superficie química, propiedades catalíticas, contaminantes adsorbidos, así como el grado de aglomeración.^{38, 39}

Los principales factores que pueden determinar los efectos toxicológicos de los nanomateriales en el organismo son:

- a)** Factores que dependen de la exposición (vía de penetración, duración de la exposición, concentración).

- b)** Factores que dependen del organismo expuesto (susceptibilidad individual, ruta que siguen las nanopartículas una vez que se han introducido en el organismo).
- c)** Factores relacionados con los nanomateriales (toxicidad intrínseca de la sustancia).

La plata en su estado metálico (Ag^0) es inerte, pero puede reaccionar con el agua provocando su ionización de forma inmediata. En su forma iónica, la plata es altamente reactiva.⁴⁰ El mecanismo de toxicidad de las AgNPs es complejo, jugando un papel importante su adsorción como así también los iones liberados desde las partículas hacia la superficie celular. Este mecanismo se podría describir como un efecto sinérgico entre las AgNPs y sus iones.³⁹

El nitrato de plata (AgNO_3) al 0.5% es la solución a base de plata más utilizada para tratar tópicamente heridas por quemaduras, sin embargo en concentraciones por encima del 1% se vuelve tóxica para los tejidos. Pruebas in vitro con AgNO_3 han demostrado la presencia de daños en fibroblastos, hepatocitos y linfocitos.⁴¹

Existe muy poca información sobre la toxicidad de las nanopartículas en general, su tamaño, forma, concentración, composición química, propiedades superficiales y mecanismos de agregación, lo cual representa un serio riesgo para organismos mayores. Nanomateriales de 50 y 70 nm pueden penetrar en las células y pulmones respectivamente, mientras que aquellas de 30 nm pueden incluso llegar a la sangre y al cerebro.⁴² Se observó además, que al aplicar AgNPs con un tamaño promedio de 15 y 100nm, en células de hígado de rata, el efecto tóxico fue mayor al utilizar las de mayor tamaño.⁴³

Investigaciones previas sugieren que existen diversas propiedades fisicoquímicas de las AgNPs que están involucradas en su toxicidad intrínseca, como son principalmente el tamaño, la superficie específica, estado de aglomeración, la forma, la solubilidad y la carga superficial.⁴⁴⁻⁴⁶ Parece que la toxicidad de las AgNPs está mediada por un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), que activa vías de señalización sensibles a oxidantes, y estimula la

inflamación y los eventos genotóxicos, para culminar eventualmente en la muerte celular.³⁸

1.4.1. Tamaño.

El tamaño es una de las propiedades más importantes de las NPs. Muchas publicaciones han mostrado que la toxicidad de las AgNPs depende del tamaño.^{44, 45} Además, el tamaño de las AgNPs también influye en la distribución tisular,⁴⁷ en la penetración dermal e intestinal⁴⁸ y en la captación celular.⁴⁹ En general, los mayores efectos tóxicos han sido observados con las AgNPs más pequeñas. Considerando un caso hipotético con partículas esféricas de tamaño uniforme, una reducción en el tamaño de la partícula de 10 μm a 10 nm aumentará el área superficial de contacto en 10⁹.³³

1.4.2. Superficie específica.

El tamaño y la superficie específica de las NPs están en estrecha relación, ya que conforme disminuye el tamaño de las AgNPs la superficie específica aumenta dejando un mayor número de átomos expuestos en la superficie (ver **Figura 1.2**), que estarán disponibles para las reacciones redox, reacciones fotoquímicas y para interacciones físico-químicas con las células. Además, los átomos pueden dar lugar a liberación de iones plata (Ag^+), que son potencialmente tóxicos.^{50, 51} El área superficial también influye en la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs). Por ejemplo, con la misma concentración de AgNPs de un tamaño de 15 nm se produjeron mayores niveles de EROs en macrófagos que AgNPs de 30 y 50 nm.⁴⁴

1.4.3. Estado de aglomeración.

La estabilidad de las AgNPs también influye en la toxicidad. Las NPs tienen una tendencia natural a formar aglomerados o agregados.⁷ Los aglomerados son grupos de NPs unidas mediante fuerzas relativamente débiles de tipo Van der Waals,

electrostáticas o de tensión superficial, que pueden redispersarse por medios mecánicos mientras que los agregados son grupos de NPs fuertemente asociadas cuya redispersión por medios mecánicos no resulta fácil. Estos dos fenómenos pueden cambiar el lugar de depósito de las AgNPs en el organismo, ya que un agregado o aglomerado de NPs se deposita en unas zonas u otras debido al distinto diámetro hidrodinámico. Además, también se modifica la toxicidad, ya que al ser una estructura relativamente compacta, el área superficial es menor y por tanto la toxicidad también será menor.⁵²

1.4.4. Forma.

La forma también influye en la toxicidad de las AgNPs. Se ha comprobado que las formas de triángulo truncado son más tóxicas que las formas esféricas y alargadas, ya que contienen más caras y por tanto son más reactivas, mientras que las esféricas son las que presentan menor toxicidad.³³ AgNPs esféricas (generalmente con una morfología cubo-octaédrica, decaédrica o cuasi-esférica) tienen predominantemente caras de tipo {100} junto con un pequeño porcentaje de caras tipo {111}, mientras que en el caso de las AgNPs en forma de barras (por ejemplo, barras hexagonales), las superficies laterales están enlazadas por caras de tipo {100} y los extremos por las de tipo {111}.⁵³ Se ha demostrado que la reactividad de la plata se ve favorecida por las caras de alta densidad atómica tales como las de tipo {111}.^{54, 55} Morones, et. al.¹³ demostraron la influencia del facetado de las partículas así como la interacción directa de las caras de tipo {111} con la superficie bacteriana. Por lo tanto, se espera una alta reactividad de las nanoplacas triangulares truncadas, en comparación con otras partículas que contienen menos caras de tipo {111}, como partículas esféricas o en forma de barra.³³

1.4.5. Solubilidad.

La solubilidad en fluidos biológicos (diferentes pH, o presencia de sales) es otro parámetro importante. Cuando las NPs se disuelven pierden su estructura de NPs, pudiendo liberar iones metálicos tóxicos para las células que deben tener ciertas

consideraciones toxicológicas similares a las de otro contaminante con efectos sistémicos.⁵² La liberación de Ag^+ a partir de las AgNPs requiere más investigaciones, ya que todavía es difícil de interpretar si la toxicidad observada de las AgNPs se debe a las propias NPs o es debido a la liberación de iones Ag^+ o a un efecto combinado donde se produce una gran concentración superficial de Ag^+ en el área de las NPs que se oxida para dar lugar a esos iones.

1.4.6. Carga superficial.

Existen estudios donde se ha observado una correlación directa entre la carga superficial y la toxicidad de las AgNPs. Las AgNPs estabilizadas con citrato con cargas superficiales negativas fueron menos citotóxicas que las AgNPs con cargas superficiales positivas estabilizadas con polietilenimina ramificada.⁵⁶

La magnitud de la toxicidad de las AgNPs cargadas negativamente se correlaciona con la cantidad de iones Ag disueltos que las partículas producen en solución y demuestra la capacidad de las AgNPs cargadas positivamente a interactuar fuertemente con la superficie bacteriana, obteniendo altas concentraciones de iones Ag biodisponibles a partir de estas partículas. Las partículas cargadas positivamente también interfieren con el normal funcionamiento de la cadena bacteriana de transporte de electrones y son responsables de la formación de EROs en la membrana celular.⁵⁷

Algunos estudios han reportado que la carga positiva del ion Ag es determinante para su actividad microbiana a través de atracciones electrostáticas entre la membrana celular cargada negativamente y nanopartículas cargadas positivamente.^{15, 58, 59}

Algunos estudios aceptan ampliamente que la liberación de iones Ag^+ es un mecanismo importante para los efectos biocidas que poseen las AgNPs. Sin embargo, se ha demostrado que las interacciones directas de las AgNPs con células microbianas pueden dar lugar a una mayor toxicidad. Estos estudios demostraron que AgNPs de 10 nm fueron 10 veces más tóxicas que las de 80 nm y las AgNPs cargadas positivamente

eran 10 veces más tóxicas que las cargadas negativamente (protegidas con CIT). Por lo tanto, la variación de las dimensiones, del revestimiento y de la carga de las AgNPs puede ser empleada para diseñar nuevos nanomateriales antifúngicos más eficientes.⁶⁰

Como se indicó anteriormente, incluso con la misma composición química, las NPs presentan diferentes propiedades fisicoquímicas y estas diferencias son un factor importante para la influencia celular. Por tanto, es muy importante realizar una caracterización detallada de cada una de las NPs antes de realizar cualquier otro ensayo de toxicidad, con el fin de entender las influencias que tendrán en las células, además de comprender y controlar la síntesis y las aplicaciones de las NPs.

La caracterización de las NPs se puede llevar a cabo utilizando una variedad de técnicas como por ejemplo, la microscopía electrónica de transmisión (TEM) (determina el tamaño del núcleo metálico), la microscopía de fuerza atómica (AFM) (mide tamaños individuales de NPs y distribuciones de tamaños en regiones de superficies donde estén presentes), la microscopía electrónica de barrido (SEM), y por último, a través de la dispersión de luz dinámica (DLS) (determina el radio hidrodinámico, esto es, el tamaño de la NP, núcleo+corona+capa de disolvente).^{61, 62} La composición de las NPs se puede determinar utilizando la espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS) (mide el estado de oxidación del elemento metálico), por resonancia magnética nuclear (RMN) (determina la corona orgánica de las NPs), por espectrometría de emisión atómica con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP) y por último, por espectrometría de absorción atómica (FAAS), (ambas determinan la concentración de metal). Otras técnicas que también se podrían emplear para la caracterización de las NPs son la espectrometría de infrarrojo (IR) y la espectrometría de ultra violeta (UV), entre otras.^{63, 64}

Como ocurre con otras NPs, la toxicidad de las AgNPs parece estar asociada con su naturaleza oxidativa e inflamatoria,⁶⁵ la cual genera genotoxicidad⁵¹ y citotoxicidad.⁴³ La generación de EROs (especies reactivas de oxígeno) y el estrés oxidativo parecen ser los dos mecanismos principales de toxicidad.⁶⁶ En el organismo debe existir un equilibrio entre las EROs y los sistemas de defensa antioxidante. Cuando dicho equilibrio se rompe a favor de las EROs se produce el denominado estrés o daño

oxidativo.⁶⁷ Las AgNPs pueden interactuar con los grupos tioles de péptidos y proteínas constitucionales de las células de mamíferos. Estos péptidos y proteínas como glutatión, tioredoxina, superóxido dismutasa (SOD) y peroxidasa de tioredoxina, son componentes claves para el mecanismo de defensa antioxidante de las células, que es el responsable de neutralizar el estrés oxidativo de las EROs generado en gran medida por el metabolismo energético mitocondrial.⁶⁸ Por tanto, se sugiere que las AgNPs pueden disminuir los mecanismos de defensa antioxidante, a través de la reducción de glutatión, inactivación de la SOD, promoviendo la peroxidación lipídica, etc.^{44, 69} En consecuencia, la acumulación de EROs y el estrés oxidativo provocan una gran cantidad de eventos fisiológicos y celulares incluyendo el estrés, perturbación y destrucción de la mitocondria, inflamación, daño al ADN y apoptosis.⁷⁰

Sin embargo, debido a que las AgNPs liberan iones Ag^+ en medio acuoso,⁷¹ sería necesario distinguir entre los efectos tóxicos de las AgNPs y los iones Ag^+ disueltos. Los resultados de investigaciones recientes parecen ambiguos. Algunos investigadores sugieren que la toxicidad de las AgNPs se debe a la liberación de Ag^+ , ya que según sus estudios ambos presentan una respuesta biológica similar.⁷² En contraste, se sugiere que la toxicidad inducida por las AgNPs es independiente de los Ag^+ libres.^{71, 73}

Finalmente, es necesario tener en cuenta la internalización de las AgNPs por las células, ya que la captación de las AgNPs influye en la fisiología y el funcionamiento normal de las células. Se sabe que la membrana celular presenta abundantes proteínas con grupos tioles, por lo que las interacciones entre las AgNPs y las proteínas pueden tener un papel importante para la internalización de las AgNPs.⁷⁴ Los procesos responsables de captación de las AgNPs incluyen mecanismos activos, como la endocitosis, así como también mecanismos pasivos como la difusión que operan dependiendo del tamaño de las partículas.⁷⁵ Además, hay que tener en cuenta que las AgNPs pueden liberar Ag^+ , los cuales pueden ser internalizados por los mismos mecanismos que las AgNPs o a través de los canales iónicos de la membrana celular.

1.5. Sistemas biomiméticos.

Desde hace varios años, ha llamado la atención el estudio y la comprensión de los procesos que ocurren en los seres vivos a partir del punto de vista tecnológico debido a la especificidad y eficiencia con la que se llevan a cabo.^{76, 77} Asimismo, se busca diseñar sistemas en los cuales se imita un aspecto útil de un proceso o sistema biológico. Así, el término "biomimética" fue sugerido por Otto Schmitt, fundador del campo de la ingeniería biomédica, para describir la transferencia de ideas desde la biología hacia la tecnología. Más tarde, Janine Benyus publicó "*Biomimicry: Innovation Inspired by Nature*" ("Biomimetismo: Innovación inspirada en la Naturaleza") redefiniendo el término como "una nueva ciencia que estudia los modelos de la naturaleza y luego los imita o se inspira en estos diseños y procesos para resolver problemas tecnológicos de interés para la sociedad".⁷⁸

Las células están construidas a partir de macromoléculas y ensamblados supramoleculares. Tanto la arquitectura intracelular como las interacciones entre células están basadas en nanoestructuras, las cuales constituyen materiales altamente inteligentes.⁷⁹ Entre algunos de los aspectos importantes presentes en los sistemas vivos, que surgen de su diseño, se encuentran la multifuncionalidad, la organización jerárquica, la adaptabilidad, la fiabilidad, la autorregulación y la autorreparación. Estas características han sido logradas a través de los procesos evolutivos, los cuales se llevan a cabo a escala molecular.⁸⁰ Consecuentemente, el diseño de sistemas biomiméticos se encuentra relacionado no sólo con la comprensión de los mecanismos que operan a esta escala sino también con la configuración de los bloques arquitectónicos empleados por la naturaleza.⁷⁹

Las áreas de trabajo en las que se aplican actualmente conceptos de biomimetismo son varias e incluyen el desarrollo de nuevos materiales, el almacenamiento de información, la producción de energía, la medicina, la farmacología, entre otras.^{77, 79, 80} Especialmente, son de gran interés los procesos y sistemas asociados con las membranas celulares, tal como la capacidad de barrera, transporte activo y pasivo, canales, receptores, motores moleculares, cadena transportadora de electrones y procesos de adhesión y fusión.⁸⁰ Debido a la estabilidad y a la capacidad de autorreparación de las bicapas lipídicas, se han

construido distintos modelos de membranas biomiméticas, en las cuales se emplean componentes de origen biológico o sintético, y donde es posible tener un completo control del sistema.^{79, 80}

Los biosensores constituyen uno de los ejemplos más exitosos de biomimetismo, debido a que combinan la selectividad del componente biológico con el poder de procesamiento de la microelectrónica moderna y la optoelectrónica. De esta manera, ofrecen una herramienta analítica con aplicaciones en medicina, medio ambiente y la industria de alimentos.

El rápido desarrollo de la nanotecnología aumenta la probabilidad de crear nanomateriales que entran en contacto con los seres humanos y el medio ambiente. En la interfase entre los nanomateriales y los sistemas biológicos, los mundos orgánicos y sintéticos se unen en una nueva ciencia que estudia el manejo seguro de la nanotecnología y el diseño de nanomateriales para aplicaciones biológicas. Una 'nano-bio' interfase, se compone de las interacciones fisicoquímicas dinámicas, los intercambios cinéticos y termodinámicos, entre las superficies de los nanomateriales y las superficies de los sistemas biológicos (por ejemplo, membranas, vesículas endocíticas, organelas, ADN y fluidos biológicos). Para que esta ciencia evolucione, es necesario entender las fuerzas dinámicas y los componentes moleculares que determinan estas interacciones. Además, definir cómo modifican las fuerzas fundamentales que rigen en las interacciones de las NPs bajo condiciones coloidales clásicas, y discutir el desarrollo de métodos para explorar la nano-bio interfase, la cual está constituida por tres componentes que interactúan de forma dinámica: **(a)** La superficie de la nanopartícula, cuyas características están determinadas por su composición fisicoquímica; **(b)** La interfase sólido-líquido y los cambios que se producen cuando la nanopartícula interactúa con los componentes en el medio circundante; y **(c)** La zona de contacto de la interfase sólido-líquido con sustratos biológicos (**Figura 1.4**).⁸⁵

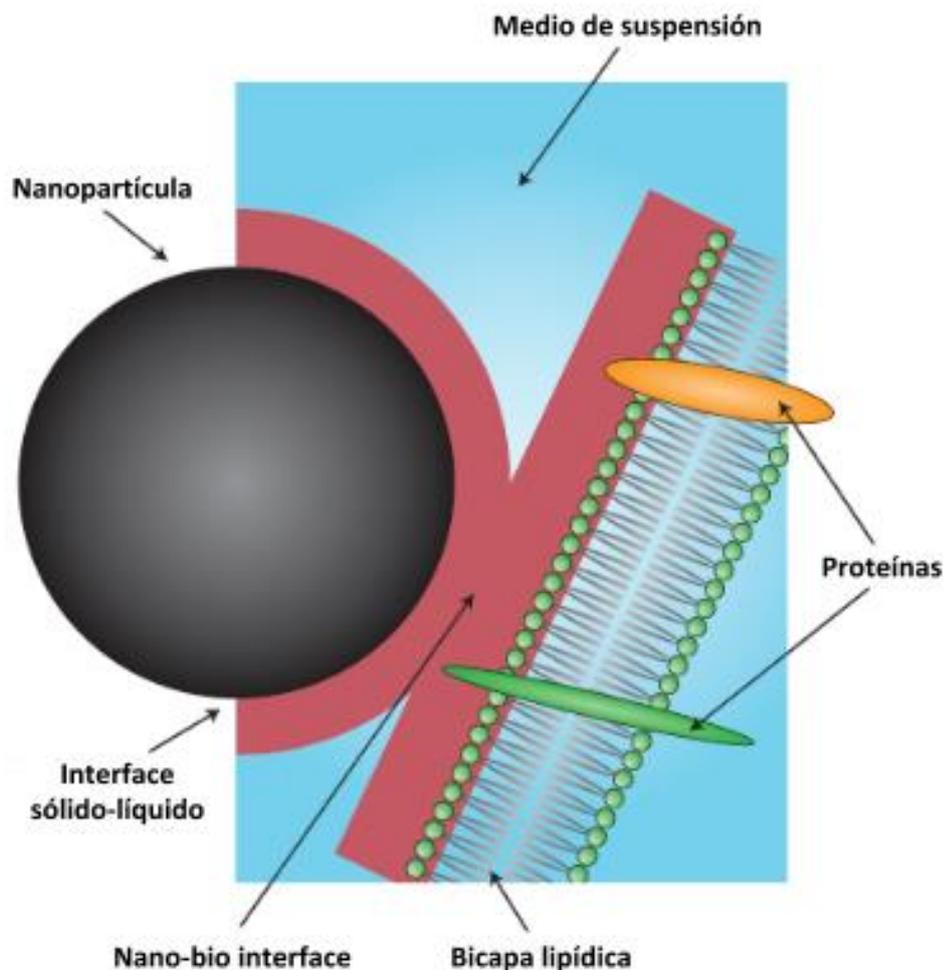


Figura 1.4. Representación de la interfase entre una NP y una bicapa lipídica.⁸⁵

En un medio dado, las características más importantes de una NP que determinan las propiedades superficiales son: la composición química del material, la funcionalización superficial, la forma y el ángulo de curvatura, la porosidad y la cristalinidad de la superficie, la heterogeneidad, la rugosidad, y la hidrofobicidad o hidrofiliidad.^{1, 86, 87} Otras propiedades cuantificables, tales como la carga superficial efectiva (potencial zeta), la agregación de partículas, el estado de dispersión, la estabilidad/biodegradabilidad, las características de disolución, la capa superficial de hidratación y de valencia, están determinadas por las características del medio de suspensión,¹ incluyendo la fuerza iónica, el pH, la temperatura y la presencia de grandes moléculas orgánicas (por ejemplo, proteínas) o detergentes.⁸⁸

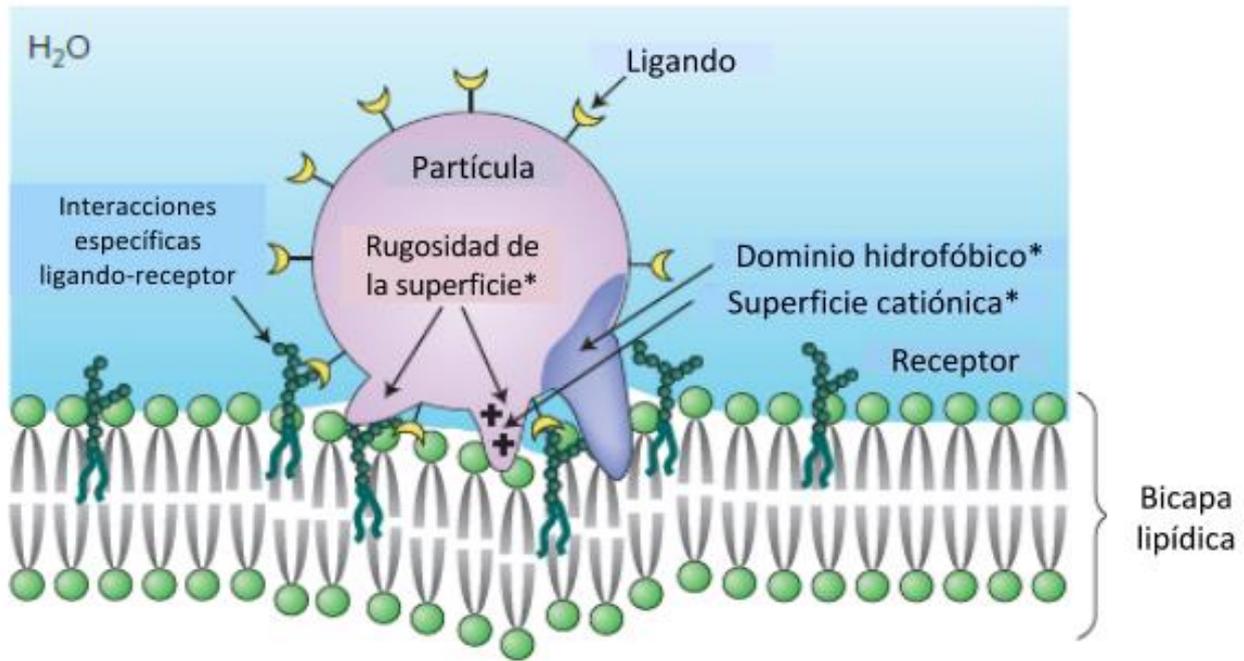


Figura 1.5. Representación de la captación mediada por receptor.⁸⁵

Las características de las partículas contribuyen activamente a las interacciones con el medio a través de: **(a)** la promoción de la adsorción de iones, proteínas, materiales orgánicos naturales y detergentes; **(b)** la formación de la doble capa eléctrica; **(c)** la disolución; o **(d)** la minimización de la energía libre superficial por reestructuración de la superficie.^{89, 90} Por otra parte, las fuerzas atractivas no específicas que promueven el contacto celular y la captación de partículas, surgen a partir de ciertas características intrínsecas de los nanomateriales como la carga superficial, la hidrofobicidad, y la rugosidad, tal y como se puede observar en la **Figura 1.5**. Este es un mecanismo específico a nivel biológico para las partículas que interactúan con la superficie de la membrana. Las características intrínsecas de las NPs que promueven la unión superficial (rugosidad, hidrofobicidad, carga catiónica) generalmente conducen a fuerzas de enlace no específicas (marcadas con asteriscos). Mientras que las interacciones ligando–receptor específicas conducen generalmente a la absorción endocítica.⁹¹

La carga superficial juega un papel importante en las interacciones de las partículas con los grupos de las cabezas polares de los fosfolípidos con carga o con los dominios de proteínas presentes en las superficies celulares.⁹² Si bien la presencia de

cargas positivas o negativas en una NP tienen influencia en las interacciones que se establecerán con un sistema biológico, aquellas con carga positiva generalmente ejercen efectos más fuertes que sus contrapartes aniónicas. Al considerar el papel de la hidrofobicidad en la absorción celular, ésta se complica por la posible hidratación de la superficie de la partícula y/o de la membrana celular. Esta situación da lugar a una serie de interacciones dinámicas, las cuales se determinan por la intensidad de los enlaces formados entre las moléculas de agua y la superficie del material en relación a los enlaces formados entre las propias moléculas de agua.⁸⁵

1.6. Ejemplos de sistemas modelos de membrana celular.

Los modelos de membrana celular son sistemas en los que la organización de los lípidos imita la disposición de los lípidos en las membranas celulares naturales. Las bicapas lipídicas soportadas (SLBs: *Supported Lipid Bilayers*, en inglés), las monocapas de lípidos y los liposomas, son ampliamente utilizados como sistemas modelos de membranas lipídicas artificiales.⁹³⁻⁹⁵

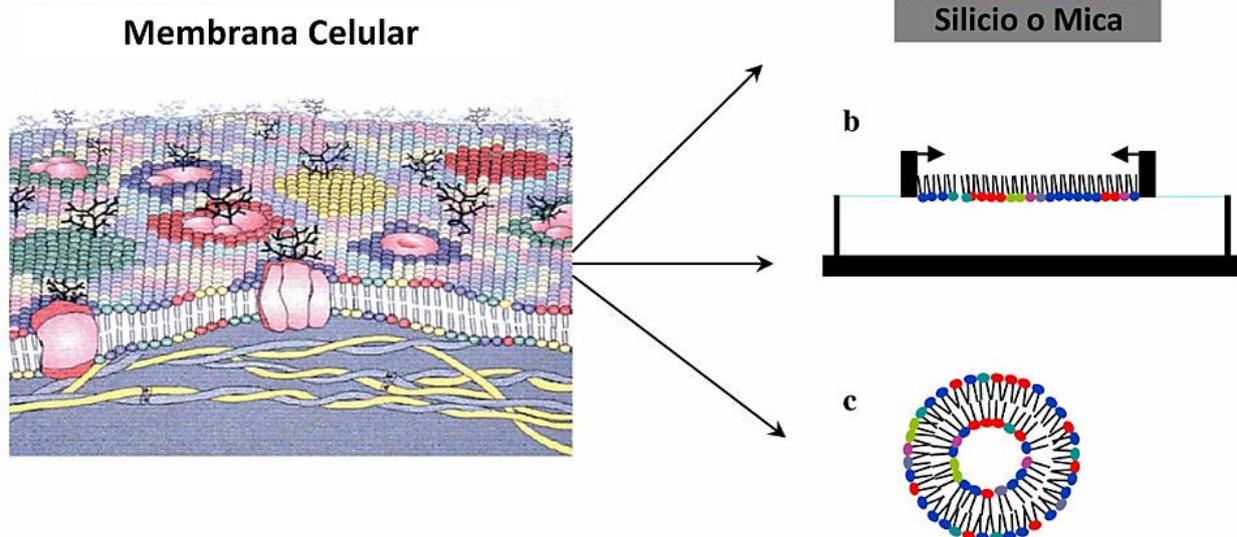


Figura 1.6. Esquema de una biomembrana, que representa la asimetría de lípidos de membrana, así como microdominios enriquecidos en lípidos particulares y aquellos inducidos por proteínas de membrana.⁹⁶ Sistemas modelo de membrana que imitan la disposición de los lípidos en una membrana celular: (a) Bicapas Lipídicas Soportadas (SLBs); (b) Monocapas lipídicas; (c) Liposoma.

1.6.1. Bicapas lipídicas soportadas (SLBs).

Las SLBs son bicapas lipídicas formadas sobre soportes sólidos atómicamente lisos como el silicio o la mica (**Figura 1.6a**). Generalmente, las SLBs se forman por la fusión de vesículas de lípidos en estos soportes sólidos o pueden formarse a través de la técnica de Langmuir–Blodgett (LB) o también por una combinación de las técnicas LB y Langmuir–Schaeffer (LS).

En la técnica de transferencia LB,^{94, 95} existen diferentes diseños para la deposición de films sobre un sustrato sólido cuya elección depende del tipo de superficie que se desee obtener (superficie con los grupos hidrofílicos o hidrofóbicos del film expuestos). Para realizar transferencias LB es necesario formar un film monomolecular en la interfase agua/aire empleando una balanza de Langmuir, para esto un sustrato se sumerge en la subfase antes de la formación de una monocapa de Langmuir en la subfase; la monocapa de Langmuir se transfiere después levantando verticalmente el sustrato a través de la monocapa. En la técnica de LS,⁹⁶ un sustrato hidrofóbico se dispone horizontalmente a la interfase; la monocapa se transfiere sobre el sustrato hidrofóbico por contacto con la monocapa de Langmuir por un determinado período de tiempo (30–60 seg). En la técnica de transferencia combinada, la primera capa es transferida por la técnica LB y la segunda por la técnica LS.^{97, 98}

Los cambios en la estructura, morfología y química de la superficie de las SLBs después de la interacción con fármacos o sistemas de liberación de fármacos, nanopartículas, proteínas, etc., pueden ser investigados utilizando diversas técnicas, tales como la dispersión de rayos-X, la microscopía electrónica de barrido (STM), la microscopía de fuerza atómica (AFM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopia de fotoelectrones de rayos-X (XPS).^{102, 103}

1.6.2. Monocapas Lipídicas.

Las monocapas lipídicas se pueden formar en la superficie de la interfase agua/aire usando una balanza de Langmuir (**Figura 1.6b**). En el sistema modelo de

Langmuir varios parámetros tales como la composición de lípidos, de la subfase, y la temperatura pueden elegirse para imitar las condiciones biológicas.^{104, 105} Además, las monocapas lipídicas están muy bien definidas, son estables, y tienen un arreglo bidimensional (2D) homogéneo con geometría plana. Típicamente, la interacción de nanopartículas, de un sistema de liberación de fármacos y de proteínas con lípidos se puede investigar de dos maneras, ya sea formando monocapas mixtas o bien realizando estudios de penetración en monocapas.

Además de estudiar las variaciones en la presión de superficie (π), se pueden evaluar cambios en el potencial de superficie (ΔV) y cambios en la topografía de los films en la interfase aire/agua mediante microscopía de ángulo de Brewster (BAM: *Brewster Angle Microscopy*, en inglés).^{106, 107} Los cambios en topografías son importantes de considerar cuando se quieren comparar los resultados obtenidos a través de modelos experimentales con lo que ocurre en sistemas biológicos dado que las restricciones impuestas por el ordenamiento en una superficie condicionan el tipo de interacciones que se establecen. La BAM permite el estudio *in situ* de las monocapas de Langmuir en la interfase fluida. Esta técnica no utiliza sondas (tal como se requiere en la microscopía de fluorescencia) o cualquier otra modificación de la muestra para su análisis; por lo tanto, se asegura que la monocapa a analizar se encuentre en su estado original. Una monocapa lipídica después de la interacción con nanopartículas, fármacos o proteínas, puede ser transferida a una superficie sólida lisa molecularmente, tal como el silicio o la mica por la técnica LB o LS. Esta monocapa transferida puede caracterizarse por varias técnicas microscópicas para investigar los efectos de la interacción de las nanopartículas, los fármacos o las proteínas en los lípidos de la superficie.

1.6.3. Liposomas

Los liposomas son vesículas lipídicas esféricas con un compartimento acuoso interno (**Figura 1.6c**).¹⁰⁸ Se pueden preparar tres diferentes tipos de liposomas unilamelares: pequeños (20–50 nm), grandes (50–100 nm) o gigantes (10–100 micras) (SUVs, LUVs, o GUVs). Los GUVs son los que están cerca del tamaño de una célula real.

Típicamente, los SUVs y los LUVs se preparan disolviendo los lípidos en disolventes orgánicos (por ejemplo una mezcla de cloroformo:metanol), a continuación, se evaporan los disolventes bajo vacío para formar un film delgado de lípidos en el recipiente donde están contenidos. Las películas lipídicas secas se hidratan en un buffer deseado para formar vesículas multilamelares (MLVs). La suspensión de MLVs se somete a agitación seguida de sonicación. Posteriormente las MLVs pueden ser sometidas a ciclos de congelación/descongelación que otorgan mayor estabilidad a las estructuras autoensambladas.¹⁰⁹ Para la obtención de LUVs es necesario extrudir las MLVs. Para esto se hace pasar la suspensión de MLVs a través de un poro de tamaño definido presente en un extrusor. Las SUVs se obtienen sometiendo a las MLVs a ultrasonificación generalmente empleando sonicadores de punta de alta potencia.

Los GUVs son preparados por electroformación.¹¹⁰⁻¹¹² En este método, la película de lípido se seca bajo un campo energético oscilante. Típicamente, un generador de onda estándar se utiliza para aplicar 1 V a 10 Hz entre los electrodos sobre el que una película fina de lípidos se ha secado en presencia de agua para formar GUVs. Los liposomas son muy adecuados para la investigación de la permeabilidad de fármacos individuales o bien contenidos en sistemas de liberación de drogas (*drug delivery systems*), ya que la composición, la estructura y la dinámica de los fosfolípidos pueden ser completamente controladas; además, son generalmente aceptados como modelos para estudios *in vitro* de las propiedades y estructura de las membranas celulares.^{108, 113} Asimismo, permiten el uso de varias técnicas espectroscópicas, como la fluorescencia y espectroscopia Raman, para estudiar las interacciones biofísicas.

No obstante, para un gran número de técnicas superficiales, como la microscopía de fuerzas atómicas (AFM) que permiten el estudio morfológico y de propiedades mecánicas, es imprescindible la inmovilización de las bicapas lipídicas sobre una superficie sólida.¹¹⁴⁻¹¹⁶

Existen diferentes métodos para inmovilizar fosfolípidos sobre sustratos sólidos para obtener una bicapa soportada.^{114, 115, 117} Entre los más divulgados, se encuentra la transferencia secuencial de dos monocapas desde la interfase agua/aire por medio de la técnica de Langmuir–Blodgett (LB) y Langmuir–Schäfer (LS),⁹³ por esparcimiento de bicapas¹¹⁸ y por fusión de vesículas.¹¹⁹ Si bien las dos primeras técnicas (LB y LS) son

muy útiles, se requiere un equipamiento especial (Balanza de Langmuir–Blodgett) y un riguroso estudio de las condiciones para realizar una transferencia óptima, por lo que entonces, se han desarrollado estrategias más sencillas. Siendo, el método de fusión de vesículas el más ampliamente utilizado, el cual implica la adhesión y ruptura de las vesículas preformadas sobre una superficie suficientemente hidrofílica, permitiendo de esta manera, en este caso, la construcción de bicapas lipídicas soportadas para el estudio de interacciones con AgNPs mediante AFM.

En las últimas décadas, la microscopía de fuerzas atómicas (AFM), se ha transformado en una herramienta esencial para la caracterización de superficies de materiales y posee una alta resolución, lo que permite visualizar la materia a nivel atómico. Esta técnica ha trascendido su utilidad primaria para visualizar superficies a escalas pequeñas, hasta utilizarse como instrumento de escritura para diseñar patrones nanométricos sobre superficies, y medir diferentes propiedades superficiales (magnetismo, conductividad, fuerzas de adhesión, etc.) en forma local en superficies de muestras no conductoras.

Una de las principales ventajas de las microscopías de barrido de sonda (SPMs), dentro de las que se encuentra nuestra técnica de interés, AFM, respecto a otras técnicas de caracterización superficial a nivel micro y nanométrico (por ejemplo microscopía de barrido electrónico, SEM; y microscopía de transmisión electrónica, TEM), es que las SPMs son técnicas no destructivas que pueden operar en casi cualquier ambiente incluyendo aire, líquido y vacío. Otra ventaja, es que en la mayoría de los casos no hace falta ningún tratamiento especial de la muestra para poder realizar el análisis.

Estas técnicas de caracterización permiten que las muestras a analizar puedan permanecer en su ambiente natural (se puede trabajar en aire, bajo atmósfera de nitrógeno o argón, en medio líquido acuoso, etc.), lo cual es una gran ventaja frente a otras técnicas en las que se requiere, por ejemplo, trabajar en vacío. En cualquiera de los medios en los que la muestra esté, el sistema se puede termostatar entre temperatura ambiente y 250°C, haciendo que su gran potencial para investigar muestras biológicas se extienda en un rango tal, que va desde células hasta moléculas únicas, tales como ADN o gran variedad de proteínas. Los microscopios trabajan

grabando digitalmente la topografía de un material (o de una muestra depositada en un sustrato) para posteriormente procesar esta información y obtener, tanto medidas de rugosidad superficial (microscopio interferométrico y AFM), altura de capas o defectos como la forma y la distribución de los objetos o de las estructuras encontradas en la superficie. También permite la medida cuantitativa de diferentes propiedades de los materiales, como, por ejemplo, la respuesta mecánica bajo fuerzas de compresión con resolución en el rango de los piconewtons (modo Espectroscopia de Fuerzas), la detección y presencia de dominios magnéticos (modo MFM), la detección de cargas estáticas superficiales (modo Potencial de Superficie SPM), el contraste composicional de diferentes materiales (medida de fase), cambios en fuerzas de fricción (LFM), etc.¹²⁰

Todo lo que se describe en este capítulo sirve para dar un marco sobre las motivaciones y sistemas que se estudiarán en el presente Trabajo de Tesis Doctoral.

Como objetivo general se plantea, el estudio de las interacciones de nanopartículas de plata con sistemas modelo de biomembrana tales como las monocapas lipídicas formadas en una balanza de Langmuir y las bicapas lipídicas soportadas sobre sustratos sólidos. Se buscará comprender los factores que intervienen en la adsorción/inserción de las nanopartículas de acuerdo a la naturaleza química del modificador superficial de las nanopartículas, su cubrimiento, su estructura, su carga y las características del sistema modelo de biomembrana.

En cuanto a los objetivos específicos se pretende sintetizar nanopartículas de Ag con modificadores superficiales que permitan su solubilidad en medios acuosos. Se buscará la caracterización fisicoquímica de estas nanopartículas mediante distintas técnicas de análisis de superficie. Se estudiará también la adsorción de las moléculas empleadas como modificadores superficiales de las nanopartículas en superficies planas ordenadas de plata para interpretar y discutir sus propiedades fisicoquímicas, composición y estructura. Para la construcción de sistemas biomiméticos se prepararán bicapas lipídicas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) por fusión de vesículas sobre mica

para estudiar la adsorción/inserción de las nanopartículas en las distintas regiones de la bicapa tales como bordes, defectos y zonas planas mediante microscopía de fuerzas atómicas (AFM). En el caso de usar como sistema modelo de biomembrana las monocapas soportadas de DMPC en la balanza de Langmuir se pretende comprender el rol del orden/desorden de la monocapa en función de la presión lateral aplicada pudiendo cuantificar las interacciones de las nanopartículas en la subfase acuosa con la monocapas lipídicas a través de las isothermas de adsorción y las imágenes de microscopía de ángulo de Brewster (BAM).

Referencias Bibliográficas

- [1] Nel, A.; Xia, T.; Mädler, L.; Li, N., Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science* **2006**, *311* (5761), 622-627.
- [2] Schulz, M.; Olubummo, A.; Binder, W. H., Beyond the lipid-bilayer: interaction of polymers and nanoparticles with membranes. *Soft Matter* **2012**, *8* (18), 4849-4864.
- [3] Roiter, Y.; Ornatska, M.; Rammohan, A. R.; Balakrishnan, J.; Heine, D. R.; Minko, S., Interaction of Nanoparticles with Lipid Membrane. *Nano Letters* **2008**, *8* (3), 941-944.
- [4] Mahmoudi, M.; Meng, J.; Xue, X.; Liang, X. J.; Rahman, M.; Pfeiffer, C.; Hartmann, R.; Gil, P. R.; Pelaz, B.; Parak, W. J., Interaction of stable colloidal nanoparticles with cellular membranes. *Biotechnology Advances* **2014**, *32* (4), 679-692.
- [5] Baroli, B.; Ennas, M. G.; Loffredo, F.; Isola, M.; Pinna, R.; López-Quintela, M. A., Penetration of metallic nanoparticles in human full-thickness skin. *Journal of Investigative Dermatology* **2007**, *127* (7), 1701-1712.
- [6] Shang, L.; Nienhaus, K.; Nienhaus, G. U., Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *Journal of Nanobiotechnology* **2014**, *12* (1), 1.
- [7] Oberdörster, G.; Oberdörster, E.; Oberdörster, J., Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environmental Health Perspectives* **2005**, *113* (7), 823-839.
- [8] BOROVIKSKAYA, E.; SHUR, M. S., LOW-DIMENSIONAL SYSTEMS. In *Quantum Dots*, WORLD SCIENTIFIC: 2011; pp 1-14.
- [9] Israelachvili, J. N., *Intermolecular and surface forces / Jacob N. Israelachvili*. Academic Press: London ; San Diego, 1991.
- [10] Ratner, M. A., *Nanotechnology : a gentle introduction to the next big idea / Mark A. Ratner, Daniel Ratner*. Prentice Hall: Upper Saddle River, NJ, 2003.
- [11] García, M. A., Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications. *Journal of Physics D: Applied Physics* **2011**, *44* (28), 283001.
- [12] Choi, C. Q., Nano World: Top 10 for developing world. *Science Daily* **2005**.
- [13] Morones, J. R.; Elechiguerra, J. L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J. B.; Ramírez, J. T.; Yacaman, M. J., The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **2005**, *16* (10), 2346.
- [14] Chen, C.-Y.; Chiang, C.-L., Preparation of cotton fibers with antibacterial silver nanoparticles. *Materials Letters* **2008**, *62* (21-22), 3607-3609.
- [15] Hamouda, T.; Myc, A.; Donovan, B.; Shih, A. Y.; Reuter, J. D.; Baker, J. R., A novel surfactant nanoemulsion with a unique non-irritant topical antimicrobial activity against bacteria, enveloped viruses and fungi. *Microbiological research* **2001**, *156* (1), 1-7.
- [16] Liu, J.; Wang, Z.; Liu, F. D.; Kane, A. B.; Hurt, R. H., Chemical transformations of nanosilver in biological environments. *ACS Nano* **2012**, *6* (11), 9887-9899.
- [17] Singh, A. K., Chapter 1 - Introduction to Nanoparticles and Nanotoxicology. In *Engineered Nanoparticles*, Academic Press: Boston, 2016; pp 1-18.
- [18] Azcarate, J. C.; Corthey, G. n.; Pensa, E.; Vericat, C.; Fonticelli, M. H.; Salvarezza, R. C.; Carro, P., Understanding the surface chemistry of thiolate-protected metallic nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2013**, *4* (18), 3127-3138.
- [19] Pacioni, N. L.; Borsarelli, C. D.; Rey, V.; Veglia, A. V., Synthetic Routes for the Preparation of Silver Nanoparticles. In *Silver Nanoparticle Applications*, Alarcon, E. I.; Griffith, M.; Udekwu, K. I., Eds. Springer International Publishing: 2015; pp 13-46.
- [20] Sheikh, N.; Akhavan, A.; Kassaee, M. Z., Synthesis of antibacterial silver nanoparticles by γ -irradiation. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures* **2009**, *42* (2), 132-135.
- [21] Guzman, M.; Dille, J.; Godet, S., Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **8** (1), 37-45.
- [22] Sharma, V. K.; Yngard, R. A.; Lin, Y., Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science* **2009**, *145* (1-2), 83-96.
- [23] Breunig, M.; Bauer, S.; Goepferich, A., Polymers and nanoparticles: Intelligent tools for intracellular targeting? *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2008**, *68* (1), 112-128.
- [24] Cheng, D.; Yang, J.; Zhao, Y., Antibacterial materials of silver nanoparticles application in medical appliances and appliances for daily use. *Chin Med Equip J* **2004**, *4*, 26-32.
- [25] Behera, S.; Debata, A.; Nayak, P. L., Biomedical Applications Of Silver Nanoparticles. *Journal of Asian Scientific Research* **2011**, *1* (1), 27-56.
- [26] Cohen, M. S.; Stern, J. M.; Vanni, A. J.; Kelley, R. S.; Baumgart, E.; Field, D.; Libertino, J. A.; Summerhayes, I. C., In Vitro Analysis of a Nanocrystalline Silver-Coated Surgical Mesh. *Surgical Infections* **2007**, *8* (3), 397-404.

- [27] Panyam, J.; Labhassetwar, V., Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, *55* (3), 329-347.
- [28] Elechiguerra, J. L.; Burt, J. L.; Morones, J. R.; Camacho-Bragado, A.; Gao, X.; Lara, H. H.; Yacaman, M. J., Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology* **2005**, *3* (1), 1-10.
- [29] YY, Z.; J, S., - [A study on the bio-safety for nano-silver as anti-bacterial materials]. *Zhongguo Yi Liao Qi Xie Za Zhi* **2007**, *31* (1), 36-8.
- [30] Lee, H. Y.; Park, H. K.; Lee, Y. M.; Kim, K.; Park, S. B., A practical procedure for producing silver nanocoated fabric and its antibacterial evaluation for biomedical applications. *Chemical Communications* **2007**, (28), 2959-2961.
- [31] Cho, K.-H.; Park, J.-E.; Osaka, T.; Park, S.-G., The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Electrochimica Acta* **2005**, *51* (5), 956-960.
- [32] QL, F.; Wu J Fau - Chen, G. Q.; Chen Gq Fau - Cui, F. Z.; Cui Fz Fau - Kim, T. N.; Kim Tn Fau - Kim, J. O.; JO, K., - A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res* **2000**, *52* (4), 662-8.
- [33] Pal, S.; Tak, Y. K.; Song, J. M., Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **2007**, *73* (6), 1712-1720.
- [34] JR, M.; Elechiguerra JI Fau - Camacho, A.; Camacho A Fau - Holt, K.; Holt K Fau - Kouri, J. B.; Kouri Jb Fau - Ramirez, J. T.; Ramirez Jt Fau - Yacaman, M. J.; MJ, Y., - The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **2005**, *16* (10), 2346-53.
- [35] I, S.; B, S.-S., - Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci* **2004**, *275* (1), 177-82.
- [36] Ortega-Arroyo, L.; Martin-Martinez, E. S.; Aguilar-Mendez, M. A.; Cruz-Orea, A.; Hernandez-Pérez, I.; Glorieux, C., Green synthesis method of silver nanoparticles using starch as capping agent applied the methodology of surface response. *Starch - Stärke* **2013**, *65* (9-10), 814-821.
- [37] Brody, A. L.; Bugusu, B.; Han, J. H.; Sand, C. K.; McHugh, T. H., Scientific Status Summary. *Journal of Food Science* **2008**, *73* (8), R107-R116.
- [38] Johnston, H. J.; Hutchison, G.; Christensen, F. M.; Peters, S.; Hankin, S.; Stone, V., A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Critical reviews in toxicology* **2010**, *40* (4), 328-346.
- [39] Zouzelka, R.; Cihakova, P.; Ambrozova, J. R.; Rathousky, J., Combined biocidal action of silver nanoparticles and ions against *Chlorococcales* (*Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella vulgaris*) and filamentous algae (*Klebsormidium* sp.). *Environmental Science and Pollution Research* **2016**, *23* (9), 8317-8326.
- [40] Rai, M.; Yadav, A.; Gade, A., Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* **2009**, *27* (1), 76-83.
- [41] BS, A.; Costagliola M Fau - Hayek, S. N.; Hayek Sn Fau - Dibo, S. A.; SA, D., - Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. *Burns* **2007**, *33* (2), 139-48.
- [42] Chau, C. F.; Wu, S. H.; Yen, G. C., The development of regulations for food nanotechnology. *Trends in Food Science and Technology* **2007**, *18* (5), 269-280.
- [43] SM, H.; Hess KI Fau - Gearhart, J. M.; Gearhart Jm Fau - Geiss, K. T.; Geiss Kt Fau - Schlager, J. J.; JJ, S., - In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol In Vitro* **2005**, *19* (7), 975-83.
- [44] Carlson, C.; Hussain, S. M.; Schrand, A. M.; K. Braydich-Stolle, L.; Hess, K. L.; Jones, R. L.; Schlager, J. J., Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species. *The Journal of Physical Chemistry B* **2008**, *112* (43), 13608-13619.
- [45] Choi, O.; Hu, Z., Size Dependent and Reactive Oxygen Species Related Nanosilver Toxicity to Nitrifying Bacteria. *Environmental Science & Technology* **2008**, *42* (12), 4583-4588.
- [46] Horie, M.; Kato, H.; Fujita, K.; Endoh, S.; Iwahashi, H., In Vitro Evaluation of Cellular Response Induced by Manufactured Nanoparticles. *Chemical Research in Toxicology* **2012**, *25* (3), 605-619.
- [47] De Jong, W. H.; Hagens, W. I.; Krystek, P.; Burger, M. C.; Sips, A. J.; Geertsma, R. E., Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials* **2008**, *29* (12), 1912-9.
- [48] Sonavane, G.; Tomoda, K.; Sano, A.; Ohshima, H.; Terada, H.; Makino, K., In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: Effect of particle size. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2008**, *65* (1), 1-10.
- [49] Chithrani, B. D.; Ghazani, A. A.; Chan, W. C. W., Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Letters* **2006**, *6* (4), 662-668.
- [50] Kittler, S.; Greulich, C.; Diendorf, J.; Köller, M.; Epple, M., Toxicity of Silver Nanoparticles Increases during Storage Because of Slow Dissolution under Release of Silver Ions. *Chemistry of Materials* **2010**, *22* (16), 4548-4554.
- [51] AshaRani, P. V.; Low Kah Mun, G.; Hande, M. P.; Valiyaveetil, S., Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. *ACS Nano* **2009**, *3* (2), 279-290.

- [52] GÁLVEZ, V. T., C.(2010)“Toxicología de las nanopartículas”. *Seguridad y Salud en el Trabajo* 56, 6-12.
- [53] Wiley, B.; Sun, Y.; Mayers, B.; Xia, Y., Shape-controlled synthesis of metal nanostructures: the case of silver. *Chemistry–A European Journal* **2005**, 11 (2), 454-463.
- [54] Ajayan, P.; Marks, L., Quasimelting and phases of small particles. *Physical review letters* **1988**, 60 (7), 585.
- [55] Hatchett, D. W.; White, H. S., Electrochemistry of sulfur adlayers on the low-index faces of silver. *The Journal of Physical Chemistry* **1996**, 100 (23), 9854-9859.
- [56] El Badawy, A. M.; Silva, R. G.; Morris, B.; Scheckel, K. G.; Suidan, M. T.; Tolaymat, T. M., Surface Charge-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles. *Environmental Science & Technology* **2011**, 45 (1), 283-287.
- [57] Ivask, A.; ElBadawy, A.; Kaweeteerawat, C.; Boren, D.; Fischer, H.; Ji, Z.; Chang, C. H.; Liu, R.; Tolaymat, T.; Telesca, D.; Zink, J. I.; Cohen, Y.; Holden, P. A.; Godwin, H. A., Toxicity Mechanisms in Escherichia coli Vary for Silver Nanoparticles and Differ from Ionic Silver. *ACS Nano* **2014**, 8 (1), 374-386.
- [58] Dibrov, P.; Dzioba, J.; Gosink, K. K.; Häse, C. C., Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag⁺ in Vibrio cholerae. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2002**, 46 (8), 2668-2670.
- [59] Dragieva, I.; Stoeva, S.; Stoimenov, P.; Pavlikianov, E.; Klabunde, K., Complex formation in solutions for chemical synthesis of nanoscaled particles prepared by borohydride reduction process. *Nanostructured materials* **1999**, 12 (1), 267-270.
- [60] Kasemets, K.; Suppi, S.; Mantecca, P.; Kahru, A., Charge and size-dependent toxicity of silver nanoparticles to yeast cells. *Toxicology Letters* **2014**, 229, Supplement, S194-S195.
- [61] Choi, Y.; Ho, N. H.; Tung, C. H., Sensing phosphatase activity by using gold nanoparticles. *Angew Chem Int Ed Engl* **2007**, 46 (5), 707-9.
- [62] Yoosaf, K.; Ipe, B. I.; Suresh, C. H.; Thomas, K. G., In Situ Synthesis of Metal Nanoparticles and Selective Naked-Eye Detection of Lead Ions from Aqueous Media. *The Journal of Physical Chemistry C* **2007**, 111 (34), 12839-12847.
- [63] Anghel, I.; Grumezescu, A. M.; Holban, A. M.; Ficai, A.; Anghel, A. G.; Chifiriuc, M. C., Biohybrid nanostructured iron oxide nanoparticles and *Satureja hortensis* to prevent fungal biofilm development. *International Journal of Molecular Sciences* **2013**, 14 (9), 18110-18123.
- [64] Liu, S.; Yuzvinsky, T. D.; Schmidt, H., Effect of Fabrication-Dependent Shape and Composition of Solid-State Nanopores on Single Nanoparticle Detection. *ACS Nano* **2013**, 7 (6), 5621-5627.
- [65] Cho, W. S.; Cho, M.; Jeong, J.; Choi, M.; Cho, H. Y.; Han, B. S.; Kim, S. H.; Kim, H. O.; Lim, Y. T.; Chung, B. H., Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2009**, 236 (1), 16-24.
- [66] Hsin, Y. H.; Chen, C. F.; Huang, S.; Shih, T. S.; Lai, P. S.; Chueh, P. J., The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicology Letters* **2008**, 179 (3), 130-139.
- [67] Kohen, R.; Nyska, A., Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology* **2002**, 30 (6), 620-650.
- [68] Ahamed, M.; Siddiqui, M. K., Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions. *Clin Chim Acta* **2007**, 383 (1-2), 57-64.
- [69] Piao, M. J.; Kang, K. A.; Lee, I. K.; Kim, H. S.; Kim, S.; Choi, J. Y.; Choi, J.; Hyun, J. W., Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicology Letters* **2011**, 201 (1), 92-100.
- [70] Ahamed, M.; Posgai, R.; Gorey, T. J.; Nielsen, M.; Hussain, S. M.; Rowe, J. J., Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2010**, 242 (3), 263-269.
- [71] Kim, S.; Choi, J. E.; Choi, J.; Chung, K. H.; Park, K.; Yi, J.; Ryu, D. Y., Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicology in Vitro* **2009**, 23 (6), 1076-1084.
- [72] Miura, N.; Shinohara, Y., Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2009**, 390 (3), 733-737.
- [73] Asharani, P. V.; Lian Wu, Y.; Gong, Z.; Valiyaveetil, S., Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology* **2008**, 19 (25).
- [74] Chen, X.; Schluesener, H. J., Nanosilver: A nanoparticle in medical application. *Toxicology Letters* **2008**, 176 (1), 1-12.
- [75] Zhu, M.; Nie, G.; Meng, H.; Xia, T.; Nel, A.; Zhao, Y., Physicochemical properties determine nanomaterial cellular uptake, transport, and fate. *Accounts of chemical research* **2012**, 46 (3), 622-631.

- [76] Bender, C. J. In *Chemical Evolution and Biomimetic Chemistry*, ACS symposium series, Oxford University Press: 2009; pp 313-331.
- [77] Yahya, H.; Mossman, T.; Rossini, C. N., *Biomimetics: Technology imitates nature*. Global Pub.: 2006.
- [78] Benyus, J. M., *Biomimicry Innovation Inspired by Nature* (New York: William Morrow & Co.). Inc: 1997.
- [79] Rühle, M.; Dosch, H.; Mittemeijer, E.; Van de Voorde, M., European white book on fundamental research in materials science. **2001**.
- [80] Bronzino, J. D., *Biomedical engineering handbook*. CRC press: 1999; Vol. 2.
- [81] Turner, A.; Karube, I.; Wilson, G. S., *Biosensors: fundamentals and applications*. **1987**.
- [82] Buck, R. P., *Bioanalytic Sensors. Calorimetric, Thermometric*.
- [83] Clark Jr, L., Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions. *ASAIO Journal* **1956**, 2 (1), 41-48.
- [84] Wilson, G. S.; Hu, Y., Enzyme-based biosensors for in vivo measurements. *Chemical Reviews* **2000**, 100 (7), 2693-2704.
- [85] Nel, A. E.; Mädler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M., Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature materials* **2009**, 8 (7), 543-557.
- [86] Oberdörster, G.; Maynard, A.; Donaldson, K.; Castranova, V.; Fitzpatrick, J.; Ausman, K.; Carter, J.; Karn, B.; Kreyling, W.; Lai, D., Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and fibre toxicology* **2005**, 2 (1), 1.
- [87] Vertegel, A. A.; Siegel, R. W.; Dordick, J. S., Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme. *Langmuir* **2004**, 20 (16), 6800-6807.
- [88] Sigmund, W.; Pyrgiotakis, G.; Daga, A., 11 Theory and Applications of Colloidal Processing. *Chemical Processing of Ceramics* **2005**, 269.
- [89] Gilbert, B.; Huang, F.; Zhang, H.; Waychunas, G. A.; Banfield, J. F., Nanoparticles: strained and stiff. *Science* **2004**, 305 (5684), 651-654.
- [90] Min, Y.; Akbulut, M.; Kristiansen, K.; Golan, Y.; Israelachvili, J., The role of interparticle and external forces in nanoparticle assembly. *Nature materials* **2008**, 7 (7), 527-538.
- [91] Verma, A.; Uzun, O.; Hu, Y.; Han, H.-S.; Watson, N.; Chen, S.; Irvine, D. J.; Stellacci, F., Surface-structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles. *Nature materials* **2008**, 7 (7), 588-595.
- [92] Fleck, C. C.; Netz, R. R., Electrostatic colloid-membrane binding. *EPL (Europhysics Letters)* **2004**, 67 (2), 314.
- [93] Tamm, L. K.; McConnell, H. M., Supported phospholipid bilayers. *Biophysical journal* **1985**, 47 (1), 105.
- [94] 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.
- [95] Eytan, G. D., Use of liposomes for reconstitution of biological functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* **1982**, 694 (2), 185-202.
- [96] Escribá, P. V.; González-Ros, J. M.; Goñi, F. M.; Kinnunen, P. K.; Vigh, L.; Sánchez-Magraner, L.; Fernández, A. M.; Busquets, X.; Horváth, I.; Barceló-Coblijn, G., Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies. *Journal of cellular and molecular medicine* **2008**, 12 (3), 829-875.
- [97] Lieser, G.; Mittler-Neher, S.; Spinke, J.; Knoll, W., Electron microscopic investigations on free-standing mixed lipid Langmuir-Blodgett-Kuhn monolayers: phase separation and aging process. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1994**, 1192 (1), 14-20.
- [98] Clausell, A.; Busquets, M. A.; Pujol, M.; Alsina, A.; Cajal, Y., Polymyxin B-lipid interactions in Langmuir-Blodgett monolayers of Escherichia coli lipids: a thermodynamic and atomic force microscopy study. *Biopolymers* **2004**, 75 (6), 480-490.
- [99] Ihalainen, P.; Peltonen, J., Covalent immobilization of antibody fragments onto Langmuir-Schaefer binary monolayers chemisorbed on gold. *Langmuir* **2002**, 18 (12), 4953-4962.
- [100] Hughes, A. V.; Howse, J. R.; Dabkowska, A.; Jones, R. A.; Lawrence, M. J.; Roser, S. J., Floating lipid bilayers deposited on chemically grafted phosphatidylcholine surfaces. *Langmuir* **2008**, 24 (5), 1989-1999.
- [101] Liu, J.; Conboy, J. C., Structure of a gel phase lipid bilayer prepared by the Langmuir-Blodgett/Langmuir-Schaefer method characterized by sum-frequency vibrational spectroscopy. *Langmuir* **2005**, 21 (20), 9091-9097.
- [102] Giocondi, M.-C.; Le Grimmeléc, C., Temperature dependence of the surface topography in dimyristoylphosphatidylcholine/distearoylphosphatidylcholine multibilayers. *Biophysical journal* **2004**, 86 (4), 2218-2230.

- [103] Shaw, J. E.; Slade, A.; Yip, C. M., Simultaneous in situ total internal reflectance fluorescence/atomic force microscopy studies of DPPC/dPOPC microdomains in supported planar lipid bilayers. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (39), 11838-11839.
- [104] Brezesinski, G.; Möhwald, H., Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces. *Advances in colloid and interface science* **2003**, *100*, 563-584.
- [105] Marsh, D., Intrinsic curvature in normal and inverted lipid structures and in membranes. *Biophysical journal* **1996**, *70* (5), 2248.
- [106] Amado, E.; Kerth, A.; Blume, A.; Kressler, J. r., Infrared reflection absorption spectroscopy coupled with Brewster angle microscopy for studying interactions of amphiphilic triblock copolymers with phospholipid monolayers. *Langmuir* **2008**, *24* (18), 10041-10053.
- [107] Corvis, Y.; Barzyk, W.; Brezesinski, G.; Mrabet, N.; Badis, M.; Hecht, S.; Rogalska, E., Interactions of a fungistatic antibiotic, griseofulvin, with phospholipid monolayers used as models of biological membranes. *Langmuir* **2006**, *22* (18), 7701-7711.
- [108] Sessa, G.; Weissmann, G., Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *Journal of lipid research* **1968**, *9* (3), 310-318.
- [109] Valenzuela, S. M., Liposome techniques for synthesis of biomimetic lipid membranes. In *Nanobiotechnology of biomimetic membranes*, Springer: 2007; pp 75-87.
- [110] Fa, N.; Lins, L.; Courtoy, P. J.; Dufrêne, Y.; Van Der Smissen, P.; Brasseur, R.; Tyteca, D.; Mingeot-Leclercq, M.-P., Decrease of elastic moduli of DOPC bilayers induced by a macrolide antibiotic, azithromycin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **2007**, *1768* (7), 1830-1838.
- [111] Okumura, Y.; Zhang, H.; Sugiyama, T.; Iwata, Y., Electroformation of giant vesicles on a non-electroconductive substrate. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129* (6), 1490-1491.
- [112] Rodriguez, N.; Heuvingh, J.; Pincet, F.; Cribier, S., Indirect evidence of submicroscopic pores in giant unilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **2005**, *1724* (3), 281-287.
- [113] Lipowsky, R., Vesicles and biomembranes. *Encyclopedia of Applied Physics* **1998**, *23*, 199-222.
- [114] Martin, D. K., The Significance of Biomimetic Membrane Nanobiotechnology to Biomedical Applications. In *Nanobiotechnology of Biomimetic Membranes*, Springer: 2007; pp 1-21.
- [115] Sackmann, E., Supported membranes: scientific and practical applications. *Science* **1996**, *271* (5245), 43.
- [116] Dufrêne, Y. F.; Lee, G. U., Advances in the characterization of supported lipid films with the atomic force microscope. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **2000**, *1509* (1), 14-41.
- [117] Kiessling, V.; Domanska, M.; Murray, D.; Wan, C.; Tamm, L.; Begley, T., *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*. John Wiley & Sons, Inc: 2008.
- [118] Rädler, J.; Strey, H.; Sackmann, E., Phenomenology and kinetics of lipid bilayer spreading on hydrophilic surfaces. *Langmuir* **1995**, *11* (11), 4539-4548.
- [119] Brian, A. A.; McConnell, H. M., Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1984**, *81* (19), 6159-6163.
- [120] Magonov, S. N.; Whangbo, M.-H., *Surface analysis with STM and AFM: experimental and theoretical aspects of image analysis*. John Wiley & Sons: 2008.

Capítulo 2

Sección experimental

En este capítulo se van a describir y explicar brevemente las características generales de las diferentes técnicas experimentales empleadas, los métodos de caracterización, como así también los equipos y las condiciones de operación de cada uno de ellos. Se discutirán con mayor detalle las técnicas más relevantes y con las que se trabajó para esta tesis.

2.1. Técnicas electroquímicas.

Una de las técnicas experimentales empleadas para este trabajo de tesis, fue la electroquímica; la cual estudia los fenómenos eléctricos y químicos a nivel de la interfase metal-solución. Por lo general, en los sistemas electroquímicos se estudian los procesos y factores que afectan el transporte de carga a través de la interfase, por ejemplo, entre un conductor electrónico (un *electrodo*) y un conductor iónico (un *electrolito*). La carga es transportada

a través del electrodo por el movimiento de los electrones, mientras que en el electrolito, la carga es transportada por el movimiento de los iones.¹⁻³

En la interfase metal–solución ocurren dos tipos de procesos, cuando se aplica un potencial eléctrico y las cargas circulan a través de la misma (**Figura 2.1**). Estos procesos pueden dividirse en: faradaicos y no faradaicos. Los primeros involucran una transferencia de carga neta entre el metal y la solución (o moléculas presentes en la misma), la cual asocia un proceso redox (oxidación–reducción), en el que la cantidad de reacción química (especies reducidas/oxidadas) causada por el flujo de corriente es proporcional a la cantidad de electricidad circulada por la interfase.

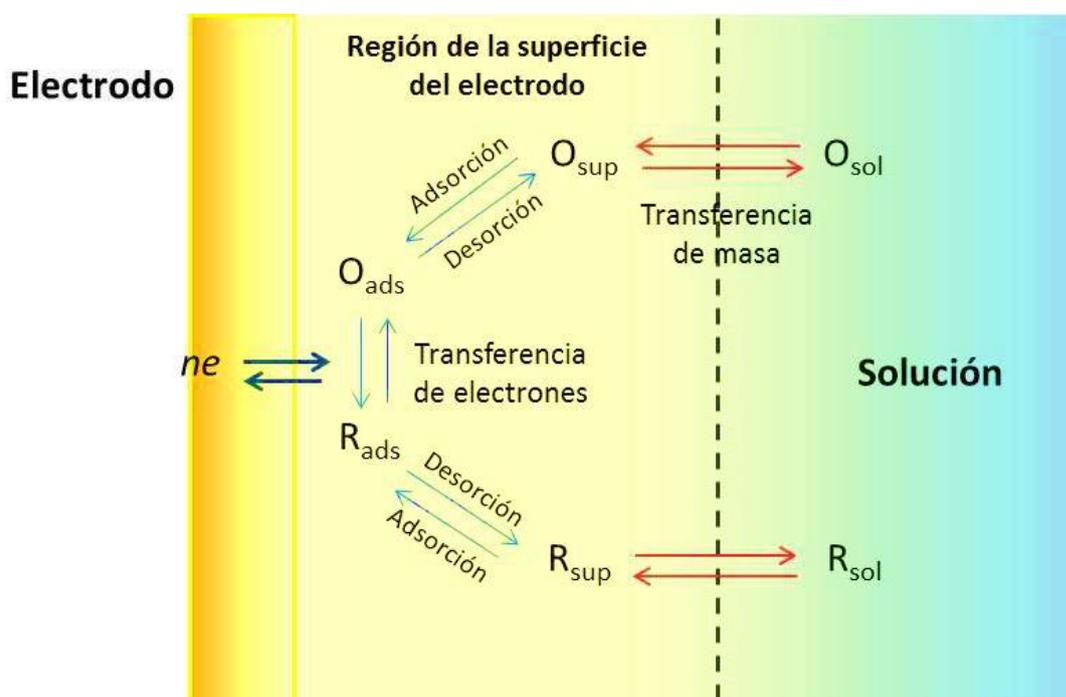


Figura 2.1. Esquema general de los fenómenos que ocurren en la superficie de un electrodo. Imagen extraída de la Tesis doctoral de M. A. Daza Millone.⁴

Los otros tipos de procesos que pueden ocurrir son la adsorción o desorción de sustancias, donde la estructura de la interfase electrodo–solución puede cambiar con la variación del potencial o con la composición de la solución. Estos procesos no faradaicos, donde no hay un proceso neto de

transferencia de carga dan origen a la denominada “corriente de doble capa” la cual se manifiesta en los experimentos electroquímicos. Así de esta manera, las interfases electrodo–solución exhiben una capacidad cuya magnitud refleja la distribución de iones en el lado de la solución de la interfase. La doble capa de electrolito está compuesta por la capa de Helmholtz, una capa de iones y solvente en contacto físico con el electrodo, y la capa difusa que es una capa de iones cercana al electrodo, cuya concentración se desvía de la concentración en el seno de la solución (**Figura 2.2**).

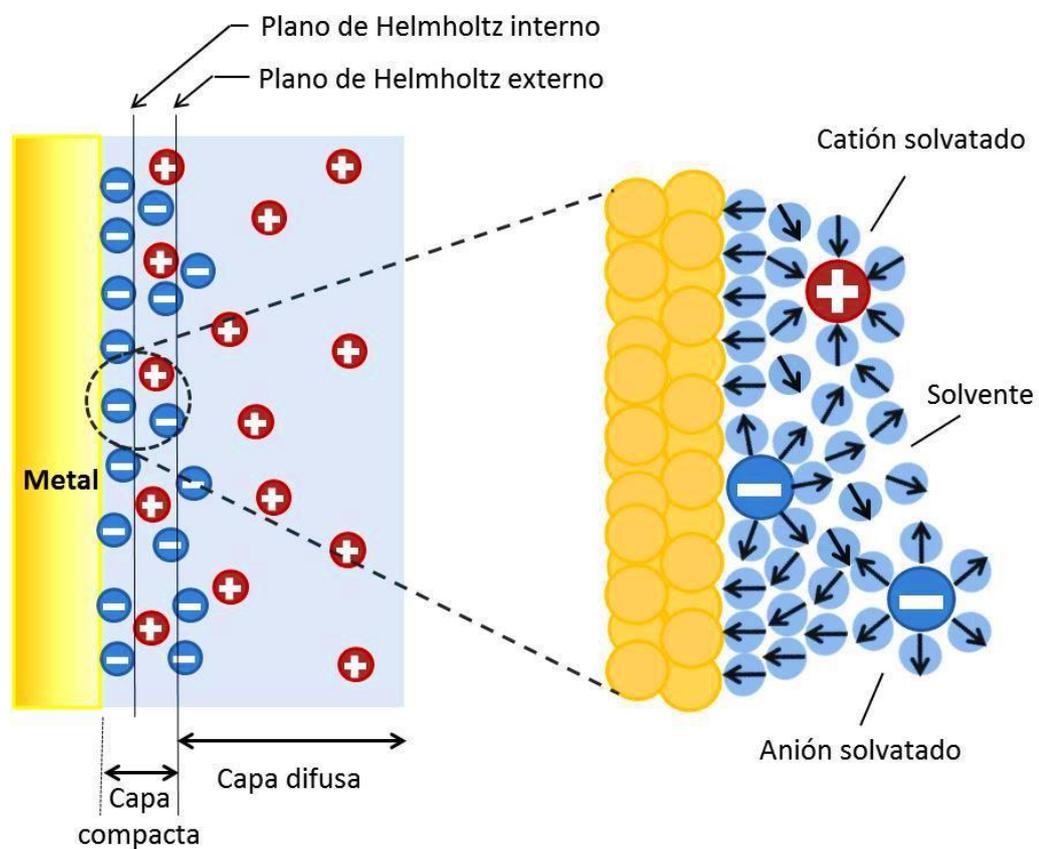


Figura 2.2. Modelo de la doble capa eléctrica en condición de adsorción específica de aniones. Imagen extraída de la Tesis doctoral de M. A. Daza Millone.⁴

Desde el punto de vista experimental el estudio de las interfases se realiza en la configuración provista por una celda electroquímica, en la cual se encuentran al menos dos electrodos, separados por una solución electrolítica por donde circula corriente. La diferencia de potencial entre los electrodos

puede ser modificada por medio de una fuente de potencial externo que genera la circulación de una corriente a través de las interfaces electrodo/solución en donde pueden ocurrir diversas reacciones químicas. La reacción química neta que ocurre en la celda, está comprendida al menos por dos hemirreacciones independientes que describen los cambios químicos que ocurren en cada electrodo.

Al llevar al electrodo a potenciales más negativos, es posible alcanzar un determinado valor de potencial, en donde se transfieren electrones desde el metal hacia los estados electrónicos vacantes de las especies que se encuentran en solución. En ese caso, aparece un flujo de electrones desde el electrodo a la solución (*corriente de reducción*). De forma similar, la energía de los electrones en el metal (o semiconductor) puede disminuirse aplicando un potencial mayor; por lo que a un cierto potencial aplicado, los electrones de las sustancias electroactivas en el electrolito pueden ser transferidos hacia el electrodo (proceso de *oxidación*). Los potenciales críticos en los cuales estos procesos ocurren están relacionados a los *potenciales estándar*, E^0 , para las moléculas presentes en la solución.^{2,3}

Para estudiar los cambios en el electrodo de trabajo de una manera reproducible, se emplea un arreglo experimental de una celda de tres electrodos (**Figura 2.3**). En esta configuración, la corriente circula entre el electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar o *contraelectrodo (CE)*, que se fabrica con un material inerte, como por ejemplo Pt. Bajo esta configuración, un potencióstato controla la tensión entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo de manera de ajustar la diferencia de potencial entre los electrodos de trabajo y el de referencia, hasta alcanzar el valor predeterminado de potencial. Esto se logra a través de un circuito retroalimentado de alta impedancia. De esta forma, el potencióstato es un elemento activo que condiciona al electrodo de trabajo a alcanzar el potencial deseado respecto al de referencia y la corriente es el observable experimental.

especies presentes en la interfase, el estudio de reacciones de transferencia de carga y la evaluación de la cinética de transferencia de carga, entre otras.

En la voltamperometría cíclica (CV: *cyclic voltammetry*, en inglés) se utiliza una celda de tres electrodos: el electrodo de trabajo, el electrodo de referencia y el electrodo auxiliar (o contraelectrodo), tal como se describió en la **Figura 2.3**. Los potenciostatos utilizados para realizar experimentos de voltamperometría cíclica permiten aplicar una rampa de potencial (generalmente una onda triangular) entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia. Es decir, controla el potencial del electrodo de trabajo referido al de referencia, utilizando una impedancia muy grande de manera tal que no circule corriente por el electrodo de referencia. La función que se aplica tiene la siguiente forma (**Ecuación 2.1**):

$$E = E_i + vt \quad (2.1)$$

Donde E es el potencial en el instante de tiempo t , E_i es el potencial inicial y v es la velocidad de barrido del potencial.

El barrido lineal se genera entre diferentes límites, un potencial inicial E_i y un potencial final E_f . Los valores típicos de v van de 1×10^{-3} a 1 V s^{-1} . A medida que se modifica el potencial, se registra la corriente que circula entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo. Se registra mediante el potenciostato, la densidad de corriente j ($j = i/A$) que ocurre por la aplicación de potencial E , generando un gráfico denominado voltamperograma. En él se observa diferentes procesos como los de transferencia de carga con especies electroactivas y los de carga y descarga de la denominada doble capa eléctrica.²

Las curvas (i vs E) brindan información acerca de la naturaleza de las especies químicas que pueden cambiar su estado de oxidación en la solución, de los electrodos, y de las reacciones que ocurren en las interfases.

Para las medidas que se llevaron a cabo en este trabajo de Tesis, se utilizaron barridos lineales como las que se muestran en la **Figura 2.4a**. Durante el barrido de potencial, el potenciostato mide la corriente resultante debida al potencial aplicado. Este instrumento modifica la diferencia de potencial entre el ET y el CE y, debido a ello, circula corriente entre estos electrodos. Simultáneamente, la diferencia de potencial entre el ET y el ER varía de acuerdo con el programa lineal que se haya establecido.

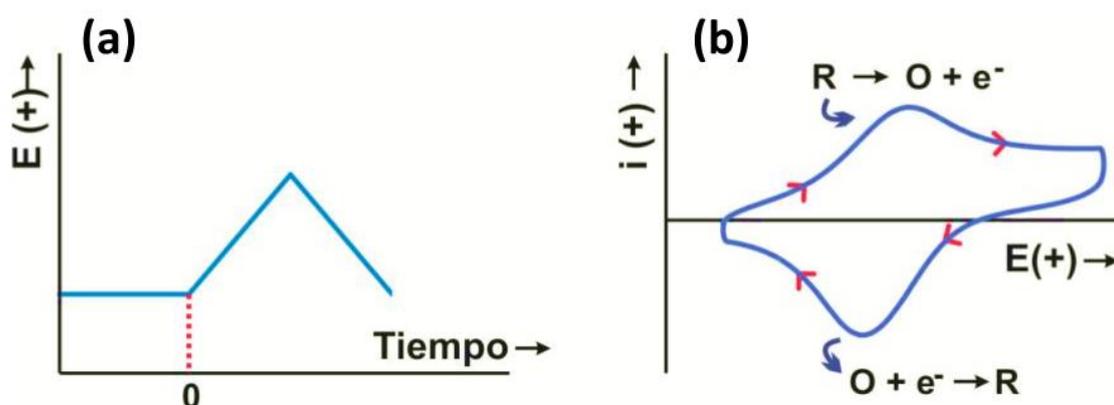


Figura 2.4. (a) Barrido cíclico de potencial. (b) Voltamperograma cíclico resultante.

Un voltamperograma cíclico se obtiene, si se grafica la corriente registrada en función del potencial aplicado (**Figura 2.4b**), que depende no sólo de un gran número de parámetros fisicoquímicos, sino además, del tiempo. La **Figura 2.4b** ilustra la respuesta esperada para una cupla redox durante un ciclo completo de barrido de potencial. En la misma, se supone que sólo la forma oxidada O, está presente inicialmente. De esta manera, se elige un potencial que se desplaza hacia valores negativos para el primer medio ciclo, empezando desde un valor en el que no se produce la reacción (no hay procesos de transferencia de carga involucrados). A medida que el potencial aplicado se aproxima al E^0 (característico del proceso redox), la corriente catódica comienza a aumentar, hasta que alcanza un máximo. Después de atravesar la región de potencial en donde tiene lugar el proceso de reducción, la dirección del barrido de potencial, se revierte. Durante el

barrido inverso, las moléculas R (generadas en el primer medio ciclo, y acumuladas cerca de la superficie) son reoxidadas a O y se desarrolla un pico anódico. Como resultado se obtiene información acerca del potencial redox, las velocidades de reacción electroquímica de los compuestos y la concentración de especies electroactivas. Además, es posible distinguir entre los procesos relacionados con especies adsorbidas sobre el ET y los debidos a especies en solución, siendo posible analizar la reversibilidad o irreversibilidad de los procesos de transferencia de carga, el número de electrones transferidos, los coeficientes de difusión y las constantes de velocidad, entre otros parámetros.

La densidad de carga eléctrica, q , registrada durante la oxidación o reducción, es uno de los parámetros cuantitativos que puede extraerse de las curvas i vs. E . A partir de la carga pueden obtenerse datos como la fracción de la superficie bloqueada en procesos de adsorción–desorción o el número de electrones intercambiados por sitio de adsorción. El cálculo de la carga implica la integración de la siguiente expresión (**Ecuación 2.2**):

$$q = \int_{t_1}^{t_2} j(t) dt \quad (2.2)$$

Donde t es el tiempo y j la densidad de corriente (expresada por unidad de área).

Teniendo en cuenta la velocidad de barrido $v(\Delta E/\Delta t)$, se puede reescribir la **Ecuación 2.2** como (**Ecuación 2.3**):

$$q = \frac{1}{v} \int_{E_1}^{E_2} j(E) dE \quad (2.3)$$

De este modo, a partir de la integración de las curvas j vs. E (voltamperogramas) entre dos potenciales seleccionados, a una dada v , se obtiene la densidad de carga expresada en coulombs por unidad de área.

2.1.2. Arreglo experimental utilizado en las medidas electroquímicas.

Todas las medidas realizadas durante el desarrollo de este trabajo de Tesis, se llevaron a cabo mediante el uso de un potenciostato con capacidad de registro digital de datos, en este caso se empleó un Autolab 128n, al cual se conectó a una celda electroquímica de tres electrodos como la que se muestra en la **Figura 2.3**. En todos los casos, el contraelectrodo (CE) empleado fue una lámina de Pt de gran área soldada a un alambre de Pt, mientras que los electrodos de referencia (ER) fueron el de calomel saturado (SCE) ($Hg|Hg_2Cl_2|KCl_{(sat)}$) o un alambre de Ag en los experimentos de deposición a subpotenciales de Ag sobre Au. En algunos casos el electrodo de trabajo (ET) consistió en un metal con una SAM adsorbida y en otros, láminas de Ag metálica tal como se describirá en los capítulos siguientes. Este tipo de celdas, poseen un burbujeador que permite mantener una atmósfera saturada en N_2 , ya que el O_2 es una especie electroactiva que puede interferir en las medidas. Además, se emplearon capilares de Luggin–Haber para disminuir la caída óhmica entre el ER y el ET.

Al realizar experimentos electroquímicos es de especial importancia la limpieza del material utilizado, ya que cualquier impureza puede causar interferencias en las medidas debido a la alta sensibilidad de estas técnicas. Para asegurar la ausencia de contaminantes se lavó el material de vidrio con solución de permanganato de potasio alcalino en ebullición y luego con solución ácida de peróxido de hidrógeno o con solución "piraña" (Mezcla de H_2SO_4 concentrado y H_2O_2 100 vol, en una relación volumétrica 3:1). Luego, los materiales fueron enjuagados varias veces con agua tridestilada.

2.2. Espectroscopia de fotoelectrones generados por rayos X (XPS).

La espectroscopia de fotoelectrones generados por rayos X (XPS: *X-ray photoelectron spectroscopy*, en inglés), llamada en sus inicios espectroscopia electrónica para análisis químico (*electron spectroscopy for chemical analysis*, ESCA), se basa en el efecto fotoeléctrico, descubierto en 1887 por H. R. Hertz y cuyas bases teóricas fueron explicadas por A. Einstein en 1905, quien se basó en los trabajos de Max Planck para su formulación. Sin embargo, recién en la década de 1960 se desarrolló su uso analítico, gracias a los trabajos pioneros del grupo de K. M. Siegbahn, quien obtuvo por ello el Premio Nobel de Física en 1981 por sus contribuciones al desarrollo de la espectroscopia electrónica.

La capacidad de detectar diferencias en los estados químicos junto con la sensibilidad superficial ha hecho que esta técnica espectroscópica sea la más aplicada para el análisis general de superficies. Puede detectar todos los elementos, excepto el hidrógeno y el helio. La profundidad de análisis de los materiales sólidos varía desde las 2 últimas capas atómicas hasta aproximadamente 10 capas, es decir, aproximadamente los primeros 10–20 nm; con un tamaño de área examinada mínima de unos 30 μm x 30 μm . Es aplicable a materiales orgánicos, biológicos y poliméricos así como también metales, semiconductores y cerámicos. Es una técnica no destructiva aunque hay casos en los que el haz de rayos X puede dañar la muestra, sobre todo si ésta es de naturaleza orgánica.

El proceso básico de esta espectroscopia es la absorción de un cuanto de energía ($h\nu$) con la consecuente eyección de un electrón, conocido como fotoelectrón, cuya energía cinética (referida a un cero de energía apropiado) está relacionada con la energía de ligadura del electrón al átomo blanco (efecto fotoeléctrico). En este proceso el fotón incidente transfiere su energía por completo al electrón unido y se logra la identificación del elemento a través de la medida de la energía de los electrones que se desprenden de la muestra sin pérdida de energía. Esto da como resultado espectros de energía que permiten la identificación del átomo en sus distintos estados de oxidación con la posibilidad de realizar medidas cuantitativas.

En la región de energía de los rayos X (de 0.1 KeV a 0.1 MeV) los fotones son capaces de interactuar con los electrones de la estructura interna de los átomos y detectar así con mucha sensibilidad distintos estados químicos de los elementos, a excepción del hidrógeno y el helio, tal como fue mencionado. No ocurre lo mismo con, por ejemplo, los fotones con energías en el rango del espectro UV-visible los cuales interactúan con los electrones más externos que están involucrados en las uniones químicas y no en la estructura electrónica interna de cada átomo en particular. Por este motivo estos últimos, carecen de utilidad para la identificación elemental.⁵⁻⁷

Cuando un fotón de suficiente energía colisiona contra un electrón de un nivel electrónico interno de una especie atómica X, produce un electrón que es eyectado en un proceso conocido como fotoemisión (**Ecuación 2.4**):



De acuerdo al principio de conservación de la energía (**Ecuación 2.5**):

$$E(A) + h\nu = E(A^+) + E(e^-) \quad (2.5)$$

Como la energía del electrón eyectado está presente únicamente como energía cinética E_k , la **Ecuación 2.5**, se puede reescribir de acuerdo a (**Ecuación 2.6**):

$$E_k(e^-) = h\nu - [E(A^+) - E(A)] \quad (2.6)$$

El término entre corchetes representa la diferencia de energía entre el átomo ionizado y el neutro y se denomina energía de unión o ligadura del electrón, E_B , y la relación que las vincula es la ecuación de Einstein para el efecto fotoeléctrico (**Ecuación 2.7**):

$$E_k = h\nu - E_B \quad (2.7)$$

De acuerdo a la **ecuación 2.7**, conociendo la energía de la radiación emitida por la fuente de rayos X, $h\nu$, es posible determinar la medida de E_B a

partir de E_k . Para ello, es necesario contar con una fuente de radiación monocromática, un espectrómetro de electrones y una cámara de ultra alto vacío (UHV: *ultra high vacuum*, en inglés) con presiones alrededor del orden de 10^{-10} Torr. Las cámaras que se emplean son de acero inoxidable dentro de las cuales se colocan los diferentes componentes, así como también las muestras en un portamuestras de un material inerte (**Figura 2.5**).

La energía de los fotoelectrones se determina por la deflexión de un campo electrostático o magnético. El sistema de detección se basa en el empleo de multiplicadores electrónicos, denominados *channeltron*. Este tipo de amplificador consiste en un tubo de alta resistividad con una abertura cónica, donde los electrones incidentes crean una lluvia de electrones secundarios que al golpear contra las paredes del tubo vuelven a crear más electrones secundarios, alcanzando una ganancia de 10^8 .

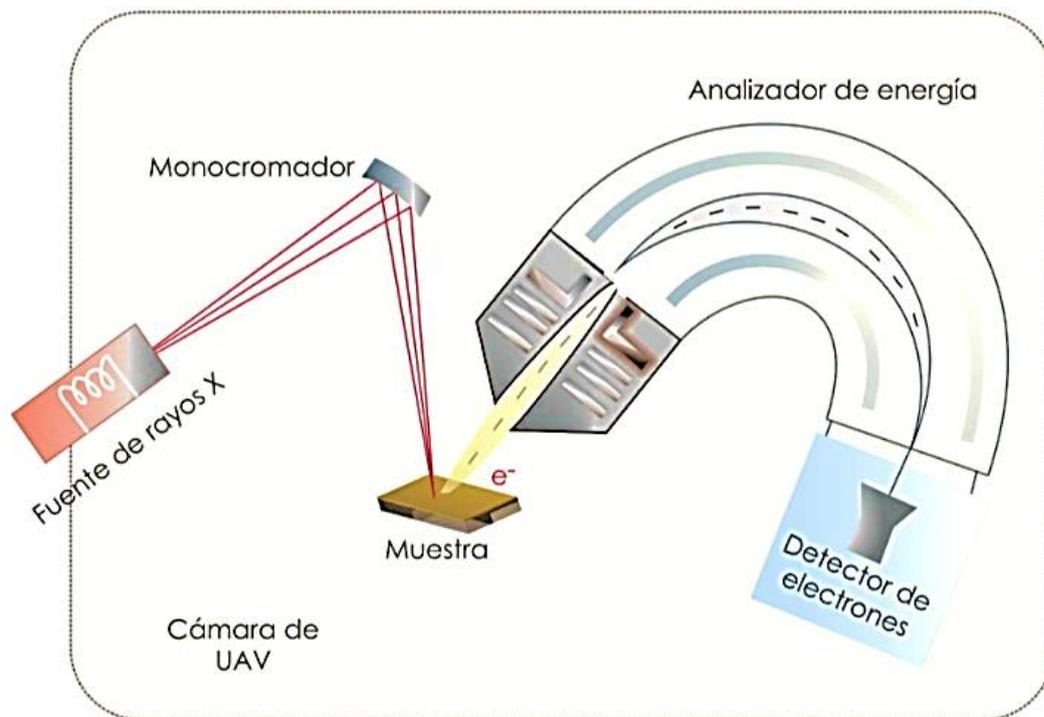


Figura 2.5. Esquema básico de funcionamiento de un espectrómetro para XPS.

La muestra sólida objeto de análisis debe estar en contacto eléctrico con el espectrómetro y ser conductora; evitando así que se cargue por la emisión de electrones respecto del espectrómetro y genere en la superficie un campo eléctrico retardador. El análisis de los materiales sólidos, dependerá de su naturaleza y del espesor de la muestra.

Las medidas de XPS se inician adquiriendo un espectro de baja resolución en una amplia región de energías (*survey o wide scan*), en el cual se observan una serie de picos de fotoelectrones que expresan las E_B discretas de los electrones presentes en la muestra sólida, es decir, de todos los fotoelectrones emitidos por los elementos presentes en la muestra cuya E_B sea menor a la energía de la fuente de rayos X. Los picos del espectro obtenidos, pueden dividirse en tres grupos: los picos de fotoemisión de niveles internos (descritos anteriormente), los correspondientes a niveles de valencia y aquellos causados por la emisión tipo Auger. Los picos de valencia aparecen a bajas energías de unión (0 – 20 eV) formando una estructura de banda. Por otro lado, después de la emisión de un electrón interno, como por ejemplo los 1s de la capa K, queda un hueco en la estructura. El hueco puede ser llenado por un electrón de la capa L o de la banda de valencia V, llevando la energía de otro electrón L o V. Este proceso denominado Auger constituye la desexcitación dominante en elementos livianos ($Z < 35$). Los picos Auger se pueden identificar fácilmente ya que no dependen de la fuente de radiación empleada.

Es necesario tener en cuenta una serie de factores en la cuantificación de elementos a través de los espectros de XPS. Uno de ellos es que, las intensidades de los picos de los diferentes niveles energéticos (para un mismo átomo) no son iguales, debido a que la probabilidad de fotoeycción desde cada orbital (denominada sección transversal de fotoionización, σ) es diferente. La probabilidad también varía para un orbital dado en diferentes átomos y depende de la energía de los rayos X utilizados. Por otra parte, a excepción de los subniveles s, los otros subniveles (p, d, f) aparecen en el espectro como dobletes como consecuencia del acoplamiento spin-orbital ($j - j$) y la diferencia de energía entre los dos estados.^{5, 8} Cuando existe interferencia por distintas contribuciones de picos de una misma señal, se

debe hacer un ajuste adecuado mediante un modelo típicamente creado por medio de curvas Gaussianas/Lorentzianas (deconvolución).

Entonces, resumiendo lo descrito hasta ahora, el número de picos en el espectro corresponde al número de niveles de energía ocupados en los átomos cuyas E_B son menores que la energía de los rayos X y la posición de los picos corresponde a las E_B de los electrones en los orbitales e identifica a los átomos en cuestión. Las intensidades de los picos dependen del número de átomos presentes y del valor de σ para el orbital considerado. Todos estos factores dependen de la consideración de que los electrones se comportan como partículas independientes, es decir, los niveles de energía de uno de ellos no es afectado por los otros electrones internos "pasivos" (no foto-eyectados).

No obstante, cabe mencionar que la energía de unión exacta, E_B , para un electrón en un elemento depende del entorno químico en el que se encuentra dicho elemento, lo que se denomina "corrimiento químico" (por analogía a la técnica de resonancia magnética nuclear, RMN). En los niveles internos, la energía del electrón que será eyectado está determinada por las interacciones coulómbicas con otros electrones y por el potencial de atracción del núcleo. Cualquier cambio en el entorno químico involucra una redistribución espacial en los electrones de valencia produciendo una variación en la carga del átomo y la creación de un potencial diferente, que será percibido por los electrones internos, lo cual resulta en un cambio en sus E_B . Este hecho quizás es el más relevante en las aplicaciones del XPS como técnica analítica, ya que de este modo, se pueden detectar distintos estados de oxidación, átomos vecinos en una molécula, diferentes sitios de adsorción, etc.^{5,8}

Por último, para la cuantificación de los espectros de XPS, se debe tener en cuenta dos factores: la intensidad y la posición de los picos. El ancho de pico a mitad del máximo (*FWHM, full width at half maximum*, en inglés) es un indicativo del número de enlaces involucrados, de la carga diferencial en la superficie y de los posibles daños por rayos X. Los criterios a tener en cuenta

antes de empezar a cuantificar un espectro son: definir un rango de energías, en el cual la señal pueda ser atribuida a la transición de interés y la correcta remoción de la señal de fondo que no corresponde al pico elegido. Este último criterio, hace referencia a que un pico puede tener contribuciones de la señal correspondiente a diferentes estados de oxidación del elemento. Ante este hecho, es posible realizar una deconvolución de la señal en diferentes componentes.

2.2.1. Condiciones experimentales para la adquisición de los espectros XPS.

Las medidas de XPS correspondientes a este trabajo de Tesis, se llevaron a cabo en el INIFTA y estuvieron a cargo del Dr. Guillermo A. Benítez y el Dr. Aldo A. Rubert (**Figura 2.6**). Se utiliza una cámara de ultra alto vacío (UHV) con presiones del orden de los 10^{-10} torr para disminuir la cantidad de contaminantes superficiales y asegurar a los electrones eyectados, un camino libre medio lo suficientemente grande como para que lleguen al analizador sin chocar con otras moléculas. Dichos valores de presión se alcanzan con una serie de bombas de pre-vacío (rotatorias de aceite) y de vacío (difusoras y turbomoleculares). Además, se calienta la cámara para evacuar los gases adsorbidos en un proceso conocido como horneado. Las muestras se colocan en un portamuestras de material inerte y se introduce en la cámara a través de un manipulador. Estas cámaras son de acero inoxidable con juntas metálicas correctamente selladas.

La fuente de rayos X proviene del bombardeo con electrones a blancos de Mg o Al (XR50, SpecsGmbH), que actúa como ánodo. La energía de los rayos X (blandos) emitidos es del orden de 1 keV (para Mg K α es 1253,6 eV con un ancho de banda de 0,7 eV y para Al K α es 1486,6 eV con un ancho de banda de 0,85 eV). La medida de la energía de los electrones eyectados se realizó mediante el análisis de su deflexión en un campo electrostático. El analizador hemiesférico (PHOIBOS 100, SpecsGmbH) aplica un potencial a través de dos sectores concéntricos y los electrones pasan sin cambio de energía a lo largo de las líneas equipotenciales. Como sistema de detección

se empleó un multiplicador de electrones *channeltron*. La calibración de la escala de la energía se realizó a dos puntos utilizando oro evaporado ($E_B = Au4f_{7/2} = 84,00 eV$) y cobre ($E_B = Cu2p_{3/2} = 933,67 eV$) como patrones de referencia.

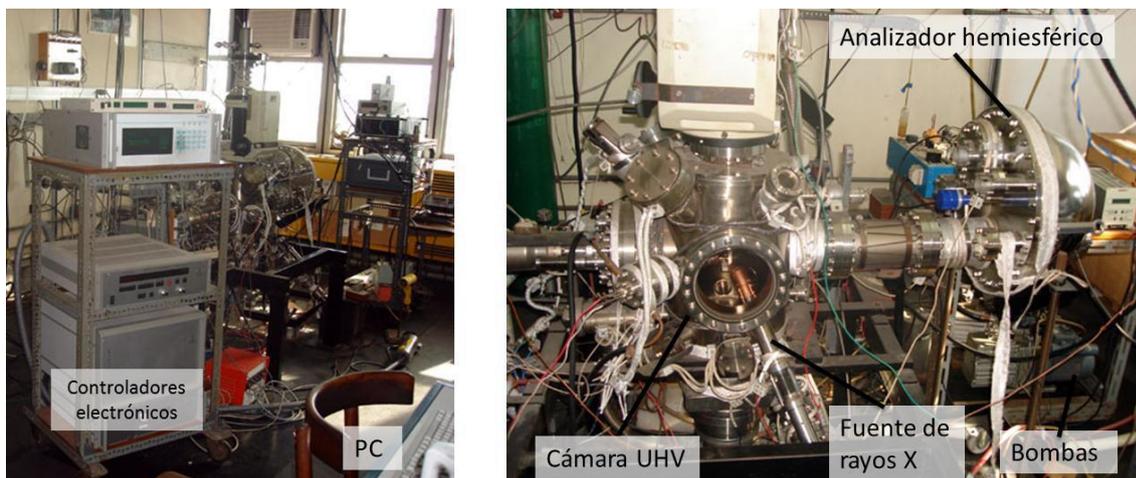


Figura 2.6. Componentes del equipo para las medidas de XPS, utilizado en el INIFTA.⁴

2.3. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) es una técnica que ha sido fundamental para el desarrollo de la nanociencia y nanotecnología. Su invención se debe al trabajo de M. Knoll y E. Ruska que, en 1931, dio lugar a la construcción del primer microscopio electrónico. Dada la pequeña longitud de onda de los electrones bajo el efecto de altos voltajes de aceleración, la creación de un microscopio electrónico tenía en sus principales objetivos mejorar la resolución de un microscopio óptico, limitada en última instancia por la longitud de onda de la luz visible o ultravioleta. En el año 1933 se obtuvo, por primera vez, un microscopio electrónico con una resolución superior a la de un microscopio óptico.⁹ A partir de ese momento, el límite de resolución del microscopio electrónico fue aumentando a lo largo de los años. Sin embargo el límite máximo alcanzable no está determinado por la corta longitud de onda de los electrones. Los errores de las lentes magnéticas utilizadas en el microscopio limitan la resolución del mismo por encima de 0.1 nm. Para una

descripción más detallada del funcionamiento de este equipo, se puede consultar el texto de Carter y Williams.¹⁰

En la **Figura 2.7b** se muestra un esquema de un microscopio electrónico convencional. El TEM está compuesto por un sistema de iluminación, una plataforma para la muestra, una lente objetivo, un sistema de magnificación y un sistema de recolección de datos. Las lentes son magnéticas y al variar la corriente que circula por ellas se cambia el campo magnético generado por la lente y, por lo tanto, se modifica la deflexión de la trayectoria de los electrones que pasen por ella. La fuente de electrones es la parte principal del sistema de iluminación. Típicamente se utiliza un cañón de emisión termoiónica de LaB_6 o un cañón de emisión de campo (*field emission gun*, FEG). Regularmente todos los microscopios actuales se fabrican con cañones FEG, por mayor brillo y coherencia que los de emisión termoiónica.¹⁰

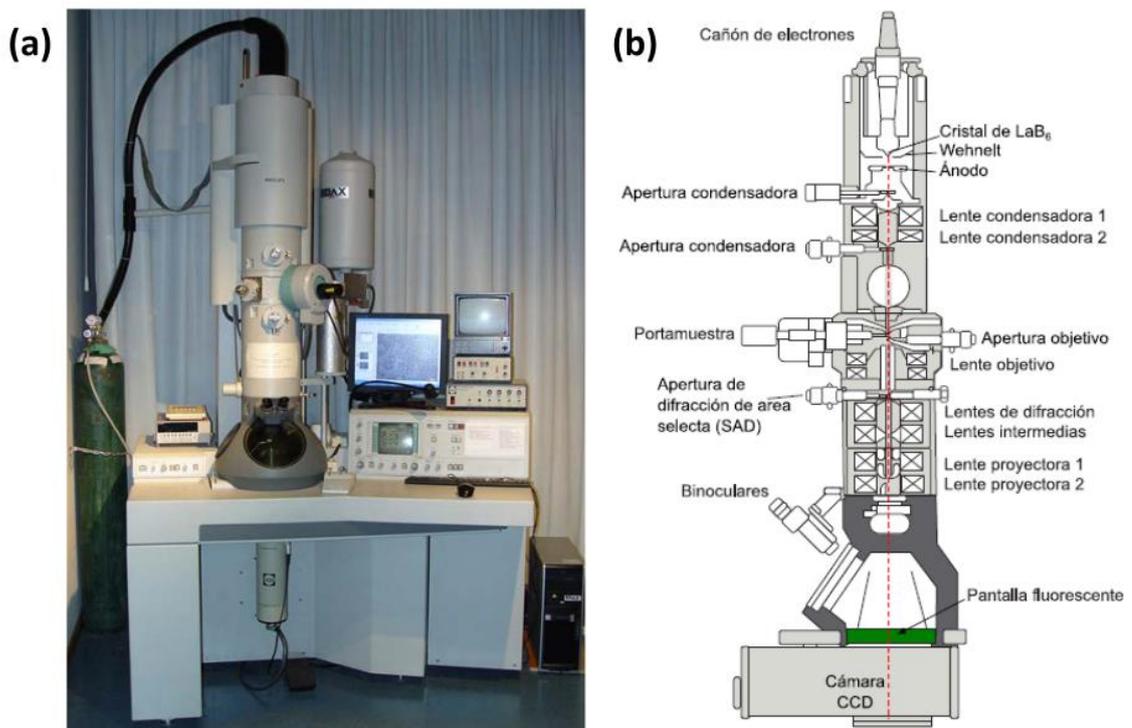


Figura 2.7. (a) Equipo TEM del Centro Atómico de Bariloche. (b) Esquema básico de un TEM.

El sistema de iluminación también incluye las lentes condensadoras que controlan el haz que sale de la fuente de electrones y llega a la muestra. Puede producir un haz paralelo (para utilizar el modo TEM) o bien un haz convergente. La lente objetivo es una de las partes más importantes del TEM ya que determina el límite de la resolución de la imagen. Consiste en piezas polares que se ubican en el nivel de la muestra. El sistema de magnificación consiste de lentes intermedias y lentes de proyección y dan una magnificación de hasta 1,5 millones. El sistema de recolección de datos puede ser una pantalla fluorescente o bien un dispositivo CCD.

La señal en TEM es formada por los electrones no deflectados y los deflectados que penetran el grosor de la muestra. Las imágenes están sujetas a tres tipos de contrastes. Primero, el contraste de difracción, que es producido debido a la disposición general de los átomos en el cristal, por lo que la intensidad difractada del haz incidente de electrones es perturbado, produciendo el contraste observado en imágenes de campo claro (*bright field*, BF) si se selecciona la porción del haz transmitido, o las imágenes de campo oscuro (*dark field*, DF) si se selecciona el haz deflectado. En segundo lugar, el grosor de la muestra, que debido a la masa o el número atómico produce contraste. Sin embargo, se considera que este tipo de absorción es insignificante. Este tipo de contraste es útil en muestras biológicas o al utilizar otro tipo de detectores. Por último, el contraste de fase, que es producido por la modulación de fase de la onda de electrones incidentes cuando son transmitidas a través del potencial del cristal. Este tipo de contraste es sensible a la distribución atómica en la muestra y es la base de la microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (*high-resolution TEM*, HRTEM).^{10, 11}

Las imágenes TEM que se muestran en este trabajo de Tesis, fueron adquiridas con un microscopio Phillips CM 200 UT y un FEI TECNAI F20 "field emission" operado a 200 keV, ubicados en el Laboratorio de Materiales del Centro Atómico Bariloche – Instituto Balseiro y estuvieron a cargo de la Dra. Eugenia Zelaya. Las medidas se realizaron a temperatura ambiente. Las rejillas con película de C ultradelgada empleadas fueron suministradas por la firma Ted Pella y usadas sin tratamiento previo. Para todas las imágenes adquiridas

en esta Tesis, las muestras se prepararon mediante la evaporación de 2 o 3 gotas de las dispersiones de AgNPs sobre las rejillas.

2.4. Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-vis).

La espectroscopia UV-vis es una de las técnicas más comúnmente empleadas para el análisis químico de una muestra. Las medidas hechas en el rango de longitud de onda entre el visible y el ultravioleta (**Figura 2.8**), tienen una importante aplicación en la caracterización de materiales debido a que ofrecen información cualitativa y cuantitativa de una gran variedad de especies inorgánicas y orgánicas. Para que dentro del rango del espectro de luz visible, longitudes de onda (λ) entre 380 y 780 nm aproximadamente, una sustancia sea activa debe ser coloreada, en otras palabras, absorber luz a ciertas λ y transmitirla a las restantes λ .

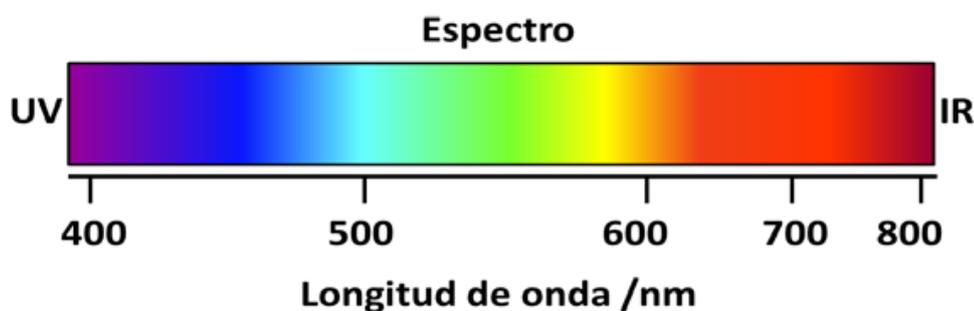


Figura 2.8. Esquema del espectro de luz visible.

Esta técnica involucra la absorción de radiación ultravioleta-visible por una molécula, causando la promoción de un electrón de un estado basal a un estado excitado. Cuando una radiación de cierta λ incide sobre una muestra se produce la absorción parcial de la misma, produciendo una transición en los niveles energéticos de la especie Y (ya sea un átomo, una molécula o un ion) y pasando a un estado excitado (Y^*). El resto de la radiación es transmitida. Es posible analizar un estado u otro de la sustancia y relacionarlo con la cantidad de especie activa presente en la muestra. Debido a que se

superponen transiciones vibracionales y electrónicas, las bandas que aparecen en un espectro UV-visible son anchas. Además, la excitación corresponde a los electrones de enlace; en consecuencia, los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlaces.¹²

Por otro lado, esta técnica se puede aplicar tanto para análisis cualitativo como cuantitativo. Los análisis cualitativos son útiles para identificar la presencia de ciertos grupos funcionales que actúan como cromóforos, mientras que los análisis cuantitativos emplean la ley de *Lambert-Beer* para determinar la concentración de la sustancia que absorbe a través de la cantidad de radiación transmitida o absorbida, de acuerdo a la **ecuación 2.8**:

$$A = -\log T = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (2.8)$$

Donde A es la absorbancia medida, ε es el coeficiente de extinción molar; b , el camino óptico y c , es la concentración de la muestra (M).¹²

Los espectros ultravioleta-visibles (UV-Vis) que se muestran en este trabajo de Tesis, fueron medidos con un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 35 de doble haz. Los espectros fueron adquiridos en el rango de longitudes de onda 200–700 nm utilizando celdas de cuarzo provistas por Perkin Elmer. Como referencia se utilizó agua Milli-Q o buffer fosfatos 10mM a pH 7.4.

2.5. Microscopía de fuerzas atómicas (AFM).

Las microscopías de barridos por sondas (SPMs: *Scanning Probe Microscopies*, en inglés), consisten en una familia de microscopías donde una sonda de radio de curvatura muy pequeño (punta) barre la superficie de una muestra, monitoreando las interacciones que ocurren entre la punta y la muestra. Estas microscopías son una herramienta de imagen con un amplio rango dinámico, que abarca desde los campos de observación de los microscopios óptico y electrónico. Tales herramientas dan la posibilidad de realizar análisis detallado de propiedades morfológicas, mecánicas, químicas,

entre otras, de la superficie estudiada, con resoluciones que en algunos casos son mayores que las logradas en microscopía electrónica.

Las nuevas tecnologías basadas en nanociencias, se han apoyado en estos instrumentos para obtener imágenes aumentadas de unos pocos grupos de átomos, cuyo orden obedece a la naturaleza misma o a la manipulación deliberada, a la cual se ha accedido gracias al desarrollo de la nanotecnología.

Las dos principales formas de SPMs son la microscopía de barrido de efecto túnel (STM: *Scanning Tunneling Microscopy*) y la microscopía de fuerzas atómicas (AFM: *Atomic Force Microscopy*).

La microscopía de fuerza atómica (AFM), creada por Binnig y col., en 1986; se basa en las interacciones entre puntas sensoras y superficies. La AFM no utiliza lentes de vidrios o magnéticas, para producir una imagen de la muestra sino que se escanea la superficie por medio de una punta afilada (sonda). La resolución del AFM tiene una gran dependencia con la geometría o forma de la punta. La interacción local entre la punta y la superficie de una muestra, proporciona imágenes tridimensionales de superficies con alta resolución espacial en tiempo real. El tipo de fuerza de interacciones que hay entre la muestra y la punta son pequeñas de corto alcance, y pueden ser de dos tipos, de adhesión y repulsión, con un orden de distancia de alcance aproximadamente de 1×10^{-9} y 1×10^{-10} m, respectivamente. Las ventajas que presenta en comparación con otras microscopias, es que trabaja con muestras no conductoras (cerámicos, muestras biológicas, entre otras) y no requiere de un pre-tratamiento de la muestra; y en distintas condiciones, como líquidos con o sin potencial controlado, en aire o atmósfera controlada, permitiendo medir la muestra in situ. Además, es posible variar la temperatura de operación, aunque lo más habitual es operar a temperatura ambiente. Asimismo, el AFM es una de las pocas herramientas capaz de brindar información espacial acerca de una superficie en las coordenadas X, Y y Z con suma precisión en la escala nanométrica. Por ejemplo, la adsorción de materiales sobre la superficie, la erosión de una superficie o cambios en la

rugosidad por la acción de un agente pueden ser cuantificados mediante esta técnica.

Esta microscopía constituye un gran avance en especial para la observación de muestras de origen biológico, ya que se pueden estudiar estructuras en un entorno semejante al que se encuentran naturalmente (medio acuoso), en lugar de sufrir un proceso de metalización como se procede en las microscopías electrónicas.

Además de su gran poder para la obtención de información topográfica, el AFM es una herramienta muy versátil que hoy en día goza de una enorme ramificación en distintas técnicas derivadas. Entre ellas cabe destacar la nanolitografía, la espectroscopia de fuerzas, la microscopía de fuerzas de fricción (FFM) y la microscopía de fuerzas eléctricas (EFM) magnéticas (MFM).

2.5.1. Operación del AFM.

El AFM (en modo contacto) utiliza las fuerzas repulsivas entre la punta situada en el extremo de un cantiléver y la muestra. Por razones de diseño y de construcción, en el AFM que se utilizó en esta tesis la muestra es montada en el piezotubo que se desplaza en relación a la punta, que permanece fija. Las fuerzas repulsivas experimentadas por el sistema punta-muestra, son medidas mientras la muestra se acerca a la punta mediante el registro de la deflexión del cantiléver. La deflexión puede ser medida por diversos métodos (deflexión óptica, interferometría, piezoresistividad), pero la deflexión óptica es la más utilizada. De este modo, la variación espacial de las fuerzas repulsivas punta-muestra (deflexión del cantiléver) o la altura de la punta es convertida en una imagen.¹³

El cantiléver se dobla hacia la superficie cuando la fuerza es atractiva, y en sentido contrario cuando la interacción es repulsiva (**Figura 2.9**). Cuando la muestra se aproxima hacia la punta en un régimen en el cual éstas no se tocan, la atracción debido a las fuerzas de van der Waals (vdW) dobla el

cantiléver hacia ésta (**B** en **Figura 2.9**). En un cierto punto (salto al contacto) la punta “salta” sobre la superficie de la muestra, estableciendo contacto con la muestra (**S** en **Figura 2.9**). Cuando la muestra aún continúa moviéndose hacia la punta, el cantiléver se deflexa como consecuencia de que está tocando la muestra. Bajo estas circunstancias, la punta y la muestra pueden sufrir deformaciones reversibles (elásticas) o irreversibles (plásticas).

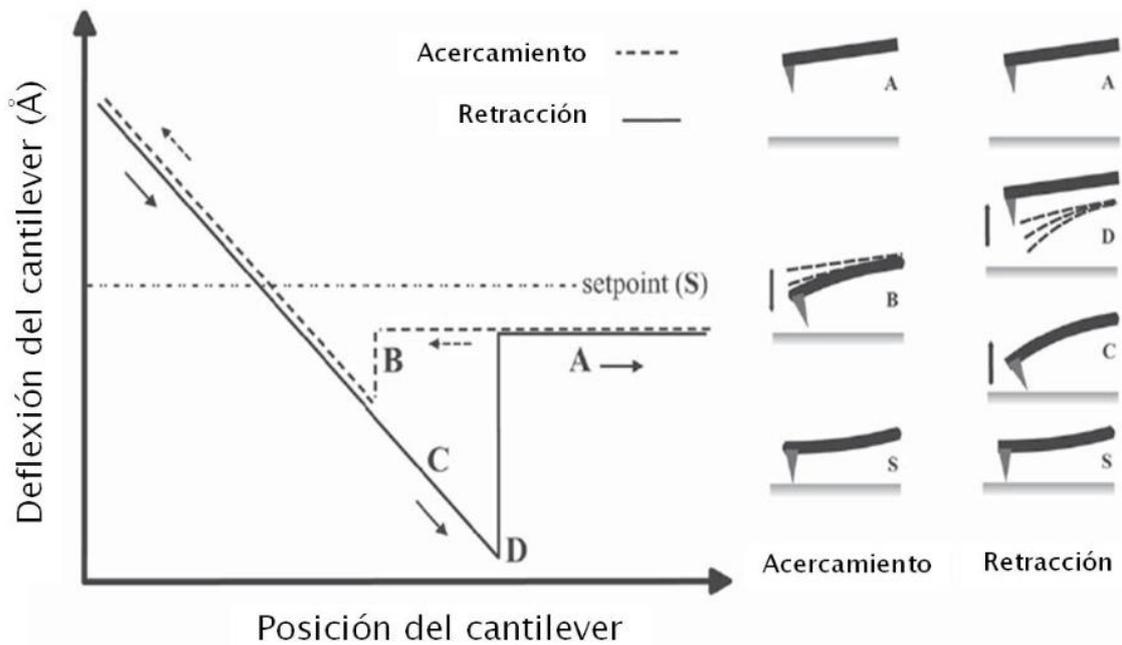


Figura 2.9. Esquema de una curva de fuerza experimental y el comportamiento del cantiléver.

Las posiciones A y B representan a la punta acercándose a la superficie y en la posición B se produce el contacto. Luego de la posición B, la punta se inclina hasta que se alcanza la fuerza aplicada (Setpoint (S)). Dependiendo de la elasticidad de la muestra, la punta puede llegar a penetrar el sustrato. Posteriormente, la punta se aleja de la muestra hacia las posiciones C y D. En la posición D, bajo la aplicación de la fuerza de retracción, la punta se desprende de la superficie. Entre las posiciones D y A, el cantiléver regresa a su posición de reposo.

Cuando la muestra se separa de la punta en experimentos realizados en aire se produce la deflexión hacia la muestra antes de que se rompa el contacto con la misma como consecuencia de las fuerzas adhesivas y capilares. Esta última proviene de la capa líquida de contaminación que cubre la superficie de la muestra en el aire.¹³ La punta pierde contacto con la superficie de la muestra en el punto de despegue donde ocurre la transición

del contacto a no contacto y la curva regresa a la línea de no contacto (**A** en **Figura 2.9**). La diferencia entre el punto mínimo de la curva fuerza-distancia (tomada en retroceso) y la línea de no contacto define la fuerza de separación, la cual es idéntica a las fuerzas adhesivas cuando las fuerzas capilares son despreciables.

El AFM consta, básicamente de una cabeza óptica que permite detectar la deflexión del cantiléver y un dispositivo de barrido (*scanner*) que contiene al piezotubo y permite el movimiento de la muestra respecto de la punta situada en la cabeza óptica. La cabeza de un microscopio de fuerzas atómicas consiste de un bloque óptico y de una base (**Figura 2.10**).

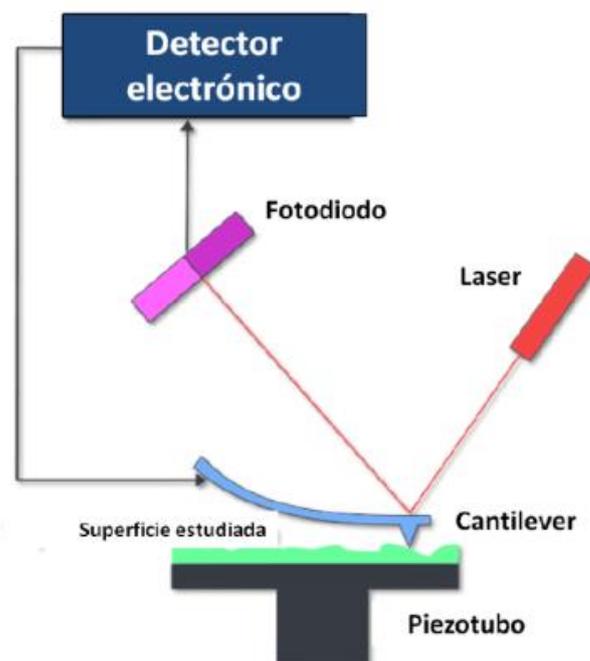


Figura 2.10. Esquema que representa a un microscopio de fuerzas atómicas.

El scanner mueve la punta respecto de la superficie o viceversa, mientras que el transductor de fuerza detecta el cambio de fuerza entre la punta y la muestra y el control de retroalimentación reenvía la señal al piezotubo para mantener la fuerza fija entre la punta y la muestra. La mayoría de los microscopios de fuerza atómica utilizan un sistema de deflexión de rayo láser,

donde el láser es reflejado desde el cantiléver reflectivo hacia un fotodetector sensible a la posición. El camino óptico entre el cantiléver y el fotodetector produce una amplificación mecánica de la señal del láser y, como consecuencia, el sistema llega a detectar los movimientos verticales de la punta con una precisión inferior a un Ångstrom.

Como se mencionó anteriormente, el AFM puede operar bajo distintos regímenes de fuerzas, de acuerdo al modo de operación elegido: contacto, no contacto o intermitente. Estos modos de operación se definen en base a la interacción punta-muestra, es decir, dependiendo el régimen de fuerzas aplicadas, sean repulsivas, atractivas o una combinación de ellas. La elección del modo de operación dependerá de la naturaleza de la muestra y de qué tipo de información se quiere obtener.

En el modo contacto, en el que la punta está en contacto físico con la muestra, se opera con interacciones repulsivas. Para el modo no contacto, en el cual la distancia entre punta y muestra es del orden de decenas a cientos de Ångstroms, el régimen de fuerzas es atractivo. En esta técnica se hace vibrar el cantiléver cerca de la superficie de la muestra con una frecuencia de resonancia entre 100 a 400 kHz. El sistema detecta los cambios en la frecuencia de resonancia del cantiléver o la amplitud de la vibración. La fuerza de atracción entre la punta y la muestra es menor a la fuerza repulsiva utilizada en modo de contacto. Por último, el modo intermitente (o *Tapping mode*) es aquél en el que una punta oscilante se va aproximando a la superficie y se produce un cambio en la oscilación debido a la interacción entre la punta y la muestra. En este modo la punta oscilante debe estar lo suficientemente cerca de la superficie en un régimen de fuerzas atractivas, sin que se alcancen interacciones repulsivas.¹³⁻¹⁵

2.5.2. AFM modo contacto.

Mide la topografía de la muestra deslizando la punta sobre su superficie; la punta escanea o “barre” la superficie de la muestra a una fuerza constante,

que es retroalimentada y controlada mediante el software, y es muy utilizada para superficies rugosas (**Figura 2.11**). Dependiendo del entorno y de la constante de fuerza del cantiléver, el intervalo de fuerzas en el que opera en AFM en modo contacto está entre uno hasta algunos cientos de nanonewtons.¹³

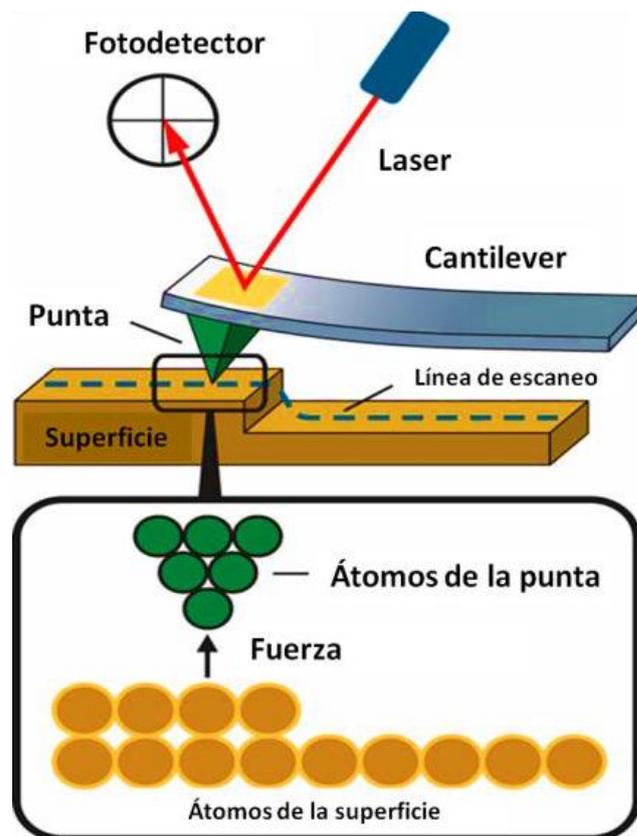


Figura 2.11. Esquema que representa el escaneo de la punta del AFM modo contacto sobre una superficie.¹⁶

En este modo de aplicación, la punta mantiene un contacto físico suave con la muestra. La punta se une al final del cantiléver con una baja constante de fuerza, menor que la constante de fuerza efectiva que mantienen los átomos de la muestra. Conforme la punta barre la superficie, la fuerza de contacto origina la flexión del cantiléver de modo que éste se adapta a la superficie topográfica de la muestra. Como resultado, en el modo de contacto, las fuerzas de Van der Waals se equilibra con cualquier otra fuerza que intente mantener juntos a los átomos. Por tanto, cuando el cantiléver

empuja a la punta contra la muestra, este se flexiona forzando a los átomos de la punta y muestra a permanecer juntos.

Otras dos fuerzas han de considerarse también en la AFM modo contacto:

- a) La fuerza de capilaridad ejercida sobre una delgada lámina de agua que a menudo está presente en el medio ambiente.
- b) La fuerza ejercida por el mismo cantiléver.

La fuerza total que ejerce la punta sobre la muestra es la suma de las fuerzas de capilaridad y del cantiléver, y debe equilibrar a la fuerza repulsiva de Van der Waals. La magnitud de la fuerza total que se ejerce sobre la muestra varía entre 10^{-8} N y 10^{-6} N.

Para obtener una imagen gráfica de la superficie, se detecta la posición del cantiléver, mediante el empleo de técnicas ópticas. Una radiación láser incide sobre el dorso especular del cantiléver, y de ahí se refleja sobre un fotodetector sensible a la posición. De esta manera, es posible obtener dos tipos de imágenes: topográficas y de deflexión. En el modo topográfico, se registran las variaciones locales de altura mientras la fuerza de interacción entre punta y muestra se mantiene constante. En el modo de deflexión, se registra la deflexión del cantiléver mientras que la altura de la sonda de escaneo se mantiene constante. Las imágenes topográficas brindan información cuantitativa de la topografía superficial de la muestra, las imágenes en modo deflexión en general exhiben mejor contraste de los detalles morfológicos.

La relación entre la longitud del camino recorrido por la radiación láser entre el cantiléver y el detector, y la longitud propia del cantiléver origina una amplificación mecánica. Como resultado el sistema puede detectar movimientos verticales de la punta del cantiléver, inferiores a los Å. Se puede trabajar en modo de fuerza constante o modo de altura constante.

Entre las ventajas y desventajas de la técnica AFM de contacto, se encuentran:

- Ventajas: Amplia gama de muestras a analizar; se pueden realizar medidas de elasticidad; se pueden realizar medidas *in situ* en una celda líquida o en la celda electroquímica; las resoluciones verticales y horizontales son muy elevadas.
- Desventajas: La punta está en contacto con la superficie; problemas de destrucción de la punta o modificación de la superficie, arrastre de partículas, las capas de agua absorbida generan problemas de importantes fuerzas de capilaridad; carga electrostáticas de superficie.

2.5.3. AFM en el análisis de muestras biológicas.

En el análisis de las primeras etapas de formación de biofilms, el AFM ha demostrado ser una técnica muy eficaz. Trabajos reportados que utilizaron AFM en modo contacto,^{17, 18} intermitente^{19, 20} y conductivo,^{21, 22} lo demuestran. La habilidad del AFM para analizar, por ejemplo, los biofilms en un ambiente acuoso y para realizar experimentos en tiempo real *in situ*, transforman esta técnica en una herramienta potencialmente poderosa para estudiar tanto el crecimiento del biofilm como las propiedades del sustrato.

Imágenes topográficas en 2 y 3 dimensiones de la superficie de las moléculas y células son posibles de obtener por AFM consiguiendo llegar a una resolución en z de 1 Å, gracias a la microfabricación de puntas cada vez más agudas, con radios de pocos nm. Las muestras para ser analizadas por esta técnica, no necesitan ser teñidas o tratadas previamente, el único requerimiento es su inmovilización sobre una superficie nanométricamente plana. Por lo tanto, los procesos biológicos pueden ser estudiados *in situ* con la menor interferencia posible. A pesar de que las medidas en líquido son bastante más complejas que en aire, el hecho de poder medir en condiciones

fisiológicamente relevantes es de vital importancia para estudios biológicos *in situ*.¹⁹

Al estudiar muestras biológicas, es importante que la muestra se encuentre adherida suficientemente fuerte al sustrato, para evitar el desprendimiento de la muestra por el barrido de la punta y a la vez que esta fijación no cause alteraciones significativas en el sistema en estudio. Estas alteraciones pueden ser por ejemplo, el colapso inducido en la muestra durante el cambio de la tensión superficial por un secado abrupto o congelación, o la distorsión de la topografía debida a algún tipo de cubrimiento de la muestra. La inmovilización de células vivas, permite profundizar en el conocimiento de la estructura y función de numerosas células a partir no sólo del análisis de imágenes sino de la medida de fuerzas mediante AFM.²³⁻²⁶ Además de analizar células completas, el AFM también es capaz de estudiar biomoléculas tales como proteínas, lípidos o ácidos nucleicos.²⁷⁻³¹

2.5.4. Arreglo experimental.

En el presente Trabajo de Tesis se utilizó un microscopio Multimode controlado por una unidad Nanoscope V de Digital Instruments (Bruker – Santa Bárbara, CA, USA). Se usaron cantilévers triangulares de Si_3N_4 con una constante elástica k entre 0.06 y 0.58 N/m.

Las medidas *in situ* se llevaron a cabo en las celdas de líquido propias de cada equipo. En el Nanoscope V, la celda es de vidrio y posee un clip para sostener el cantiléver tal como el *holder* para medidas *ex situ*, siendo el láser capaz de traspasarla sin inconvenientes (**Figura 2.12**). El líquido se agrega por un orificio lateral con una pipeta automática y queda retenido entre la celda y la muestra. El agregado del líquido debe hacerse con extremo cuidado, ya que la presencia de burbujas perjudica o impide las medidas ya que obstruyen el camino óptico del láser. Dependiendo de la hidrofiliicidad de la muestra los volúmenes agregados fueron de 30 - 40 μL . En este diseño, es imprescindible secar al menos parcialmente la muestra antes de ingresarla al microscopio.

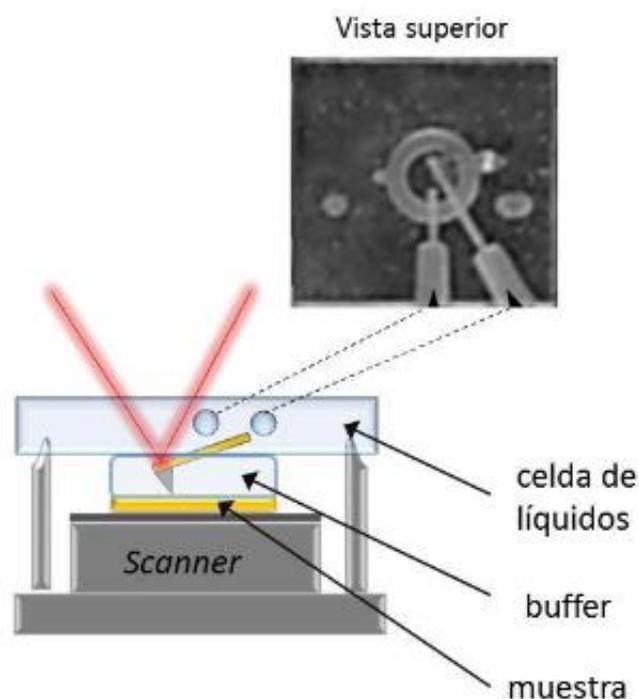


Figura 2.13. Esquema de la disposición de la celda de líquidos.⁴

Para todas las medidas se empleó buffer fosfatos 10mM a pH 7.4 y se realizaron a temperatura ambiente ($\sim 24^{\circ}\text{C}$). El análisis de imágenes adquiridas en el Nanoscope V se llevó a cabo mediante el *software* proporcionado por Digital Instruments Inc., utilizando los programas Nanoscope versión 7,3 y Nanoscope Analysis 1,5.

2.6. Balanza de Langmuir o de Langmuir-Blodgett.

A partir de estudios realizados de monocapas o films monomoleculares depositados sobre la superficie del agua, se puede obtener información útil acerca de secciones moleculares y las fuerzas intermoleculares que están presentes en este tipo de sistemas. El renovado interés en esta área de la ciencia también se debe en gran parte al hecho de que las películas se pueden transferir desde la superficie del agua a un sustrato sólido utilizando lo que se conoce universalmente como la técnica de Langmuir-Blodgett (LB).³²

Las balanzas de Langmuir o de Langmuir–Blodgett modernas están controladas por completo electrónicamente. Poseen una cuba de Teflón®, barreras móviles de Teflón® o Derlin® controladas por un motor que permite un preciso control de la presión aplicada a la monocapa, un dispositivo que obtiene información del sensor de presión en la superficie del agua y regula la presión (electrobalanza) y un dispositivo para sumergir controladamente sustratos sólidos (*dipper*) (**Figura 2.14**). La incorporación del Teflón®, introducido por Fox y Zisman en 1955, facilita la limpieza de las superficies en contacto con la subfase, para obtener monocapas libres de contaminantes (otros surfactantes). Además, la balanza de LB se ubica dentro de una cabina para lograr una atmósfera controlada y se emplea una mesa antivibratoria para evitar las oscilaciones en la superficie.

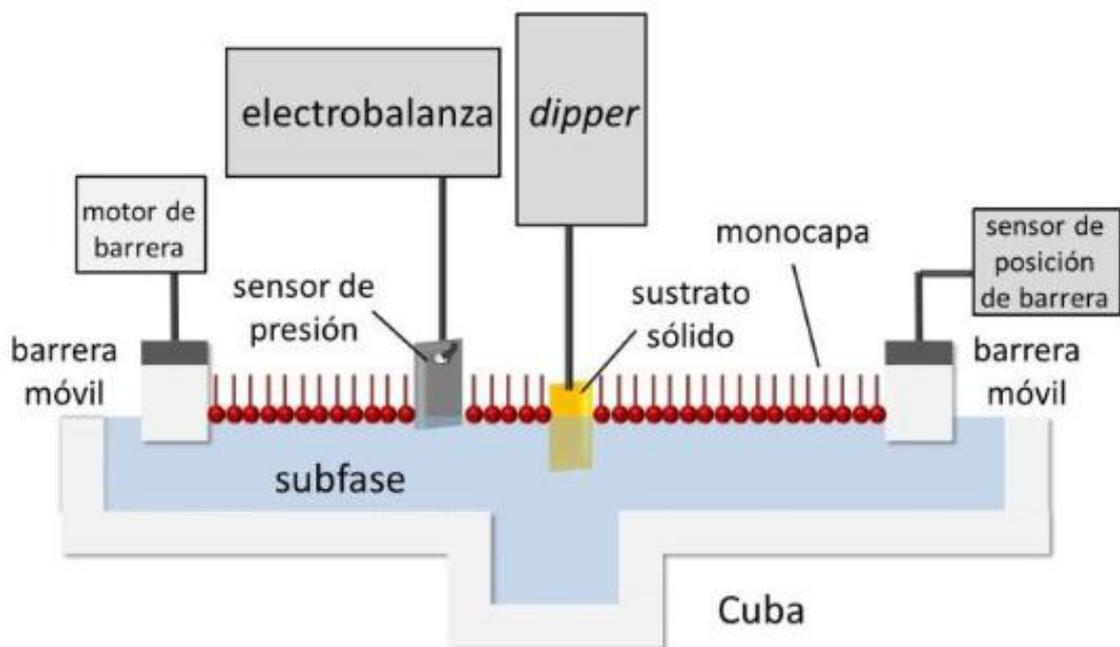


Figura 2.14. Esquema de las partes que constituyen una balanza de Langmuir. Cuando en el diseño experimental se incluye un *dipper* se denomina balanza de Langmuir–Blodgett (ver sección 2.6.3).⁴

2.6.1. Películas de Langmuir.

Las monocapas o películas de Langmuir de compuestos anfipáticos, se pueden formar en la interfase agua/aire usando una balanza de Langmuir. En

el sistema modelo de Langmuir varios parámetros tales como la composición de anfifilos (ejemplo: surfactantes, lípidos), de la subfase, y la temperatura pueden elegirse para imitar las condiciones biológicas.^{33, 34} Además, las monocapas lipídicas están muy bien definidas, son estables, y tienen un arreglo bidimensional (2D) con geometría plana.

La principal clase de compuestos capaces de formar películas estables en la superficie del agua son aquellas conocidas como compuestos anfipáticos o anfifílicos. Las moléculas de estos compuestos poseen un grupo polar, que es atraído por el agua, y una porción no polar suficientemente grande (generalmente una larga cola hidrofóbica) que impide la disolución de la monocapa en el agua. El grupo polar suele estar localizado en un extremo de la molécula de modo que las moléculas pueden alinearse paralelas una al lado de otra con la cola hidrofóbica sobresaliendo de la superficie del agua. Los materiales anfifílicos más simples son los alcoholes y ácidos carboxílicos de cadena larga, como el ácido esteárico, los cuales han sido ampliamente investigados. Otra clase de materiales muy estudiados comprende por biomoléculas constituyentes estructurales de las membranas biológicas como fosfolípidos y lipopolisacáridos.³⁵

Las monocapas de Langmuir son una organización bidimensional de moléculas (o de materiales anfipáticos) presentes en la interfase agua/aire que se obtienen en un dispositivo denominado balanza de Langmuir como se muestra en la **Figura 2.14**. Este dispositivo está formado por una cuba de material hidrofóbico como Teflón® donde se coloca una solución acuosa (subfase), sobre la cual se depositan los compuestos a ser estudiados mediante el empleo de una microjeringa. La balanza de Langmuir dispone de barreras móviles que permiten variar el área total disponible para los compuestos y controlar su concentración (densidad) superficial. Al reducir el área disponible entre las moléculas que forman la monocapa, se establecen interacciones y reordenamientos en la superficie.

Estas interacciones se manifiestan a través de cambios en la *tensión superficial* (γ) y en cambios topográficos. La diferencia entre la tensión

superficial en ausencia (γ_0) y presencia (γ) de surfactante es denominada *presión lateral o superficial* (π) como se muestra en la **Ecuación 2.9**; la representación de π en función del área disponible por molécula da origen a una *Isoterma de Langmuir*.

$$\pi = -\Delta\gamma = \gamma_0 - \gamma \quad (2.9)$$

El *método de Wilhelmy* permite medir la presión superficial a partir de un material delgado hidrofílico suspendido desde un dinamómetro y parcialmente sumergido en el líquido. Las fuerzas actuantes son la fuerza gravitacional, la tensión superficial y la fuerza aplicada por la masa de subfase desplazada (principio de Arquímedes) (**Ecuaciones 2.10 y 2.11**).

$$F = F_{gravitacional} + F_{tensión} - F_{flotación} \quad (2.10)$$

$$F = (WTL)\rho_p g + 2\gamma (W + T) \cos \theta - (WTh)\rho_w \quad (2.11)$$

Donde L , W y T son la altura, el ancho y el espesor del platillo respectivamente, h es la altura del platillo sumergido en la subfase, γ es la tensión superficial del líquido, θ el ángulo de contacto, g la aceleración gravitatoria, ρ_w y ρ_p son las densidades de la subfase y del platillo respectivamente, representados en la **Figura 2.15**.

Si se asume un ángulo de contacto igual a cero (**Ecuación 2.12**):

$$\pi = \frac{-\Delta F}{2(W+T)} \quad (2.12)$$

Para la interfase limpia se ajusta $\pi = 0$ y al agregar surfactante y variar el área disponible se observa una respuesta en π .

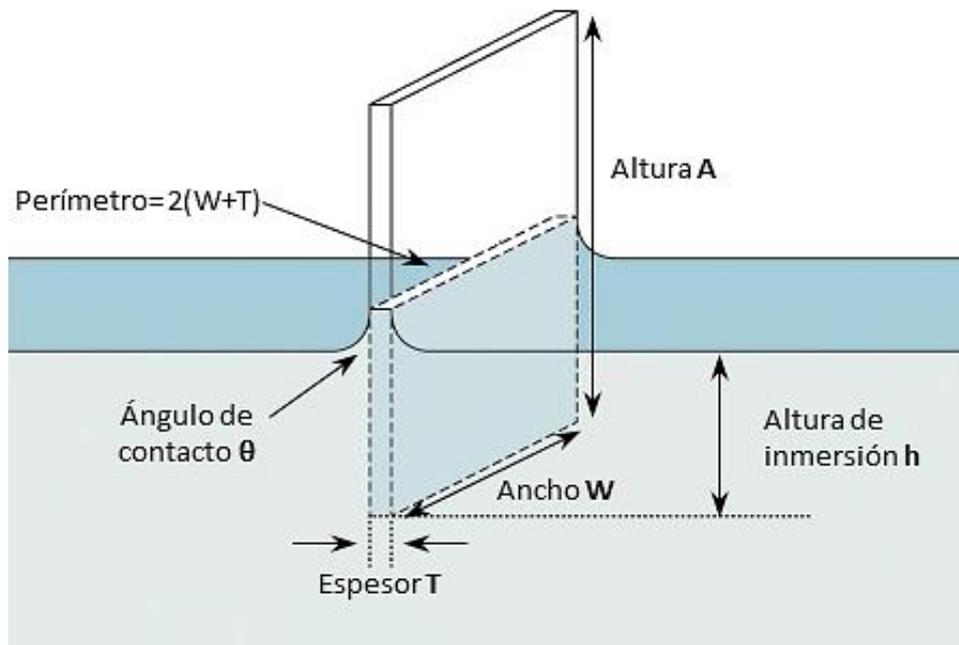


Figura 2.15. Esquema del platillo de Wilhelmy.

Cuando se realiza una isoterma de Langmuir es necesario conocer el volumen y la concentración de la solución del surfactante sembrado (depositado) en la interfase, así como el área total disponible de la cuba en los diferentes estadios de compresión. A partir de estos datos es posible calcular el área promedio que ocupa cada molécula⁷ a las diferentes presiones de superficie. Dependiendo de la naturaleza del surfactante, a medida que se reduce el área promedio disponible, la presión superficial se incrementa y las moléculas se reorganizan adquiriendo distintos estados de fase. En la **Figura 2.16** se muestra un ejemplo de isoterma de Langmuir, allí se observa como varía la organización de un anfifilo al variar la presión de superficie. En una isoterma de Langmuir, π_c corresponde a la presión de colapso que es la máxima presión a la que puede comprimirse la monocapa sin expulsión “detectable” de moléculas de la interfase.

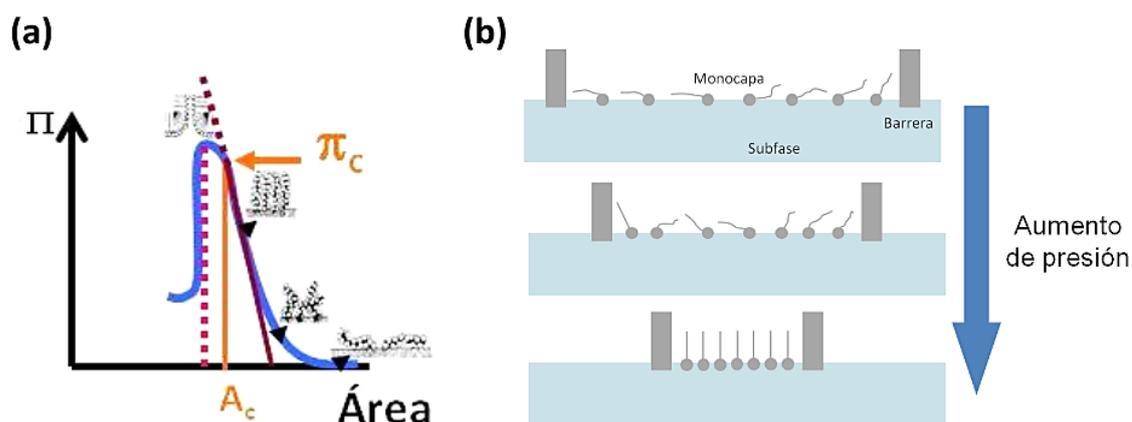


Figura 2.16. (a) Representación esquemática de una isoterma de Langmuir. (b) Organización adoptada por un anfifilo en diferentes estadios de la compresión.

La organización de los componentes de una monocapa en dos dimensiones hace que estos sistemas sean muy adecuados para la investigación de sus propiedades termodinámicas y la manipulación estructural de propiedades de superficie en condiciones moleculares conocidas y controladas.

Si la cantidad de moléculas depositadas en la interfase agua/aire permanece constante durante la compresión (no hay desorción), y si se conoce la concentración y volumen sembrado de la solución del anfifilo, es posible calcular el *área promedio por molécula* (área promedio disponible por cada molécula) dividiendo el área de la monocapa determinada por la posición de las barreras por el total de moléculas "sembradas" en la superficie (teniendo en cuenta el volumen y la concentración del anfifilo). Las isothermas se muestran comúnmente expresadas en función del área por molécula en [$\text{Å}^2/\text{molec}$] o [nm^2/molec].

Las fases características con las que se puede describir una isoterma están determinadas principalmente por la naturaleza del anfifilo, de acuerdo al tamaño y grado de polaridad de la cabeza hidrofílica y al largo y disposición de las cadenas hidrocarbonadas. Además, la subfase puede influenciar el orden de acuerdo a su composición (pH, concentración de

iones, presencia de quelantes, etc.). La temperatura tiene un rol trascendental ya que variaciones muy pequeñas pueden modificar el estado de fase del anfifilo. Las bajas temperaturas tienden a fomentar el orden, favoreciendo la extensión de las fases condensadas, mientras que el aumento de temperatura favorecerá el desorden en las monocapas. De manera general, las isothermas π vs. A proveen información de la estabilidad de la monocapa en la interfase aire/líquido, la reorientación de las moléculas en el sistema bidimensional y la existencia de transiciones de fase y reorganizaciones conformacionales.³⁶

También para estudiar la actividad de superficie de los anfifilos se puede analizar la adsorción de los mismos a la interfase agua/aire. Para ello se inyecta en la subfase (con agitación continua) diferentes volúmenes de los anfifilos para alcanzar diferentes concentraciones finales en la subfase. Luego se mide en función del tiempo (a área constante) los cambios en la presión de superficie (π) mientras se forma una monocapa de Gibbs en la interfase agua/aire.³⁷ En contraste con las monocapas de Langmuir, las monocapas de Gibbs reflejan el equilibrio entre la forma bulk del anfifilo y la película formada en la interfase. Para anfifilos clásicos como surfactantes o lípidos estos experimentos se realizan empleando una concentración de anfifilo en la subfase que sea superior a su concentración micelar crítica (CMC) a fin de asegurar la saturación de la interfase.

Para estudiar la asociación de otras entidades, como surfactantes, fármacos, proteínas, NPs, a la interfase agua/aire en presencia de una monocapa lipídica en distintos estados de fases, se realizan experimentos de penetración. Para ello se forma previamente a la inyección en la subfase del compuesto a evaluar, una monocapa lipídica por deposición de una solución clorofórmica de los lípidos en la interfase aire/agua, hasta alcanzar la presión inicial deseada. Posteriormente se inyecta el compuesto a estudiar y se registran los cambios en la π respecto a la presión inicial en función del tiempo (a área constante). Los cambios de π observados obedecen a la interacción entre el anfifilo y los lípidos presentes en la interfase.

2.6.2. Arreglo experimental de una balanza de Langmuir.

Las medidas con balanza de Langmuir se realizaron con equipos fabricados en el laboratorio o de la firma KSV NIMA pertenecientes al CIQUIBIC-Universidad Nacional de Córdoba (Argentina). Las balanzas empleadas poseen cubas de Teflón® y la π se midió mediante el método de Wilhelmy, utilizando una placa de Pt de dimensiones conocidas, para asegurar su limpieza se procedió a un flameo con mechero de gas natural durante unos segundos previamente a la colocación en el soporte colgante de la balanza.

Las subfases siempre fueron soluciones buffer fosfatos 10 mM pH 7.4 y se aseguró su limpieza (ausencia de contaminación por surfactantes) midiendo la π superficial y aspirando material de la interfase mediante una bomba, la cual para tales fines posee una manguera con un *tip* plástico en el extremo. La balanza se encuentra dentro de una cabina especialmente diseñada para evitar la contaminación de la superficie (**Figura 2.17**) y está soportada sobre una mesa aislada de vibraciones.

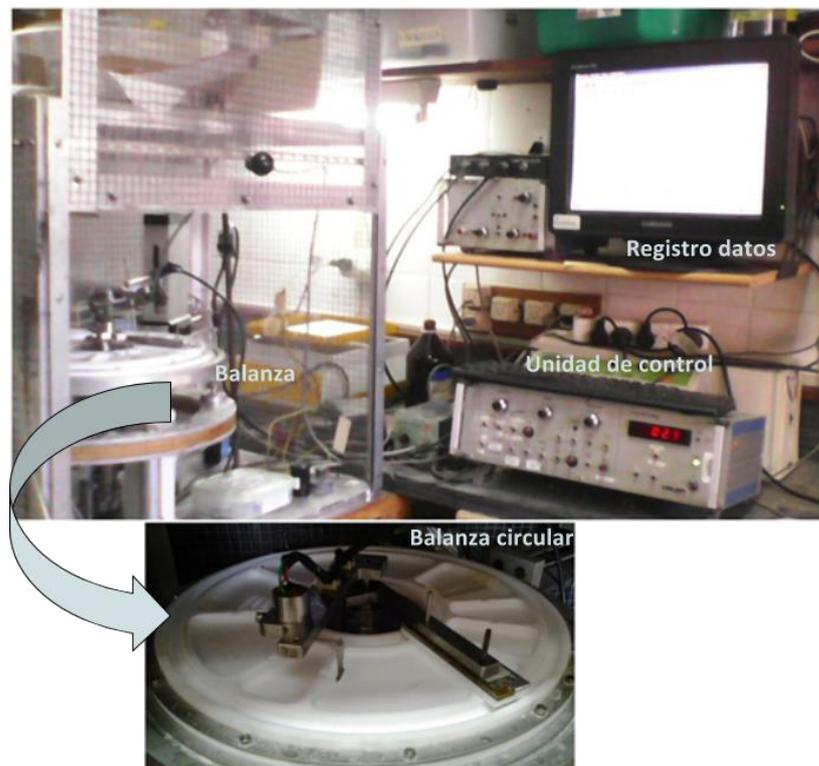


Figura 2.17. Balanza de Langmuir circular utilizada para la obtención de las monocapas de adsorción y de Langmuir. Fabricada en el Laboratorio del CIQUIBIC – Universidad Nacional de Córdoba (Argentina).

2.6.3. Films de Langmuir–Blodgett.

Como se mencionó anteriormente, la posibilidad de transferir películas formadas en la interfase agua/aire sobre un sustrato sólido, preservando la organización adquirida espontáneamente por los anfifilos en la interfase, presenta gran interés para estudios de ciencia básica como para desarrollos tecnológicos. Este procedimiento es conocido universalmente conocido como la técnica de Langmuir-Blodgett (LB).³²

Para realizar transferencias LB, a una balanza de Langmuir debe acoplarse un dispositivo (*dipper*) que permite deslizar de manera controlada un sustrato sólido (vidrio, oro, platino, mica silicio, etc.) a través de la interfase donde se encuentra la película de Langmuir empaquetada a una presión de superficie deseada (**Figura 2.14**). El sustrato sólido se puede hacer pasar a través de la monocapa desde el aire hacia la subfase líquida, o desde la subfase hacia el aire permitiendo que la película se adsorba homogéneamente en la superficie del sustrato luego de cada inmersión o emersión. La velocidad típica a la que se realiza una transferencia es de 1–5 mm/min.

El valor de π elegido para realizar la transferencia LB depende del arreglo topográfico que se quiera transferir al sustrato sólido. El valor de π que proporciona mejores resultados depende también de la naturaleza de la monocapa. Sin embargo, es necesario tener presente que algunos materiales muy pocas veces pueden depositarse con éxito a presiones de superficie de menos de 10 mN m^{-1} , y a presiones superficiales cercanas a la presión de colapso del film.³²

Existen diferentes diseños para la deposición de films sobre el sustrato sólido cuya elección depende del tipo de superficie que se desee obtener (superficie con los grupos hidrófilicos o hidrófobicos del film expuestos) (**Figura 2.18**).

Si para la transferencia LB se emplea un sustrato hidrofílico, el sustrato se sumerge en la subfase y se lo hace emerger hacia el aire quedando de esta manera los grupos polares del anfifilo en contacto con el soporte. Si para la deposición se utiliza un sustrato hidrofóbico, la deposición comienza desde el aire hacia la subfase acuosa quedando la región hidrofóbica del anfifilo en contacto con el soporte. Para ambos diseños se pueden realizar múltiples deposiciones tal como se muestra en la **Figura 2.18**.

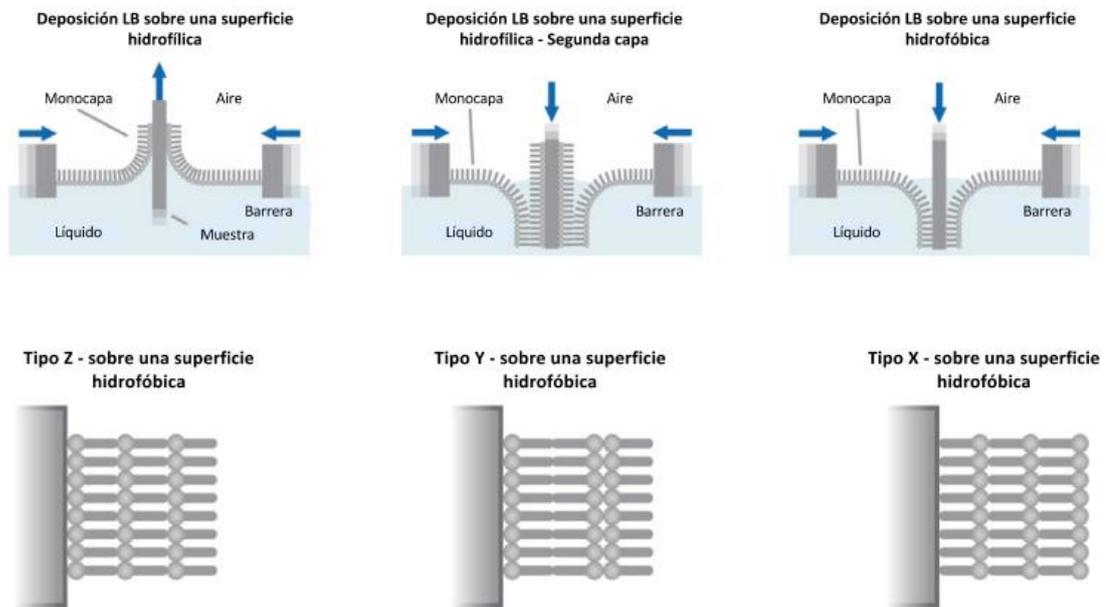


Figura 2.18. Varias posibilidades de deposición LB sobre sustratos hidrofóbicos e hidrofílicos.

La deposición de múltiples capas más común es la de múltiples capas de tipo Y, que se produce cuando la monocapa se deposita en el sustrato sólido, en ambos sentidos ascendente y descendente. Cuando la monocapa se deposita ya sea sólo en la dirección hacia arriba o hacia abajo la estructura multicapa se llama, tipo Z o de tipo X. A veces se observan estructuras intermedias en algunas multicapas LB y a menudo se hace referencia a que son multicapas de tipo XY.

2.7. Microscopía de ángulo de Brewster (BAM).

La microscopía de ángulo de Brewster (BAM: *Brewster Angle Microscopy*, en inglés) es una técnica para el estudio de films ultradelgados sobre una superficie plana. Se basa en las propiedades de reflectividad de la luz en las interfases. Es capaz de tomar imágenes de films tan delgados como films monomoleculares, por ejemplo, las monocapas de moléculas anfifílicas en la superficie del agua (películas de Langmuir).³⁸

Debe considerarse, que la reflectividad (R) es la fracción de radiación reflejada (I_R) por una superficie con respecto a la radiación incidente (I_0) según la **Ecuación 2.13**:^{39, 40}

$$R = \frac{I_R}{I_0} \quad (2.13)$$

La intensidad reflejada (I_R) es función del ángulo de incidencia θ_i , de la polarización de la luz y del tipo de interfase. Para una interfase entre dos medios de diferente índice de refracción n_1 y n_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 la **Ecuación 2.14**:

$$\tan\theta_B = \frac{n_2}{n_1} \quad (2.14)$$

Donde θ_B es el ángulo de Brewster, n_1 es el índice de refracción del medio 1 (aire) y n_2 el índice de refracción del medio 2 (agua).

Un microscopio de BAM permite la visualización de las monocapas de Langmuir o películas de adsorbato en la interfase aire-agua (**Figura 2.19**). Este tipo de microscopía utiliza la condición libre de reflexión que se produce cuando la luz polarizada es guiada hacia una interfase aire-agua en un ángulo incidente específico. Este ángulo se denomina ángulo Brewster, y depende de los índices de refracción de los materiales en el sistema.

El ángulo de Brewster para la interfase aire-agua es de $\sim 53.1^\circ$, y bajo esta condición la imagen de una superficie de agua pura aparece de color negro. Al introducir el material de estudio en la interfase aire-agua, se modifica el índice de refracción local (IR) y esto hace que una pequeña cantidad de luz se refleje y se muestre en la imagen. La imagen obtenida contiene áreas de diferente brillo, el cual es determinado por las moléculas particulares y la densidad de empaquetamiento a través de la zona de muestreo.

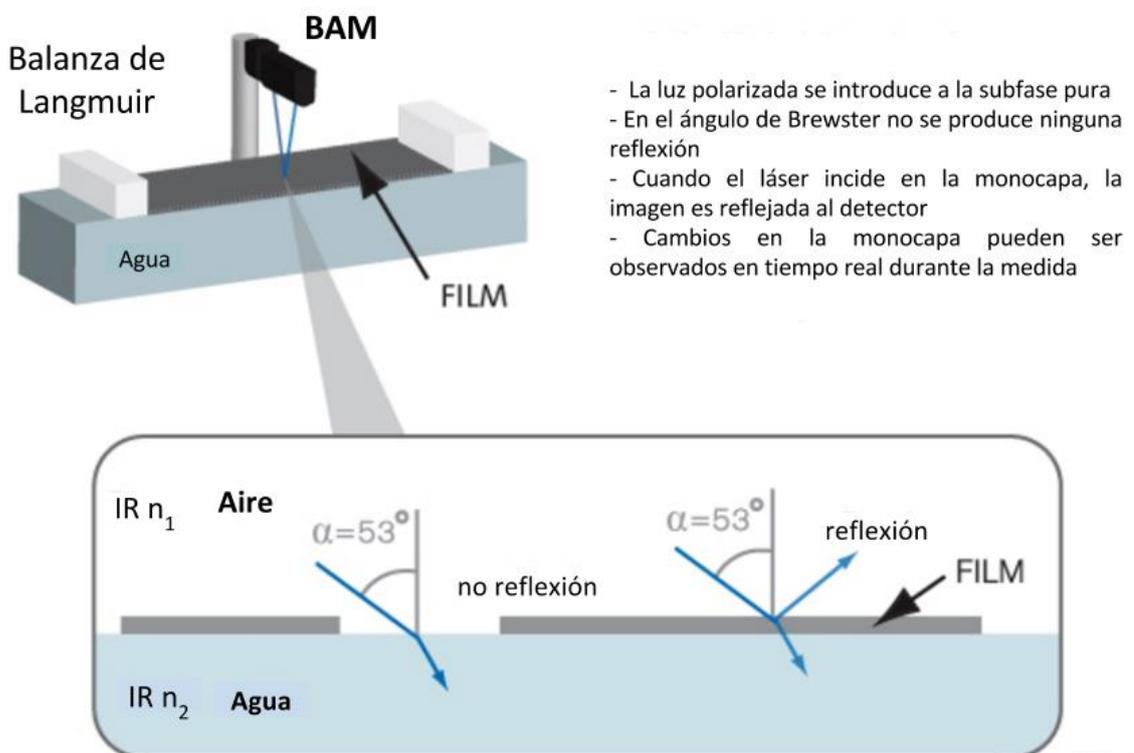


Figura 2.19. Esquema de un microscopio BAM.

De modo que, el BAM se basa en el principio de la reflectividad cero en la interfase agua/aire para un haz de luz linealmente polarizado en el ángulo de incidencia que coincide con el de Brewster. 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 de los componentes presentes.

Finalmente, se puede decir que la técnica de BAM es muy útil para el estudio topográfico y de la textura de películas de Langmuir formadas en la interfase agua/aire; además, esta técnica está libre del agregado de marcadores o sondas que pueden perturbar la topografía del film. Da información directa sobre la densidad de la capa de las interfases y su anisotropía óptica, a diferencia de la microscopía de fluorescencia. También, puede ser utilizada en superficies planas cuando la capa superficial tiene un índice de refracción diferente a la del sustrato.

2.7.1. Arreglo experimental.

Las medidas hechas para BAM se realizaron con un equipo de la firma Accurion pertenecientes al CIQUIBIC–Universidad Nacional de Córdoba (Argentina).

La cuba circular empleada para la visualización de las monocapas se montó sobre la plataforma de un Elipsómetro Nanofilm EP3 Imaging (Accurion, Göttingen, Germany), la cual se usó en el modo BAM, tal como se indica en la **Figura 2.20**.

El equipo utilizado posee un láser de $\lambda = 532$ nm que incide en la superficie acuosa, el mínimo de reflexión se estableció en el ángulo de Brewster ($\sim 53.1^\circ$). La luz reflejada se colecta a través de un objetivo 20X pasando por lentes analizadores polarizados y siendo capturada por una cámara CCD con una velocidad de 25 Hz. La presión superficial se midió a través del tiempo con una placa sensora de Pt–platinizada utilizando el método de Wilhelmy. El hecho de acoplar el BAM al sensor de presión, permite correlacionar la topografía con los parámetros termodinámicos obtenidos en las isothermas π vs. A.

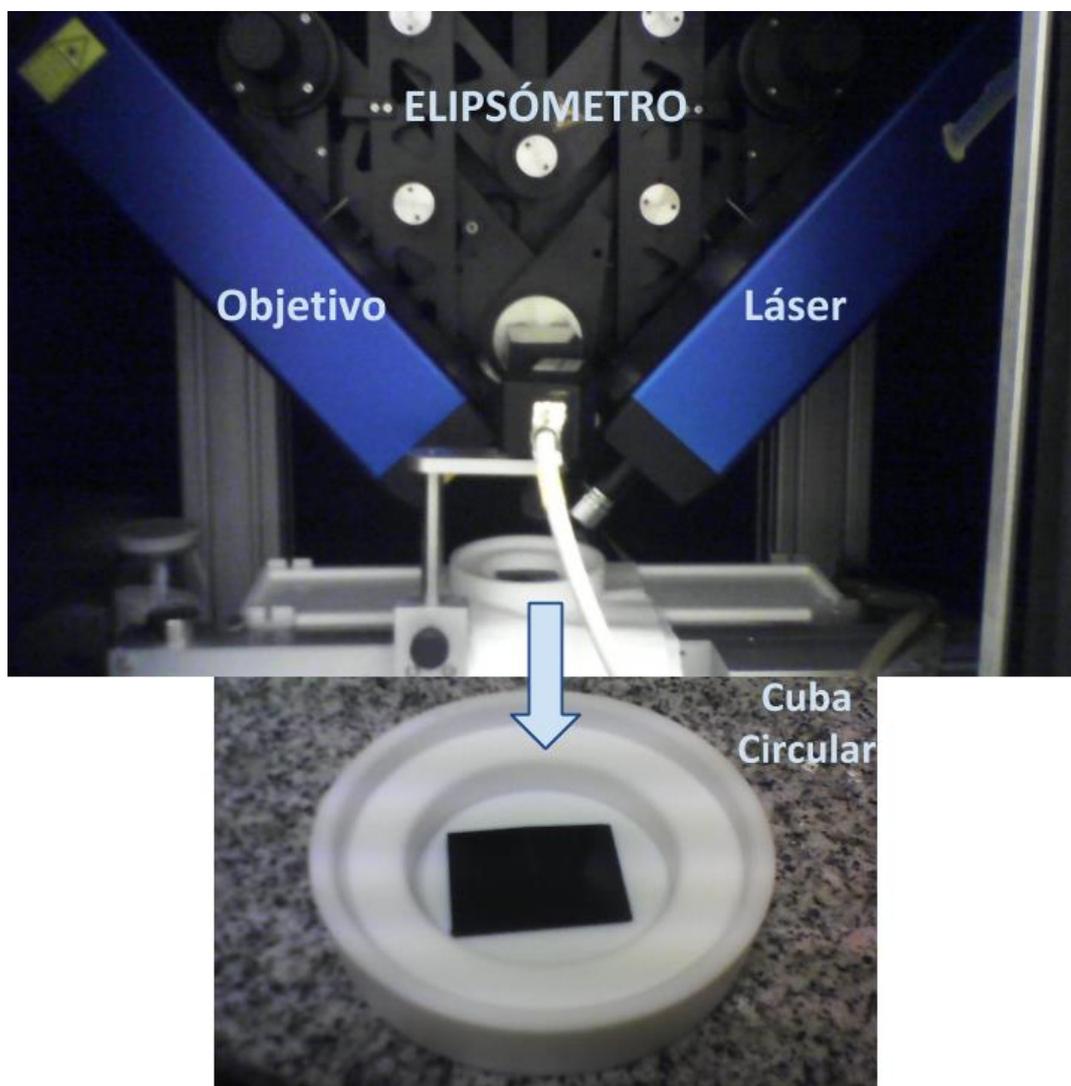


Figura 2.20. Cuba circular utilizada para las medidas hechas por Microscopía de Ángulo de Brewster (BAM). Laboratorio del CIQUIBIC – Universidad Nacional de Córdoba (Argentina).

Referencias Bibliográficas

- [1] Adamson, A. W.; Gast, A. P., *Physical Chemistry of Surfaces*. 6th ed.; John Wiley & Sons: New York, 1997.
- [2] Bard, A. J.; Faulkner, L. R., *Electrochemical Methods: Fundamentals and applications*. John Wiley & Sons, Inc.: New York, 2001.
- [3] Bockris, J. O. M.; Reddy, A. K. N., *Modern Electrochemistry*. 2nd ed.; Plenum Press: New York, 1998; Vol. 1 & 2.
- [4] Daza Millone, M. A. Monocapas Autoensambladas de Alcanotioles y α,ω -alcanoditioles sobre Oro: Adsorción no específica de Moléculas Bioactivas, Biomoléculas y Vesículas. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, 2011.
- [5] Briggs, D.; Seah, M.; Wagner, C., Practical surface analysis. *Auger and X-ray Photoelectron Spectroscopy* **1990**, 1, 595.
- [6] Fadley, C., Basic concepts of X-ray photoelectron spectroscopy. *Electron spectroscopy: theory, techniques and applications* **1978**, 2, 1-156.
- [7] Hüfner, S., *Photoelectron spectroscopy: principles and applications*. Springer Science & Business Media: 2013.
- [8] Feldman, L. C.; Mayer, J. W., Fundamentals of surface and thin film analysis. *North Holland, Elsevier Science Publishers, P. O. Box 211, 1000 AE Amsterdam, The Netherlands, 1986*. **1986**.
- [9] Ekspong, G., *Physics 1981-1990*. World Scientific: 1993; Vol. 6.
- [10] Carter, C. B.; Williams, D., *Transmission electron microscopy*. Springer-Verlag US: 2009.
- [11] Lentzen, M.; Urban, K., Contrast transfer and resolution limits for sub-Ångström high-resolution transmission electron microscopy. *Microscopy and Microanalysis* **2006**, 12 (S02), 1456-1457.
- [12] Skoog, D. A.; Holler, F.; Stanley, R. D. A.; Aucejo, M.; Estellés, A.; Hernández, M. H.; Aucejo, R. M.; Estellés, M. L.; Hernández, R. H.; Alonso, S., *Principios de análisis instrumental*. Cengage Learning: 2008.
- [13] Magonov, S. N.; Whangbo, M.-H., *Surface analysis with STM and AFM: experimental and theoretical aspects of image analysis*. John Wiley & Sons: 2008.
- [14] Veeco., *A Practical Guide to Scanning Probe Microscopy SPM*. 2005.
- [15] Eaton, P.; West, P., *Atomic force microscopy*. Oxford University Press: 2010.
- [16] Diaz, C. Adherencia y colonización de *Pseudomonas fluorescens* sobre sustratos sólidos: influencia de la topografía y composición química de la superficie. Facultad de Ciencias Exactas, 2011.
- [17] Beech, I. B.; Smith, J. R.; Steele, A. A.; Penegar, I.; Campbell, S. A., The use of atomic force microscopy for studying interactions of bacterial biofilms with surfaces. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* **2002**, 23 (2), 231-247.
- [18] Dufrene, Y., Application of atomic force microscopy to microbial surfaces: from reconstituted cell surface layers to living cells. *Micron* **2001**, 32 (2), 153-165.
- [19] Fantner, G. E.; Barbero, R. J.; Gray, D. S.; Belcher, A. M., Kinetics of antimicrobial peptide activity measured on individual bacterial cells using high-speed atomic force microscopy. *Nature nanotechnology* **2010**, 5 (4), 280-285.
- [20] Camesano, T. A.; Natan, M. J.; Logan, B. E., Observation of changes in bacterial cell morphology using tapping mode atomic force microscopy. *Langmuir* **2000**, 16 (10), 4563-4572.
- [21] El-Naggar, M. Y.; Gorby, Y. A.; Xia, W.; Nealson, K. H., The molecular density of states in bacterial nanowires. *Biophysical journal* **2008**, 95 (1), L10-L12.
- [22] Reguera, G.; McCarthy, K. D.; Mehta, T.; Nicoll, J. S.; Tuominen, M. T.; Lovley, D. R., Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature* **2005**, 435 (7045), 1098-1101.
- [23] Ohnesorge, F.; Hörber, J.; Häberle, W.; Czerny, C.; Smith, D.; Binnig, G., AFM review study on pox viruses and living cells. *Biophysical journal* **1997**, 73 (4), 2183-2194.
- [24] Patel, D.; Smith, J. R.; Smith, A. W.; Grist, N.; Barnett, P.; Smart, J. D., An atomic force microscopy investigation of bioadhesive polymer adsorption onto human buccal cells. *International journal of pharmaceuticals* **2000**, 200 (2), 271-277.
- [25] Gaboriaud, F.; Dufrêne, Y. F., Atomic force microscopy of microbial cells: application to nanomechanical properties, surface forces and molecular recognition forces. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* **2007**, 54 (1), 10-19.
- [26] Cross, S. E.; Kreth, J.; Zhu, L.; Qi, F.; Pelling, A. E.; Shi, W.; Gimzewski, J. K., Atomic force microscopy study of the structure-function relationships of the biofilm-forming bacterium *Streptococcus mutans*. *Nanotechnology* **2006**, 17 (4), S1.

- [27] Engel, A.; Lyubchenko, Y.; Müller, D., Atomic force microscopy: a powerful tool to observe biomolecules at work. *Trends in cell biology* **1999**, *9* (2), 77-80.
- [28] Fritz, J.; Anselmetti, D.; Jarchow, J.; Fernandez-Busquets, X., Probing single biomolecules with atomic force microscopy. *Journal of structural biology* **1997**, *119* (2), 165-171.
- [29] Kellermayer, M. S.; Karsai, Á.; Kengyel, A.; Nagy, A.; Bianco, P.; Huber, T.; Kulcsár, Á.; Niedetzky, C.; Proksch, R.; Grama, L., Spatially and temporally synchronized atomic force and total internal reflection fluorescence microscopy for imaging and manipulating cells and biomolecules. *Biophysical journal* **2006**, *91* (7), 2665-2677.
- [30] Roberts, C. J.; Williams, P. M.; Davies, M. C.; Jackson, D. E.; Tendler, S. J., Atomic force microscopy and scanning tunnelling microscopy: refining techniques for studying biomolecules. *Trends in biotechnology* **1994**, *12* (4), 127-132.
- [31] Van Noort, S. J. T.; van der Werf, K. O.; de Grooth, B. G.; Greve, J., High speed atomic force microscopy of biomolecules by image tracking. *Biophysical journal* **1999**, *77* (4), 2295-2303.
- [32] Roberts, G., Langmuir-Blodgett Films Plenum Press. New York **1990**.
- [33] Brezesinski, G.; Möhwald, H., Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces. *Advances in colloid and interface science* **2003**, *100*, 563-584.
- [34] Marsh, D., Intrinsic curvature in normal and inverted lipid structures and in membranes. *Biophysical journal* **1996**, *70* (5), 2248.
- [35] Adamson, A. W., *Physical Chemistry of Surfaces*. 1982.
- [36] Girard-Egrot, A. P.; Blum, L. J., Langmuir-Blodgett technique for synthesis of biomimetic lipid membranes. In *Nanobiotechnology of biomimetic membranes*, Springer: 2007; pp 23-74.
- [37] Petty, M. C., *Langmuir-Blodgett films: an introduction*. Cambridge University Press: 1996.
- [38] Baszkin, A.; Norde, W., *Physical chemistry of biological interfaces*. CRC Press: 1999.
- [39] Vollhardt, D., Brewster angle microscopy: A preferential method for mesoscopic characterization of monolayers at the air/water interface. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2014**, *19* (3), 183-197.
- [40] Tabe, Y.; Yokoyama, H., Fresnel formula for optically anisotropic Langmuir monolayers: an application to Brewster angle microscopy. *Langmuir* **1995**, *11* (3), 699-704.

Capítulo 3

Autoensamblado de tioles sobre superficies planas

En este capítulo se describirán la estructura y formación de monocapas autoensambladas de algunos alcanotioles de cadena larga, así como de la adsorción del ácido 4-mercaptobenzoico (MBA); sobre superficies planas de Ag policristalina, sobre Ag depositada a subpotenciales sobre superficies de Au (Ag-UPD) y sobre AgNPs, junto con su caracterización fisicoquímica a través de diferentes técnicas. Estos estudios resultan de fundamental importancia para comprender la estructura superficial de las MBA-AgNPs, que como se verá en el siguiente capítulo presentan en su superficie caras planas cuya orientación predominante es la {111}. También se presentan cálculos de DFT para explorar los diferentes modelos que interpreten la estructura de las moléculas de MBA adsorbidas en las superficies de Ag.

3.1. Introducción.

Las monocapas autoensambladas (SAMs: *self-assembled monolayers*, en inglés) se forman a partir de la adsorción de sus componentes moleculares presentes en una solución o por deposición desde fase gaseosa, sobre la superficie de un sólido. Los adsorbatos se organizan de forma espontánea (y, a veces epitaxialmente) en las estructuras cristalinas de la superficie del sustrato. Este tipo de estructuras proporcionan un sistema cómodo, flexible y simple con el cual se pueden adaptar las propiedades interfaciales de metales, óxidos metálicos y semiconductores.¹

Las moléculas o ligandos que forman las SAMs tienen una funcionalidad química, o "grupo cabeza", con una alta afinidad por la superficie y es capaz de desplazar a materiales orgánicos adventicios. El tipo de SAMs más ampliamente estudiado corresponde a la adsorción de alcanotioles sobre oro,²⁻⁵ plata,⁶⁻⁸ cobre,⁶ paladio,^{9, 10} platino¹¹ y mercurio.¹² La alta afinidad de los tioles por las superficies de metales nobles hace que sea posible generar superficies orgánicas bien definidas de espesor y funcionalidad controlada, que se pueden modificar de acuerdo a las aplicaciones previstas para ese tipo de SAMs (**Figura 3.1**).^{1, 13, 14} De hecho, la cabeza de azufre une la cadena hidrocarbonada de longitud variable a la superficie metálica a través de enlaces covalentes fuertes. Las fuerzas de van der Waals entre moléculas vecinas estabilizan la estructura. El grupo terminal de la cadena alquílica le confiere las propiedades químicas y físicas deseadas para la monocapa.^{1, 3, 5, 15, 16}

Las SAMs se adaptan perfectamente para estudios de nanociencia y nanotecnología debido a que: (1) son fáciles de preparar, es decir, que no requieren de ultra alto vacío (UHV) u otro equipo especializado (por ejemplo, balanza de Langmuir–Blodgett (LB)) en su preparación, (2) se forman sobre objetos de todos los tamaños y son componentes críticos para estabilizar y adicionar funcionalidades en diferentes objetos a escala nanométrica como por ejemplo, películas delgadas, nanocables, coloides, y otras nanoestructuras, (3) permiten acoplar el ambiente externo a las propiedades

electrónicas (respuestas de corriente-tensión, electroquímicas) y ópticas (índice de refracción local, frecuencia de plasmones superficiales) de las estructuras metálicas, y (4) desde su ordenamiento a nivel molecular modifican fenómenos interfaciales macroscópicos, tales como la humectación, la adhesión, y la fricción.¹

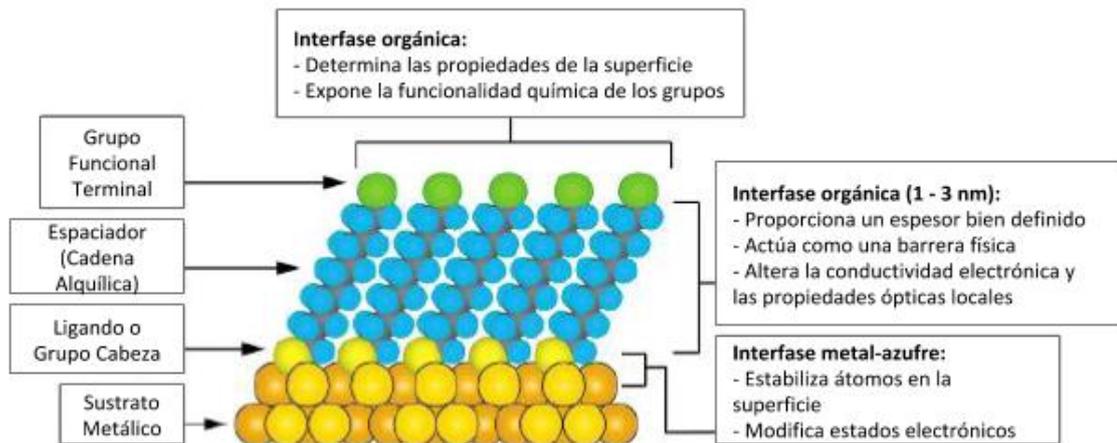


Figura 3.1. Diagrama esquemático de una SAM ideal monocristalina de alcanotioles soportada sobre una superficie que expone planos (111).¹

Las SAMs de tioles sobre Au y Ag han atraído una considerable atención en los últimos 25 años, debido a sus múltiples aplicaciones en nanociencia y nanotecnología.¹⁻⁵ Por una parte se busca comprender el rol de la naturaleza química de la superficie en la estructura y cubrimiento y por otra, controlar estas superficies para sus aplicaciones tecnológicas tales como los sensores. Trabajos previos han propuesto que los tioles se adsorben sobre Ag(111) como especies tiolato, formando una red $(\sqrt{7} \times \sqrt{7})R19.1^\circ$ distorsionada con $\theta \approx 0.44$. Las moléculas se adsorben sobre la superficie en configuración vertical con un ángulo de inclinación α entre $0 - 19^\circ$.^{17, 18} Por otra parte, los datos experimentales de diferentes técnicas indican que la fuerte adsorción del tiol, induce a la reconstrucción de la superficie de Ag(111).¹⁹

El modelo propuesto para el metanotiol (MT) sobre una superficie de Ag(111) reconstruida (R) de acuerdo a los resultados del patrón de difracción

de electrones de baja energía (*LEED: low-energy electron diffraction*, en inglés) y de resultados obtenidos con microscopía de efecto túnel STM, consiste en una capa superficial cuasi hexagonal con una densidad de átomos de Ag que es sólo 3/7 de las capas del sustrato subyacente y con moléculas orgánicas adsorbidas dentro de los sitios huecos de coordinación 3 formando una red $(\sqrt{7} \times \sqrt{7})R19.1^\circ$ con una distancia entre primeros vecinos $d = 0,44 \text{ nm}$.²⁰

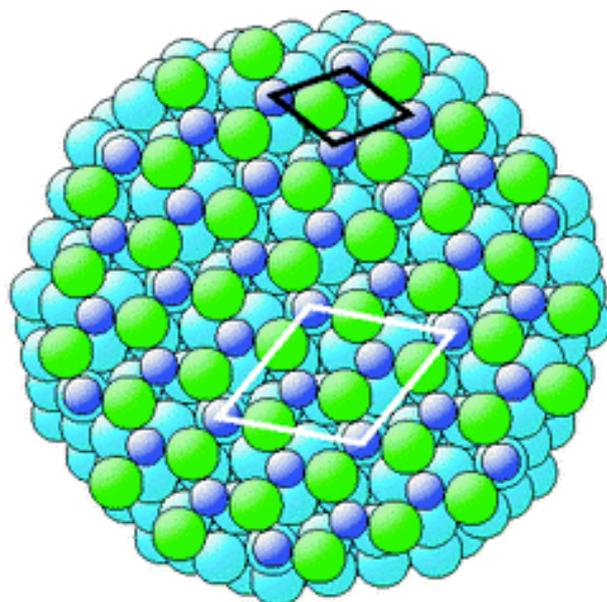


Figura 3.2. Esquema de la estructura de la red de metanotiol adsorbido sobre una superficie de Ag reconstruida. Los átomos de azufre del metanotiol (color azul) forman una red $(\sqrt{7} \times \sqrt{7})R19.1^\circ$ señalada por las líneas blancas). La celda marcada con líneas negras es una subred de la anterior. Los átomos de Ag del volumen (bulk) están coloreados en turquesa y los átomos de Ag de la reconstrucción superficial ($\text{Ag}_{3/7}$) están en color verde ²⁰

Después, se demostró que este modelo no implica una mayor estabilidad termodinámica para el sistema, ya que tiene un valor de energía libre superficial similar a la estimada para la red de MT $(\sqrt{7} \times \sqrt{7})R19.1^\circ$ sobre una superficie no reconstruida (U: *unreconstructed*, en inglés). Este resultado no es inesperado ya que la formación de 4/7 de vacancias de Ag implica un gran costo energético.²¹ Recientemente, una nueva estructura superficial ha sido propuesta para el MT sobre una superficie de Ag(111) con mayor estabilidad, ya que implica una mayor densidad (5/7) de átomos de Ag, es decir, el

número de vacancias (y el costo energético) es menor.²² En este caso el patrón de adsorción consiste en unidades de $\text{Ag}_3(\text{MT})_3$ rodeadas por hexágonos de átomos de Ag. Por otro lado, para alcanotioles más largos que el MT, el mismo modelo con reconstrucción (R) parece ser válido, aunque $d \approx 0.47 \text{ nm}$ debido a la optimización de las interacciones de las cadenas hidrocarbonadas.^{19, 23, 24} Finalmente, se ha reportado que los tioles adsorbidos intactos sobre $\text{Ag}(111)$ ²⁵ expuestos a la radiación UV ²⁶ o a desorción térmica a altas temperaturas²⁵ producen escisión de los enlaces C-S y la formación de superficies de Ag ricas en S.

La química superficial parece ser más compleja en el caso tanto de nanoclusters de Ag (AgNC) como para nanopartículas recubiertas con tiolatos.²⁷ De hecho, la estructura de las AgNPs con un tamaño de 2 nm, preparadas por reducción de un precursor $\text{Ag}(\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{Ph})$ se ha descrito como un modelo de estructura tipo core-shell con un núcleo de 92 átomos de Ag y una coraza protectora encapsulando los átomos de Ag y 60 tiolatos formando una red de anillos de seis miembros que se asemeja con la geometría encontrada en las SAMs de alcanotioles sobre $\text{Ag}(111)$ reconstruida, es decir, se propone una correlación entre la organización del tiol sobre la $\text{Ag}(111)$ y la superficie de AgNC.²⁸ Por otra parte, los cálculos DFT de pequeños clusters $\text{Ag}_m(\text{SCH}_3)_n$ demostraron que los complejos $-\text{RS}-\text{Ag}-\text{RS}-$ (RS = tiolato) podrían ser especies estables sobre la superficie de Ag²⁹ como se observó sobre nanoclusters de Au.³⁰ Una contribución importante recientemente publicada, reveló que los nanoclusters de $\text{Ag}_{44}(\text{MBA})_{30}$ están protegidos por seis unidades de $\text{Ag}_2(\text{MBA})_5$ en las que los cationes de Ag se unen a tres ligandos de tiolato en una configuración planar $\text{Ag}(\text{MBA})_3$.³¹ La presencia de estas especies fue confirmada también por ariltioles fluorados en los mismos clusters.³² Por lo tanto, las partículas menores de 2 nm parecen exhibir estructuras superficiales complejas que no pueden ser fácilmente correlacionadas con los datos experimentales, para arreglos de tioles en superficies planas de $\text{Ag}(111)$. Finalmente, los resultados experimentales para las AgNPs protegidas con dodecanotiol, han sido consistentes con la estructura de core-shell que contiene un núcleo metálico de Ag rodeado por una fase de Ag_2S .³³ Estructuras similares de core-shell se han encontrado para AgNPs

protegidas con tiolato, preparadas por la adsorción de alilmercaptanos.³⁴ Así, en estos casos, los tiolatos parecen insertarse en la superficie de las AgNPs cubiertas con sulfuro; un modelo que se parece mucho a lo descrito con las PdNPs protegidas con tiolato.³⁵ Consecuentemente, la comprensión de la química superficial y la estructura de las AgNPs requieren especial atención no solo desde el punto de vista de ciencia básica sino también por sus múltiples aplicaciones como elementos claves para dispositivos electrónicos^{36, 37} y sistemas activos basados en efecto SERS.³⁸⁻⁴¹

Las SAMs de MBA sobre superficies lisas o nanopartículas de Ag son particularmente atractivas debido tal como otras SAMs de tioles se une mediante el átomo de azufre a la Ag y el grupo carboxílico queda expuesto un grupo carboxilato que dependiendo del pH puede estar neutro o con carga tal como se ve en el siguiente esquema (**Figura 3.3**).

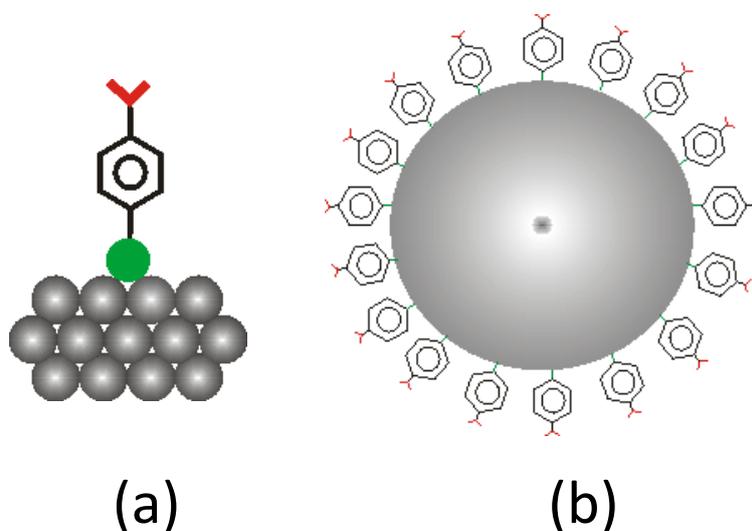


Figura 3.3. Esquema donde se representa la adsorción de MBA sobre (a) superficies lisas y (b) nanopartículas de Ag. En gris se representan los átomos y la nanopartícula de Ag, en verde el grupo terminal de S, en negro el grupo aromático y en rojo el grupo carboxílico.

De hecho, la posibilidad para cambiar la carga del grupo carboxílico controlando el pH de la solución convierte a esta molécula en una ancla eficiente para especies catiónicas.⁴²⁻⁴⁵ La presencia del anillo aromático en la

molécula de MBA favorece los procesos de transporte de electrones y de transferencia de carga, propiedades que son relevantes en los dispositivos electrónicos y electroquímicos basados en plataformas moleculares. Además, tanto las nanopartículas de Au o de Ag recubiertas con MBA son solubles en agua, lo que permite diferentes aplicaciones en sistemas biológicos. En este contexto, un conocimiento detallado de la química superficial y la estructura de las AgNPs protegidas con MBA es fundamental, considerando la eventual formación de un revestimiento de sulfuro de plata sobre el núcleo metálico reportado recientemente para tioles alquílicos autoensamblados sobre superficies de AgNPs.^{33, 34} Por este motivo, para comprender la química superficial de las nanopartículas de Ag que presentan facetas monocristalinas con distintas orientaciones es que en una primera aproximación, se debe estudiar la estructura de las superficies de los planos predominantes en esas nanopartículas.

3.2. Depósito de plata metálica a subpotencial (Ag-UPD).

Debido a su importancia tecnológica y científica, los procesos de depósito de metales sobre superficies sólidas han sido ampliamente estudiados.⁴⁶ Desde hace ya mucho tiempo, en el ámbito electroquímico se ha despertado un enorme interés en el estudio del depósito de metales a subpotencial (UPD: *Under Potential Deposition*, en inglés) sobre un sustrato metálico de naturaleza química diferente. Este interés reside en el conocimiento de la profunda influencia que puede tener la monocapa UPD, sobre los electrodos usados para electrocatálisis, electrosíntesis, celdas de combustible, estudios sobre crecimiento de cristales por métodos electroquímicos, etc. Se ha comprobado que el proceso UPD presenta una oportunidad única para estudiar una amplia variedad de fenómenos superficiales, tales como la adsorción, transferencia de carga, difusión superficial, formación de películas metálicas bidimensionales, etc.⁴⁷

Esta técnica electroquímica de depósito a sub-potencial (UPD), es decir, la electrodeposición de un metal sobre un sustrato de otro metal a potenciales

más positivos respecto al potencial reversible que predice la ecuación de Nernst para el depósito masivo (depósito a sobrepotenciales, OPD: *Over Potential Deposition*, en inglés), se conoce desde hace mucho tiempo⁴⁸ y es uno de los diferentes métodos fisicoquímicos que permiten el depósito de películas metálicas ultradelgadas.⁴⁹ Este tipo de métodos electroquímicos llaman la atención, ya que permiten realizar depósitos metálicos de manera sencilla y controlada.⁵⁰ A través de estas técnicas, es posible electrodepositar exactamente 1 o 2 capas atómicas de un determinado metal sobre otro, aplicando los potenciales apropiados. El proceso UPD ocurre debido a que la interacción adátomo-sustrato es más fuerte que la interacción adátomo-adátomo. El mecanismo del depósito a sub-potenciales se ha estudiado utilizando diferentes técnicas de caracterización de superficies.⁵¹⁻⁵³ Específicamente, el depósito de Ag-UPD sobre Au(111) es considerado un sistema modelo para estudiar procesos UPD, ya que es posible depositar exactamente 1 o 2 capas de Ag sobre Au de acuerdo a la ventana de potenciales seleccionada.⁵⁴⁻⁵⁶

Tal como fue mencionado, las AgNPs exhiben facetas donde las caras predominantes son las de orientación {111}. Es por este motivo que para comprender la adsorción de alcanotioles y azufre sobre las AgNPs resulta particularmente útil el empleo de superficies de Ag depositadas a subpotenciales sobre Au(111) dado que el crecimiento de la Ag es epitaxial respecto a la superficie de Au.^{55, 57}

Con el objetivo de estudiar una superficie plana, tal como lo es la Ag-UPD, y su interacción con algunas moléculas (alcanotioles, MBA, citrato); se construye esta superficie utilizando Au(111) como sustrato, el cual se modifica en algunos casos con diferentes espesores de Ag mediante UPD (1-2 monocapas) o OPD (10 y 100 monocapas), de acuerdo a lo que se requiera analizar. Esto permite generar capas de Ag ultradelgadas, limpias, reutilizables y de espesor controlado utilizando la electrodeposición como una técnica sencilla y accesible a cualquier laboratorio de química.

3.3. Parte Experimental.

3.3.1. Preparación de sustratos de Ag-UPD.

Las superficies planas de Ag-UPD fueron preparadas por electrodeposición de Ag a subpotencial sobre sustratos de Au mediante voltametría cíclica, utilizando una solución acuosa 5×10^{-4} M Ag_2SO_4 + 1 M H_2SO_4 a una velocidad de barrido de $v = 0.01 \text{ V s}^{-1}$ en un alcance de potenciales de 0.030 V – 0.65 V. Se realizaron 3 ciclos completos en ese intervalo de potenciales y se detuvo el potencial a 0.03 V, y manteniendo ese potencial se enjuagó el electrodo para extraerlo de la celda. De esta manera se obtiene una superficie que tiene entre 1 y 2 monocapas de Ag. Los sustratos de Au empleados fueron películas de Au evaporado sobre vidrio. Como estas superficies son policristalinas, se puede obtener la orientación preferencial (111) y terrazas de tamaño adecuado exponiéndolas a la llama de hidrógeno durante unos minutos. La superficie de Ag obtenida por este procedimiento es conmensurada con el sustrato de Au subyacente y por lo cual, se puede nombrar como Ag(1x1)-Au(111) que denominaremos en el resto del texto como Ag-UPD. Estudios electroquímicos y mediante STM previos, han permitido verificar la estructura superficial de la Ag UPD tal como se describió anteriormente.^{53, 58}

Los barridos voltamperométricos para la electrodeposición de Ag-UPD se hicieron en una celda electroquímica convencional de tres electrodos, utilizando una lámina de Pt como contraelectrodo y un alambre de Ag como electrodo de pseudo-referencia. El voltagrama obtenido para estas superficies, se muestra en la **Figura 3.4**.

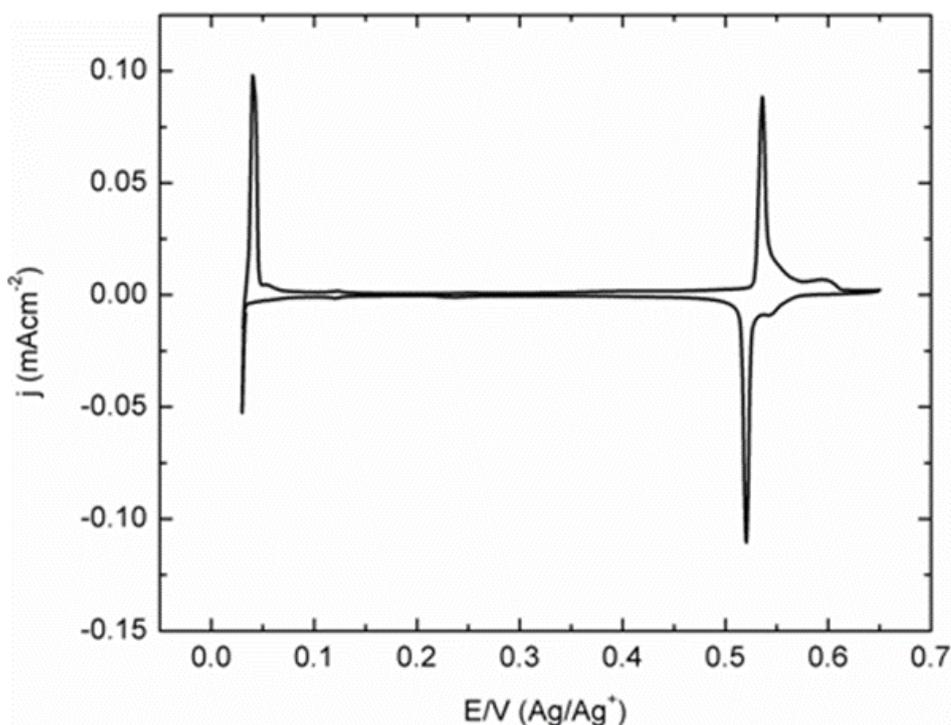


Figura 3.4. Voltagrama de Ag-UPD en el intervalo de potencial $0.03 \text{ V} \leq E \leq 0.65 \text{ V}$.

En el caso de utilizar placas de Ag policristalina ~99.99%, éstas fueron limpiadas con una mezcla 1:1 de H_2O_2 100 vol y solución de amoníaco al 25% (reactivos de grado analítico), durante 3 min. Luego, se lavaron cuidadosamente con agua Milli-Q e inmediatamente se sumergieron en las soluciones conteniendo tioles o sulfuro.

3.3.2. Preparación de SAMs.

Las SAMs de MBA se prepararon sobre los sustratos de Ag-UPD o sobre las placas de Ag metálica por inmersión de los sustratos limpios en una solución de 1mM de MBA+0.1M de NaOH durante 1 h 30 min. El posible efecto del solvente sobre el cubrimiento de las SAMs de MBA se verificó por la realización de un autoensamblado en una solución etanólica 1mM de MBA, durante el mismo tiempo de inmersión. También se comprobó mediante los datos de electrodesorción y de XPS, que mayores tiempos de inmersión (24 h) no modifican el cubrimiento del tiol ni la composición química de la SAM.

Las SAMs de hexanotiol (C6) y hexadecanotiol (C16) se prepararon por incubación de los sustratos de Ag-UPD recién preparados en una solución etanólica 1mM de estos tioles por 24 h. La adsorción del sulfuro se realizó sumergiendo las placas de Ag en soluciones acuosas de sulfuro de sodio 1 mM durante 5 min. Después, los sustratos de Ag cubiertos con tiol o sulfuro se enjuagaron con agua Milli-Q y se introdujeron en una cámara de ultra alto vacío (UHV) para el análisis por espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS) o bien en una celda de vidrio convencional que contiene una solución de NaOH 0.1 M para la caracterización electroquímica.

3.3.3. Espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS).

La espectroscopia de fotoelectrones de rayos X se realizó usando una fuente de Mg K α (XR50, SpecsGmbH) y un analizador hemiesférico de energías electrónicas (PHOIBOS 100, SpecsGmbH). Se realizó una calibración de dos puntos de la escala de energía, utilizando oro (región del Au 4f $_{7/2}$, con una energía de ligadura (BE: *Binding Energy*, en inglés) de 84.00 eV) y muestras de cobre (Cu 2p $_{3/2}$, BE: 932.67 eV).

El análisis de los espectros XPS de alta resolución se realizó mediante el programa XPSPEAK 4.1. Para la deconvolución de los espectros de la región del S2p y de la Ag3d, se restó una línea de base de tipo Shirley,⁵⁹ y para el ajuste de señales XPS se usó una combinación de las funciones Lorentzianas y Gaussianas. En el caso del espectro en la región S2p, el ancho a media altura del máximo (*fwhm: full width at half maximum*, en inglés) se fijó a 1.1 eV. Los dobletes S2p $_{3/2}$ -S2p $_{1/2}$ y Ag3d $_{5/2}$ -Ag3d $_{3/2}$ se ajustaron usando el mismo *fwhm* para los dos componentes spin-orbital de la misma señal, con un SOS (Spin Orbit Splitting) de 1.2 eV para S2p y 6.0 eV para Ag3d y relaciones de ramificación S2p $_{3/2}$ /S2p $_{1/2}$ = 2 y Ag3d $_{5/2}$ /Ag3d $_{3/2}$ = 3/2, respectivamente. Las energías de ligadura y las áreas de los picos se optimizaron para lograr el mejor ajuste.

3.3.4. Experimentos de electrodesorción de tioles.

La voltamperometría de barrido lineal se realizó con un potenciostato con adquisición de datos digitales (TEQ, Argentina) o en Autolab (PGSTAT128N). Los sustratos MBA–Ag–UPD (electrodo de trabajo) se montaron en una celda de vidrio convencional de tres electrodos, utilizando una placa de Pt como contraelectrodo y un electrodo de calomel saturado (SCE) como electrodo de referencia, respectivamente. Las soluciones acuosas fueron preparadas utilizando H₂O proveniente de un sistema de purificación Milli-Q la cual fue desoxigenada mediante burbujeo de nitrógeno.

La electrodesorción reductiva de los diferentes tioles empleados se realizó por un barrido de potencial a 0.05 V s⁻¹ desde -0.3 a -1.6 V en una solución acuosa 0.1 M de NaOH a temperatura ambiente. En cada caso, la densidad de carga (q) involucrada en la desorción reductiva se calculó mediante la integración del área de pico de corriente y tomando en cuenta el área real del electrodo estimada con el pico de reducción sustrato de oro sabiendo que es de 440 $\mu\text{C cm}^{-2}$. La densidad de carga se tomó como un indicador del cubrimiento de la superficie de la SAM.⁶⁰

3.3.5. Estudios mediante cálculos teóricos empleando la teoría funcional de la densidad (DFT).

Con el objetivo de estudiar la estabilidad de las estructuras de los adsorbatos sobre las superficies de Ag, se realizaron cálculos de DFT empleando un código VASP 5.2.12 programado con una onda plana periódica.^{61, 62} Se adoptó el esquema de funcionales no locales propuestas por Dion et al.,⁶³ y la optimización de los intercambios Becke88 optB88-vdW⁶⁴ para tener en cuenta en las interacciones de van der Waals (vdW). Las funciones de onda electrónicas fueron descritas como una expansión en una base de ondas planas con una energía de corte (*cut off*) de 450 eV. La representación de los núcleos atómicos se realizó a través del método de PAW (*projector augmented wave*), basado en el método Blöchl.⁶⁵ Las superficies de plata se

representaron mediante un bloque de 5 capas atómicas con $\sim 12 \text{ \AA}$ de vacío (*slabs*). El muestreo de la zona de Brillouin fue realizado de acuerdo al esquema Monkhorst-Pack⁶⁶ con una grilla de puntos k de $9 \times 4 \times 1$ y $7 \times 7 \times 1$ para la integración numérica en el espacio recíproco de estructuras de superficie con redes de $(\sqrt{3} \times 4)$ y $(\sqrt{7} \times \sqrt{7})R19.1^\circ$, respectivamente.

La relajación de la superficie está permitida en las tres capas de Ag superiores del bloque. Las especies radicales de MBA se optimizaron en un caja asimétrica de $10 \text{ \AA} \times 12 \text{ \AA} \times 14 \text{ \AA}$. La constante de red calculada es de 4.14 \AA , que se compara razonablemente con el valor experimental (4.09 \AA).⁶⁷

La energía promedio de enlace por radical MBA* adsorbido, que resulta cuando el MBA pierde el átomo de hidrógeno del grupo S-H en la superficie de la Ag (111), E_b , está definida en la **Ecuación 3.1**:

$$E_b = \frac{1}{N_{MBA^*}} [E^{MBA^*/Ag} - E_{Ag(111)}^R - N_{MBA^*} E_{MBA^*}] \quad (3.1)$$

Donde $E^{MBA^*/Ag}$, $E_{Ag(111)}^R$, y E_{MBA^*} corresponden a la energía total del sistema adsorbato-sustrato, a la energía del bloque (*slab*) de Ag cuando las especies MBA* son removidas, y la energía del radical MBA*, respectivamente; mientras que N_{MBA^*} es el número de radicales MBA* en la superficie de la celda unidad. Un número negativo indica que la adsorción es exotérmica con respecto a la superficie limpia y al radical MBA*.

Las cargas en los distintos elementos de los sistemas estudiados fueron calculadas mediante el método de análisis de Bader, utilizado para determinar la carga asociada a cada átomo en una molécula o un sólido. El método de Bader descompone la densidad de carga electrónica del sistema en contribuciones individuales de cada átomo que compone el sistema.⁶⁸ Valores positivos indican pérdida de electrones y valores negativos indican ganancia de electrones. Esta densidad puede ser obtenida siguiendo el gradiente en un punto particular del espacio para hallar un valor máximo de la densidad de carga centrado en un átomo. Bader⁶⁸ define la carga atómica q como la

carga nuclear del átomo (Z_k) menos el número de electrones contenidos en el volumen Ω_p , según la **Ecuación 3.2**:

$$q = Z_k - \int_{\Omega_p} \rho(r) dr \quad (3.2)$$

3.4. Caracterización de las superficies planas.

3.4.1. Caracterización por XPS.

En la **Figura 3.5a, b** se muestran espectros típicos de XPS de alta resolución de la región S2p para SAMs de MBA adsorbidas sobre Ag-UPD y adsorbidas sobre una placa de Ag policristalina y que fueron formadas por inmersión durante $t = 1\text{ h } 30\text{ min}$ en soluciones acuosas 1mM MBA + 0.1M de NaOH.

La región S2p del espectro para los sustratos de Ag-UPD y para la placa de Ag se pueden ajustar con una componente principal S 2p_{3/2} a BE $\approx 162\text{ eV}$, la cual fue asignada a la formación de un enlace tiolato-Ag (**Figura 3.5a**, curva en turquesa). En algunos casos fue encontrada una componente de menor intensidad a $\approx 163\text{ eV}$ (<10%) la cual puede ser asignada a moléculas fisisorbidas de MBA (**Figura 3.5a**, curva en trazo fucsia). Resultados similares fueron obtenidos para 1-hexanotiol (**Figura 3.5c**) y para 1-hexadecanotiol (**Figura 3.6**) autoensamblados sobre una superficie de Ag-UPD. Se excluyó la formación de sulfuros adsorbidos sobre las SAMs de MBA, C6 y C16, en el caso de que estuviera presente, ya que ellos originan un pico S2p a 161.4 eV como se muestra en la **Figura 3.5d**. Estos resultados son consistentes con la formación de una SAM de moléculas intactas de tiol adsorbidas a la superficie de Ag por formación de fuertes enlaces tiolato-Ag.

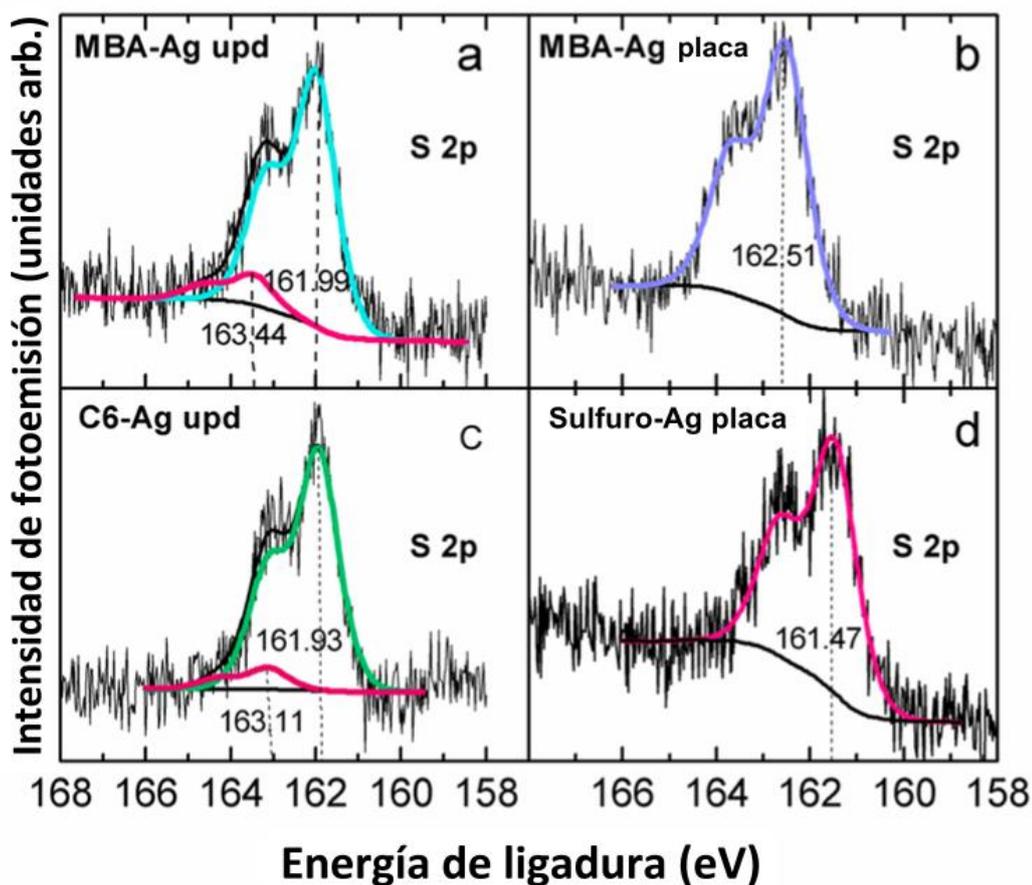


Figura 3.5. (a) Espectro XPS de MBA adsorbido sobre Ag-UPD. (b) Espectro XPS de MBA adsorbido sobre una placa de Ag. La SAM fue obtenida por inmersión en una solución acuosa de NaOH 0.1 M durante 1 h 30 min. (c) Espectro XPS de 1-hexanotiol (C6) adsorbido sobre Ag-UPD. La SAM fue obtenida por inmersión en una solución etanólica durante 24 h. (d) Espectro XPS de sulfuro adsorbido sobre una placa de Ag. El S adsorbido fue obtenido por inmersión en una solución acuosa 1 mM de Na₂S durante 5 min.

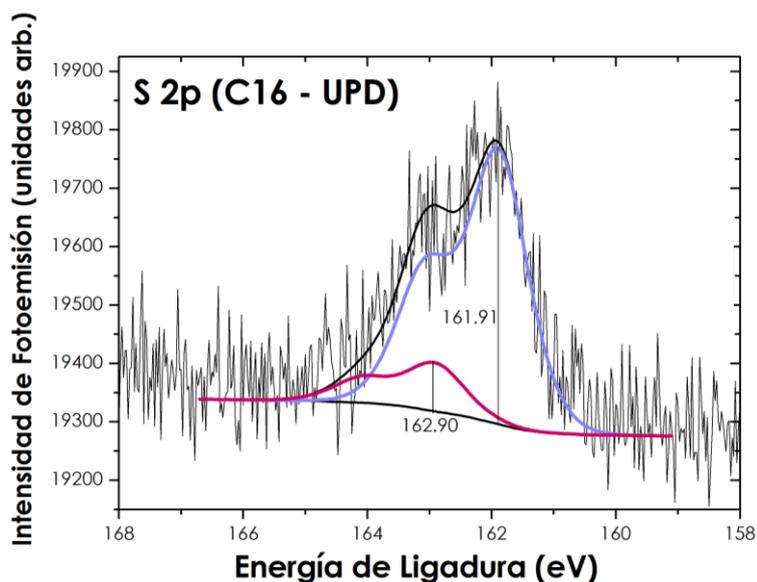


Figura 3.6. Espectro XPS de 1-hexadecanotiol (C16) adsorbido sobre Ag-UPD. La SAM fue obtenida por inmersión en una solución etanólica de C16 durante 24 h.

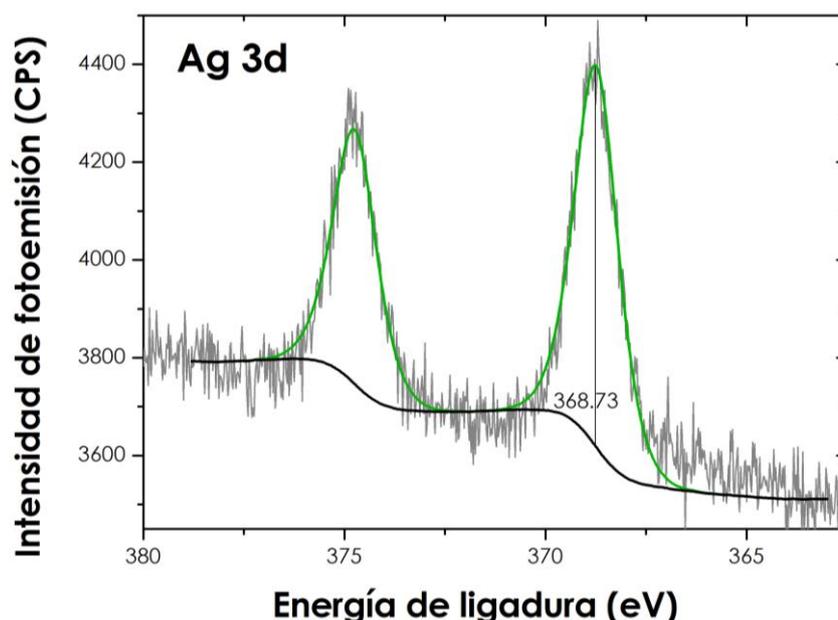


Figura 3.7. Espectro XPS de la región Ag3d.

La información obtenida mediante los espectros XPS permite estimar el cubrimiento del MBA sobre una superficie de Ag-UPD mediante la relación de áreas (que denominaremos relación atómica (r)) de la señal a 162 eV S2p (tiolato) y la señal correspondiente a la región Ag3d (**Figura 3.7**).

En el caso del hexanotiol (C6) y el hexadecanotiol (C16) esa relación es $r = 0.30$ – 0.31 mientras que para el MBA $r = 0.22$. Considerando que esos valores de r guardan la misma relación que los cubrimientos, entonces si para los alcanotioles (C6 y C16) el cubrimiento informado en publicaciones previas es $\theta \approx 0.44$,^{55, 57} resulta que el cubrimiento para la superficie cubierta por el MBA podría estimarse como $\theta \approx 0.3$. Estos resultados indican que el MBA forma una red más diluida que los alcanotioles sobre una superficie Ag(111).

3.4.2. Datos de electrodesorción de tioles.

La desorción electroquímica se llevó a cabo mediante el barrido de potencial desde un valor inicial donde la capa quimisorbida es estable hasta los potenciales donde los adsorbatos son removidos desde la superficie de Ag-

UPD. La **Figura 3.8a, b** muestra una gráfica típica de densidad de corriente (j) vs potencial (E) adquirida en solución acuosa 0.1M de NaOH después de la formación de la SAM de MBA en etanol (**Figura 3.8a**) y en solución acuosa 0.1M de NaOH (**Figura 3.8b**) sobre una Ag-UPD durante 1 h 30 min. La presencia de un pico bien definido localizado a $E_p = -1.1$ V en los perfiles de j vs E pueden asignarse sin ambigüedad a la desorción de las especies de MBA adsorbidas en la superficie de Ag-UPD, independientemente del solvente utilizado en las soluciones con las cuales se realizó el autoensamblado.

Por otro lado, la electrodesorción de SAMs de C6 y de C16 formadas sobre Ag-UPD se muestra en la **Figura 3.8c, d**. Los potenciales a los cuales estos procesos ocurren, tienen lugar a potenciales más negativos que para las SAMs de MBA de acuerdo a las mayores fuerzas de van der Waals entre las cadenas alquílicas y a su poca solubilidad en la solución acuosa donde ocurren los procesos de electrodesorción.⁶⁹

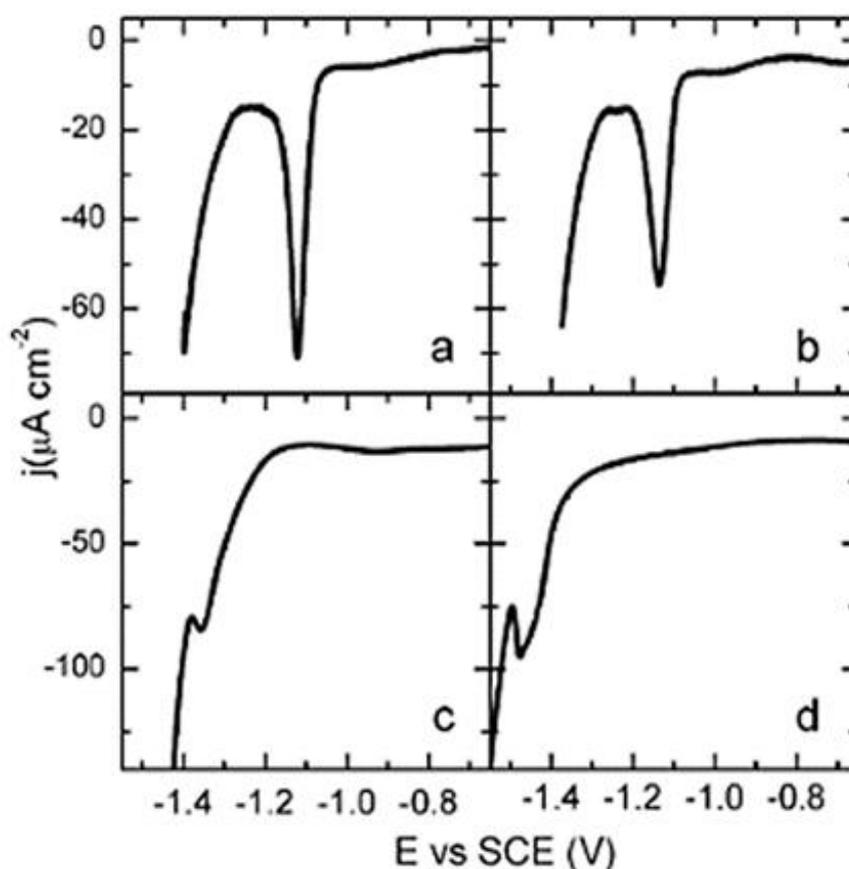
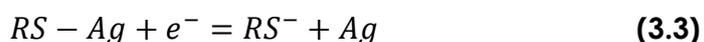


Figura 3.8. Electrodesorción de SAMs de MBA desde Ag-UPD en NaOH 0.1 M. Las SAMs se obtuvieron por inmersión en una solución acuosa 1 mM de MBA + 0.1 M NaOH durante 1 h 30 min (a) ,en soluciones etanólicas 1 mM de MBA durante 1 h 30 min (b), 1 mM de hexanotiol en etanol durante 24 h (c) y 1 mM de hexadecanotiol en etanol (d), durante 24 h.

La densidad de carga (q) obtenida a partir de estas curvas de desorción permite la estimación del cubrimiento del tiol en la superficie. En el caso del MBA se encontró que $q = 55 \pm 7 \mu\text{C cm}^{-2}$ independientemente del tiempo de inmersión durante el proceso de autoensamblado. Por otra parte, la estimación del cubrimiento de la superficie para las SAMs de C6 y C16 es más difícil, debido a la superposición parcial con la reacción de desprendimiento de hidrógeno (**Figura 3.8 c, d**). Sin embargo, después de la deconvolución de estos picos respecto de la reacción de desprendimiento de hidrógeno resulta una carga estimada de $q \approx 100 \mu\text{C cm}^{-2}$. Este valor es consistente con la presencia de una monocapa densa en una red $(\sqrt{7} \times \sqrt{7})R19.1^\circ$ (cubrimiento de la superficie $\theta = 0.44$) y a la reacción de desorción (**Ecuación 3.3**):



Por lo tanto, el valor de $q = 55 \pm 7 \mu\text{C cm}^{-2}$ no puede ser asignado a una monocapa de MBA en una red $(\sqrt{7} \times \sqrt{7})R19.1^\circ$ tal como la encontrada para los alcanotioles sobre Ag(111). Teniendo en cuenta los valores de q reportados para los alcanotioles y para el MBA, surge entonces que para el MBA el cubrimiento es $\theta \approx 0.25 \pm 0.03$, es decir, cercano a un valor de $\theta \approx 0.3$ estimado por los datos de XPS (figura 3.4.a). El valor obtenido de las medidas electroquímicas $\theta \approx 0.25$, es el esperado para una red $(\sqrt{3} \times 4)$ tal como fue encontrado en experimentos con STM para MBA sobre Au(111).⁷⁰ Los experimentos realizados con tiempos largos de inmersión (12 h – 24 h) no modificaron los resultados electroquímicos; es decir, el cubrimiento de la superficie MBA sobre Ag-UPD se mantiene constante al menos en el intervalo de tiempos de autoensamblado de nuestros experimentos.

3.4.3. Resultados de DFT.

Se emplearon cálculos de DFT para explorar las características energéticas y estructurales de diferentes modelos de adsorción del MBA sobre Ag(111) y Ag(100), siendo estos planos los que predominan según los datos

HRTEM en las AgNPs (Capítulo 4). Siguiendo trabajos previos de Pensa *et.al.*,⁷⁰ acerca de SAMs de MBA sobre Au(111), se realizó un primer estudio de la adsorción de MBA sobre la superficie de Ag(111) no reconstruida (U) modelada por una celda unitaria de $(\sqrt{3} \times 4)$ con dos radicales MBA orientados a lo largo de las direcciones $[1\bar{1}2]$ y $[\bar{1}21]$, con $\theta_{MBA} = 0.25$. La estructura de la superficie optimizada se muestra en la **Figura 3.9a**.

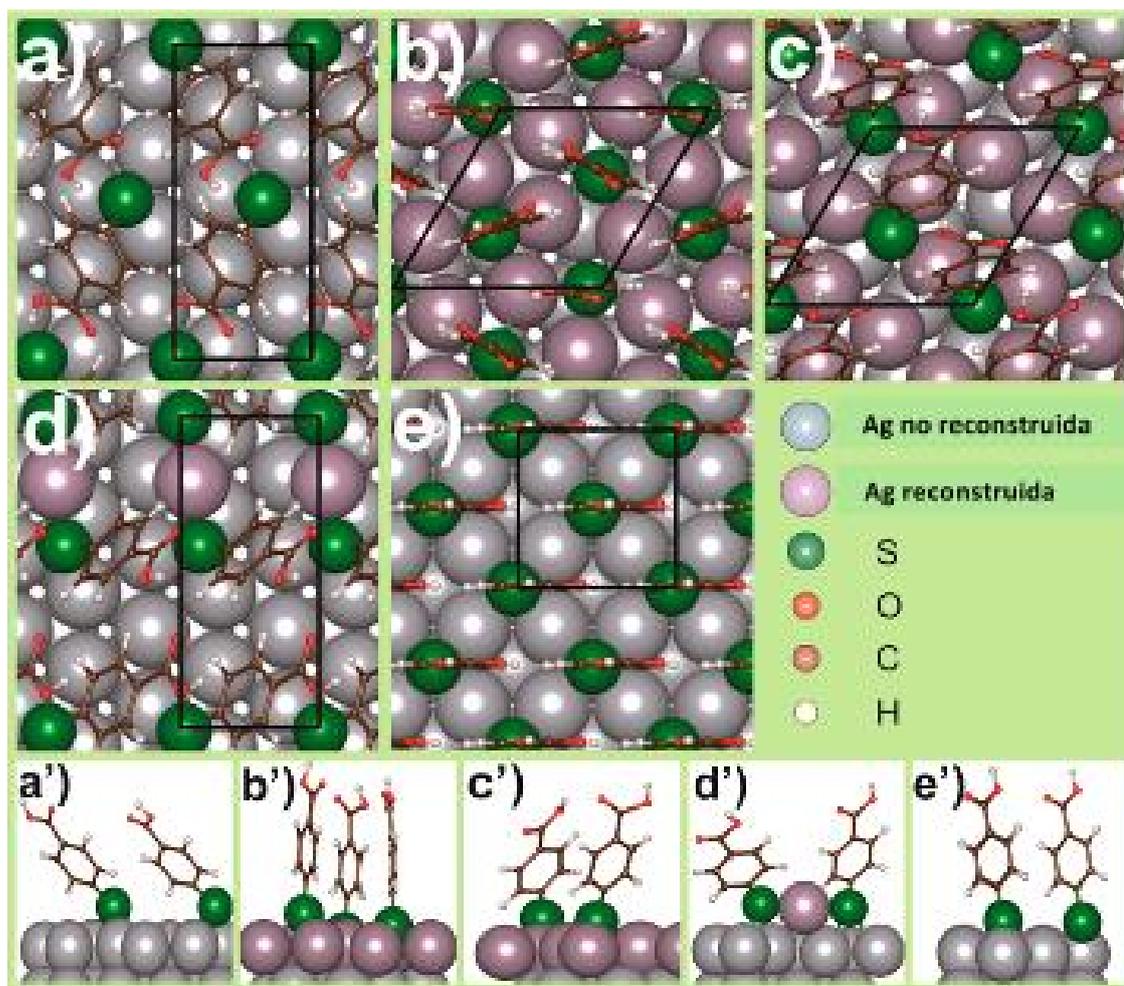


Figura 3.9. Estructuras optimizadas de MBA* sobre superficies metálicas de Ag (111) y Ag (100): (a) $(\sqrt{3} \times 4)$, (b) $(R7_{3/7})$, (c) $(R7_{2/7})$, (d) $(\sqrt{3} \times 4)$ con especies RS–Ag–RS, y (e) $c(2 \times 2)$. Las celdas por unidad de superficie se indican con una línea negra. a', b', c', d' y e' corresponden a las vistas laterales de los modelos de superficie mostrados en a, b, c, d y e, respectivamente.

Los lugares preferenciales de adsorción para este modelo involucran especies radicales MBA* en una configuración vertical con los átomos de S ubicados ya sea en el hueco del puente-fcc (*face centered cubic*) o sitios

huecos del puente-hcp (*hexagonal close packed*). Los ejes moleculares del MBA* adsorbido está inclinado a 47.3° (puente-hcp) y a 44.2° (puente-fcc) con respecto a la dirección normal a la superficie (**Figura 3.9a'**). Las distancias entre los radicales vecinos más cercanos de MBA son 0.51 y 0.60–0.65 nm. Los intentos realizados para optimizar esta estructura superficial disminuyendo el ángulo de inclinación resultaron en bajas energías de enlace, sugiriendo que son importantes las interacciones atractivas entre el anillo aromático y la superficie de Ag para este arreglo molecular.

La segunda estructura superficial (**Figura 3.9b**) estudiada, consiste en una red de MBA* ($\sqrt{7} \times \sqrt{7}$)R19.1° sobre una superficie reconstruida(R) de Ag(111) con 5/7 de átomos de Ag en la capa más externa (reconstruida) y un $\theta_{\text{MBA}} = 3/7(\text{R}_{7/3/7})$ que ya ha sido propuesta para una superficie de Ag(111) cubierta por tiol²² y para nanoclusters.⁷¹ En este modelo los tres MBA* se adsorben en los sitios puente entre los átomos de Ag con una configuración vertical y los ejes moleculares están inclinados a 3.6°–6.6° respecto de la normal a la superficie (**Figura 3.9b'**). La distancia calculada entre dos átomos de azufre vecinos es de 0.42–0.47 nm. También se analizó la misma estructura superficial ($\sqrt{7} \times \sqrt{7}$)R19.1° pero en este caso con $\theta_{\text{MBA}} = 2/7(\text{R}_{7/2/7})$ (**Figura 3.9c**), ya que es un valor más cercano al cubrimiento experimental con $\theta_{\text{MBA}} = 0.25\text{-}0.30$. En este modelo ambos MBA* están adsorbidos en configuración puente entre los átomos superficiales de Ag. Las especies de MBA* están ubicadas en una configuración vertical con un eje molecular inclinado a 22.8° de la normal, implicando una coordinación con dos átomos de Ag (2–Ag–MBA*) y de 40° respecto de la normal a la superficie y con coordinación 3 (3–Ag–MBA*) (**Figura 3.9c'**). Las distancias calculadas entre los radicales vecinos más cercanos de MBA son de 0.41 y 0.53 nm. También se probaron varios sitios de adsorción del MBA* para ambos modelos de R_{7/3/7} y R_{7/2/7}, y los datos que se presentan son los más estables para ambas configuraciones. También se consideró una red ($\sqrt{3} \times 4$) pero formada por complejos RS–Ag–RS siguiendo el modelo para los tiolatos en una superficie de Au(111)^{30, 72, 73} (**Figura 3.9d**). Se observó que el adátomo de Ag en la estructura optimizada se sitúa en el lugar del hueco hcp en lugar de los sitios puente observados para las especies RS–Au–RS sobre una superficie de Au(111). Así, los átomos de S están también

enlazados a los átomos de Ag en los sitios puente de la superficie de Ag. El ángulo S–Ag–S en el “staple” (estructura donde un átomo de Ag enlaza a dos terminales de S) es de 176°. Por otro lado, los ángulos de inclinación de las especies MBA* en el “staple” son de 53.8° y 33.6°, respectivamente (**Figura 3.9d'**).

Por último, los radicales de MBA* se adsorben sobre una superficie de Ag(100) formando una celda unitaria $c(2 \times 2)$ con dos especies de MBA* por celda y un cubrimiento $\theta_{MBA} = 1/2$ (**Figura 3.9e**). Este modelo también es importante ya que en las AgNPs con tamaños mayores de 5 nm, además de las caras de orientación (111) también hay caras de orientación (100).⁷⁴ En este caso los sitios más estables para el MBA* son los huecos y el ángulo de inclinación es $\approx 0^\circ$ (**Figura 3.9e'**).

Un resumen de los parámetros estructurales y energéticos obtenidos para las configuraciones optimizadas para los modelos mostrados en la **Figura 3.9** se presenta en la **Tabla 3.1**.

Red superficial	$(\sqrt{3} \times 4)$	$(\sqrt{3} \times 4)$	$(\sqrt{7} \times \sqrt{7})R19.1^\circ$	$(\sqrt{7} \times \sqrt{7})R19.1^\circ$	$c(2 \times 2)$
Superficie metálica	Ag(111) U	Ag(111) R	Ag(111) R	Ag(111) R	Ag(100) U
θ_{MBA}	1/4	1/4	2/7	3/7	1/2
E_b/eV	-2.73	-2.99	-3.29	-2.59	-2.66
$E_{rec}/N_{tiol}/eV$	0.0	+0.34	+0.76	+0.52	0.0
$E_b+E_{rec}/N_{tiol}/eV$	-2.73	-2.65	-2.53	-2.07	-2.66
$q(S)/e$	-0.30	-0.28	-0.29	-0.30	-0.34
$q(Ag)/e$	+0.07	+0.31 ^a , +0.03	+0.14	+0.22	+0.17

^a adátomo de Ag

Tabla 3.1. Energía, cubrimiento, y carga de Bader para los cálculos de DFT de la adsorción del MBA sobre Ag (111) (Reconstruida (R) y No Reconstruida (U)) y Ag (100).

Estos datos revelan que el valor de E_b de mayor estabilidad (-3.29 eV) se obtiene para el modelo $R7_{2/7}$. También se observó que la energía del proceso de adsorción es menos favorable con el aumento del cubrimiento de la superficie con el MBA* al pasar de $R7_{2/7}$ a $R7_{3/7}$.

Un análisis de la carga de Bader de la configuración optimizada se presenta también en la **Tabla 3.1**. La transferencia de carga de la superficie de Ag a las especies de MBA* resulta en átomos de S cargados negativamente en las especies de MBA* y átomos de Ag cargados positivamente. El análisis de la carga de Bader también indica que el enlace tiolato Ag-S es más iónico que el enlace S-Au en las SAMs de MBA sobre Au(111).⁷⁰

Los resultados también indican la estabilidad del adsorbato MBA* en términos de balance entre la energía de enlace (E_b) sumada a la energía para reconstruir la superficie de Ag (E_{rec}) dada por $(E_b + E_{rec}/N_{MBA*})$ según la **Ecuación 3.4**:

$$E_{rec} = E_{Ag(111)}^R - (E_{Ag(111)}^U - n_{vac}E_{bulk}^{Ag}) \quad (3.4)$$

Donde $E_{Ag(111)}^R$ y $E_{Ag(111)}^U$ corresponden a la energía de la superficie reconstruida y no reconstruida de Ag(111), respectivamente; E_{bulk}^{Ag} es la energía total del átomo de Ag en el seno del material (*bulk*), y n_{vac} es el número de vacancias de Ag en la superficie de la celda unidad. Los datos en la **Tabla 3.1** muestran que el modelo $(\sqrt{3} \times 4)$ sobre una superficie no reconstruida presenta la mayor estabilidad ya que no involucra ningún gasto energético de formación de vacancias de Ag sobre la superficie de Ag(111). En contraste, la red $(\sqrt{3} \times 4)$ consistente en especies RS-Ag-RS (**Figura 3.9d**) es menos estable (**Tabla 3.1**) debido a la energía necesaria para extraer el adátomo de Ag desde la superficie de Ag(111). También es interesante remarcar la alta estabilidad de la SAM de MBA sobre superficies de Ag(100).

Además, se analizó la posibilidad de una transición de la red diluida $(\sqrt{3} \times 4)$ del MBA a las superficies más densas $R7_{3/7}$ y $R7_{2/7}$ ya propuestas para SAMs de alcanotioles sobre Ag(111)^{20, 22} empleando la energía libre de Gibbs

de adsorción ($\gamma(\Delta\mu)$) que se define como una función del potencial químico ($\Delta\mu_{MBA^*}$), donde $E_b^{(MBA)_2}$ representa la energía de enlace por MBA^* calculado con respecto a la energía total de la especie $(MBA)_2$ en fase gaseosa, A es el área de la superficie de la celda unidad, y γ_{clean}^U es la energía libre de Gibbs de la superficie de $Ag(111)$ no reconstruida, como se indica a continuación (**Ecuación 3.5**):

$$\gamma(\Delta\mu_{MBA^*}) \approx \frac{1}{A} \left[E^{MBA^*/Ag} - N_{Ag} E_{Ag}^{bulk} - N_{MBA^*} \Delta\mu_{MBA^*} \right] - \gamma_{clean}^U \quad (3.5)$$

$$\approx \frac{N_{MBA^*}}{A} \left[E_b^{(MBA)_2} + \frac{E_{rec}}{N_{MBA^*}} \right] + \gamma_{clean}^U - \frac{N_{MBA^*}}{A} \Delta\mu_{MBA^*}$$

El diagrama de fases (**Figura 3.10**) claramente muestra que para $\Delta\mu_{MBA^*} > -1.5 \text{ eV}$ la red diluída ($\sqrt{3} \times 4$) es más estable termodinámicamente que la superficie limpia de $Ag(111)$. Además, los resultados muestran que la red ($\sqrt{3} \times 4$) es más estable que las redes $R7_{2/7}$ y $R7_{3/7}$ en todo el alcance de potenciales químicos ($\Delta\mu_{MBA^*}$) que se muestran en el diagrama de fases de la **Figura 3.10**.

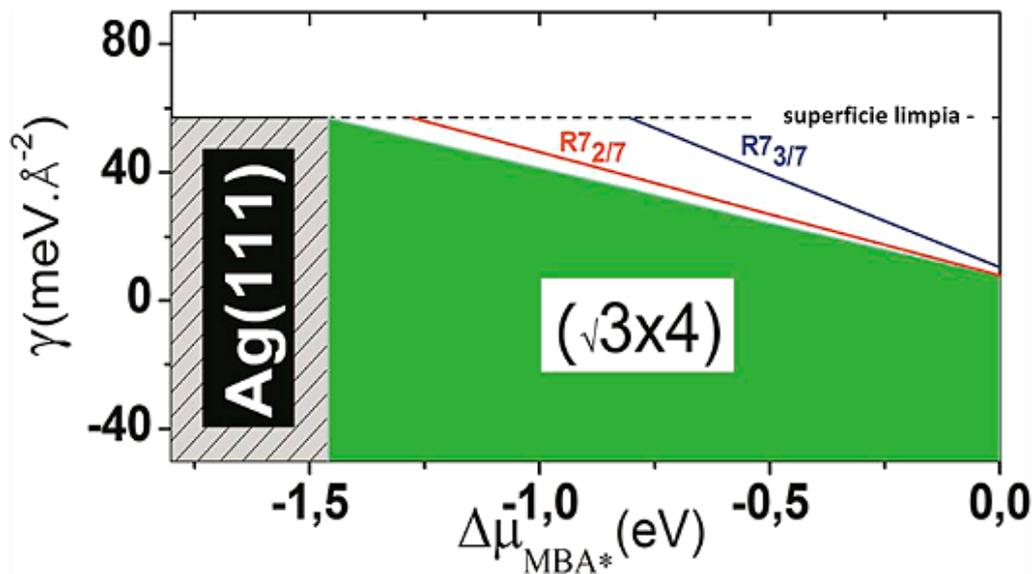


Figura 3.10. Gráficas de γ vs $\Delta\mu_{MBA^*}$ para las redes ($\sqrt{3} \times 4$), ($R7_{2/7}$), y ($R7_{3/7}$).

CONCLUSIONES

- ✓ En este capítulo se realizó un estudio de la adsorción de MBA sobre superficies lisas de Ag UPD con orientación preferencial (111) con el fin de comprender la química y estructura superficial de las nanopartículas de Ag recubiertas con MBA en donde como se verá en el próximo capítulo hay una predominancia de esta orientación cristalina en las facetas que constituyen la estructura externa de esas NPs.
- ✓ Los resultados XPS demuestran que el MBA se adsorbe intacto como tiolato sobre la superficie de Ag-UPD, sin la formación de sulfuro de plata.
- ✓ Los resultados electroquímicos y de XPS muestran que el MBA forma una estructura superficial diluida y estable sobre las superficies de orientación (111) de Ag, con un cubrimiento superficial de $\theta \cong 0.25$ que es más pequeño que el valor de $\theta \cong 0.44$ encontrado para los alcanotioles.
- ✓ Los cálculos de DFT permiten predecir que la red diluida ($\sqrt{3} \times 4$) sobre Ag(111) sin reconstruir es más estable termodinámicamente que las redes $R7_{2/7}$ y $R7_{3/7}$ en todo el alcance de potenciales químicos del diagrama de fases.
- ✓ Los cálculos de DFT sugieren mayor cubrimiento del tiol y superficies de Ag sin reconstruir después de la adsorción del tiol sobre las caras tipo (100) de Ag lo cual tiene implicancias en el cubrimiento de MBA sobre AgNPs de diámetros mayores que 5 nm donde existe mayor contribución de esos planos cristalinos.

Referencias Bibliográficas

- [1] Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M., Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chemical reviews* **2005**, *105* (4), 1103-1170.
- [2] Vericat, C.; Vela, M.; Benitez, G.; Carro, P.; Salvarezza, R., Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39* (5), 1805-1834.
- [3] Gates, B. D.; Xu, Q.; Stewart, M.; Ryan, D.; Willson, C. G.; Whitesides, G. M., New Approaches to Nanofabrication: Molding, Printing, and Other Techniques. *Chemical Reviews* **2005**, *105* (4), 1171-1196.
- [4] Kind, M.; Wöll, C., Organic Surfaces Exposed by Self-Assembled Organothiol Monolayers: Preparation, Characterization, and Application. *Progress in Surface Science* **2009**, *84* (7-8), 230-278.
- [5] Vericat, C.; Vela, M. E.; Salvarezza, R. C., Self-Assembled Monolayers of Alkanethiols on Au(111): Surface Structures, Defects and Dynamics. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2005**, *7* (18), 3258-3268.
- [6] Laibinis, P. E.; Whitesides, G. M.; Allara, D. L.; Tao, Y. T.; Parikh, A. N.; Nuzzo, R. G., Comparison of the structures and wetting properties of self-assembled monolayers of n-alkanethiols on the coinage metal surfaces, copper, silver, and gold. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113* (19), 7152-7167.
- [7] Walczak, M. M.; Chung, C.; Stole, S. M.; Widrig, C. A.; Porter, M. D., Structure and interfacial properties of spontaneously adsorbed n-alkanethiolate monolayers on evaporated silver surfaces. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113* (7), 2370-2378.
- [8] Fenter, P.; Eisenberger, P.; Li, J.; Camillone III, N.; Bernasek, S.; Scoles, G.; Ramanarayanan, T.; Liang, K., Structure of octadecyl thiol self-assembled on the silver (111) surface: an incommensurate monolayer. *Langmuir* **1991**, *7* (10), 2013-2016.
- [9] Love, J. C.; Wolfe, D. B.; Haasch, R.; Chabinyc, M. L.; Paul, K. E.; Whitesides, G. M.; Nuzzo, R. G., Formation and structure of self-assembled monolayers of alkanethiolates on palladium. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (9), 2597-2609.
- [10] Carvalho, A.; Geissler, M.; Schmid, H.; Michel, B.; Delamarque, E., Self-assembled monolayers of eicosanethiol on palladium and their use in microcontact printing. *Langmuir* **2002**, *18* (6), 2406-2412.
- [11] Li, Z.; Chang, S.-C.; Williams, R. S., Self-assembly of alkanethiol molecules onto platinum and platinum oxide surfaces. *Langmuir* **2003**, *19* (17), 6744-6749.
- [12] Muskal, N.; Turyan, I.; Mandler, D., Self-assembled monolayers on mercury surfaces. *Journal of electroanalytical chemistry* **1996**, *409* (1), 131-136.
- [13] Bain, C. D.; Evall, J.; Whitesides, G. M., Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: variation in the head group, tail group, and solvent. *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111* (18), 7155-7164.
- [14] Laibinis, P. E.; Whitesides, G. M., . omega.-Terminated alkanethiolate monolayers on surfaces of copper, silver, and gold have similar wettabilities. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114* (6), 1990-1995.
- [15] Ulman, A., Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chemical reviews* **1996**, *96* (4), 1533-1554.
- [16] Schreiber, F., Structure and growth of self-assembling monolayers. *Progress in Surface Science* **2000**, *65* (5), 151-257.
- [17] Laibinis, P. E.; Whitesides, G. M.; Allara, D. L.; Tao, Y. T.; Parikh, A. N.; Nuzzo, R. G., Comparison of the Structures and Wetting Properties of Self-assembled Monolayers of n-Alkanethiols on the Coinage Metal Surfaces, Copper, Silver and Gold. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (19), 7152-7167.
- [18] Rong, H. T.; Frey, S.; Yang, Y. J.; Zharnikov, M.; Buck, M.; Wühn, M.; Wöll, C.; Helmchen, G., On the Importance of the Headgroup Substrate Bond in Thiol Monolayers: A Study of Biphenyl-based Thiols on Gold and Silver. *Langmuir* **2001**, *17* (5), 1582-1593.
- [19] Yu, M.; Woodruff, D. P.; Satterley, C. J.; Jones, R. G.; Dhanak, V. R., Structure of the Pentylthiolate Self-Assembled Monolayer on Ag(111). *Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111* (27), 10040-10048.
- [20] Yu, M.; Driver, S. M.; Woodruff, D. P., Scanning Tunneling Microscopy Investigation of the Structure of Methanethiolate on Ag(111). *Langmuir* **2005**, *21* (16), 7285-7291.

- [21] Torres, D.; Carro, P.; Salvarezza, R. C.; Illas, F., Evidence for the Formation of Different Energetically Similar Atomic Structures in Ag(111)-(√7x√7)-R19.1°-CH3S. *Physical Review Letters* **2006**, 97 (22), 226103.
- [22] Abufager, P. N.; Alvarez Soria, L.; Martiarena, M. L.; Reuter, K.; Busnengo, H. F., Structure of the Methylthiolate Monolayer on Ag (111): The Role of Substrate Vacancies. *Chemical Physics Letters* **2011**, 503 (1-3), 71-74.
- [23] Fenter, P.; Eisenberger, P.; Li, J.; Camillone, N.; Bernasek, S.; Scoles, G.; Ramanarayanan, T. A.; Liang, K. S., Structure of Octadecyl Thiol Self-Assembled on the Silver(111) Surface: an Incommensurate Monolayer. *Langmuir* **1991**, 7 (10), 2013-2016.
- [24] Hu, L.; de la Rama, L. P.; Efremov, M. Y.; Anahory, Y.; Schiettekatte, F.; Allen, L. H., Synthesis and Characterization of Single-Layer Silver-Decanethiolate Lamellar Crystals. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133 (12), 4367-4376.
- [25] Rodríguez, L. M.; Gayone, J. E.; Sánchez, E. A.; Grizzi, O.; Blum, B.; Salvarezza, R. C., Room-Temperature Kinetics of Short-Chain Alkanethiol Film Growth on Ag(111) from the Vapor Phase. *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, 110 (14), 7095-7097.
- [26] Lewis, M.; Tarlov, M.; Carron, K., Study of the Photooxidation Process of Self-Assembled Alkanethiol Monolayers. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, 117 (37), 9574-9575.
- [27] Azcárate, J. C.; Corthey, G.; Pensa, E.; Vericat, C.; Fonticelli, M. H.; Salvarezza, R. C.; Carro, P., Understanding the Surface Chemistry of Thiolate-Protected Metallic Nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry Letters* **2013**, 4, 3127-3138.
- [28] Chakraborty, I.; Govindarajan, A.; Erusappan, J.; Ghosh, A.; Pradeep, T.; Yoon, B.; Whetten, R. L.; Landman, U., The superstable 25 kDa monolayer protected silver nanoparticle: Measurements and interpretation as an icosahedral Ag₁₅₂ (SCH₂CH₂Ph)₆₀ cluster. *Nano Letters* **2012**, 12 (11), 5861-5866.
- [29] Xiang, H.; Wei, S.-H.; Gong, X., Structures of [Ag₇ (SR)₄]⁻ and [Ag₇ (DMSA)₄]⁻. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132 (21), 7355-7360.
- [30] Jadzinsky, P. D.; Calero, G.; Ackerson, C. J.; Bushnell, D. A.; Kornberg, R. D., Structure of a Thiol Monolayer-Protected Gold Nanoparticle at 1.1 Å Resolution. *Science* **2007**, 318 (5849), 430-433.
- [31] Desireddy, A.; Conn, B. E.; Guo, J.; Yoon, B.; Barnett, R. N.; Monahan, B. M.; Kirschbaum, K.; Griffith, W. P.; Whetten, R. L.; Landman, U.; Bigioni, T. P., Ultrastable Silver Nanoparticles. *Nature* **2013**, 501 (7467), 399-402.
- [32] Yang, H.; Wang, Y.; Huang, H.; Gell, L.; Lehtovaara, L.; Malola, S.; Häkkinen, H.; Zheng, N., All-thiol-stabilized Ag₄₄ and Au₁₂Ag₃₂ Nanoparticles with Single-crystal Structures. *Nat Commun* **2013**, 4, 2422.
- [33] Padmos, J. D.; Zhang, P., Surface Structure of Organosulfur Stabilized Silver Nanoparticles Studied with X-ray Absorption Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry C* **2012**, 116 (43), 23094-23101.
- [34] Battocchio, C.; Meneghini, C.; Fratoddi, I.; Venditti, I.; Russo, M. V.; Aquilanti, G.; Maurizio, C.; Bondino, F.; Matassa, R.; Rossi, M.; Mobilio, S.; Polzonetti, G., Silver Nanoparticles Stabilized with Thiols: A Close Look at the Local Chemistry and Chemical Structure. *Journal of Physical Chemistry C* **2012**, 116 (36), 19571-19578.
- [35] Corthey, G.; Rubert, A. A.; Picone, A. L.; Casillas, G.; Giovanetti, L. J.; Ramallo-López, J. M.; Zelaya, E.; Benítez, G. A.; Requejo, F. G.; José-Yacamán, M.; Salvarezza, R. C.; Fonticelli, M. H., New Insights into the Chemistry of Thiolate-Protected Palladium Nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C* **2012**, 116 (17), 9830-9837.
- [36] Holmlin, R. E.; Ismagilov, R. F.; Haag, R.; Mujica, V.; Ratner, M. A.; Rampi, M. A.; Whitesides, G. M., Correlating Electron Transport and Molecular Structure in Organic Thin Films. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, 40 (12), 2316-2320.
- [37] Hong, J.-P.; Park, A.-Y.; Lee, S.; Kang, J.; Shin, N.; Yoon, D. Y., Tuning of Ag Work Functions by Self-assembled Monolayers of Aromatic Thiols for an Efficient Hole Injection for Solution Processed Triisopropylsilyl ethynyl Pentacene Organic Thin Film Transistors. *Applied Physics Letters* **2008**, 92 (14), 143311-3.
- [38] Bishnoi, S. W.; Rozell, C. J.; Levin, C. S.; Gheith, M. K.; Johnson, B. R.; Johnson, D. H.; Halas, N. J., All-Optical Nanoscale pH Meter. *Nano Letters* **2006**, 6 (8), 1687-1692.
- [39] Kneipp, J.; Kneipp, H.; Wittig, B.; Kneipp, K., Following the Dynamics of pH in Endosomes of Live Cells with SERS Nanosensors†. *Journal of Physical Chemistry C* **2010**, 114 (16), 7421-7426.
- [40] Kang, J. F.; Ulman, A.; Liao, S.; Jordan, R.; Yang, G.; Liu, G.-y., Self-Assembled Rigid Monolayers of 4'-Substituted-4-mercaptobiphenyls on Gold and Silver Surfaces. *Langmuir* **2000**, 17 (1), 95-106.

- [41] Pradeep, T.; Evans, C.; Shen, J.; Cooks, R. G., Adsorbate Geometry Distinction in Arenethiols by Ion/Surface Reactive Collisions. *Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103* (25), 5304-5310.
- [42] Petri, M.; Kolb, D. M.; Memmert, U.; Meyer, H., Adsorption of mercaptopropionic acid onto Au (1 1 1): Part I. Adlayer formation, structure and electrochemistry. *Electrochimica Acta* **2003**, *49* (1), 175-182.
- [43] Freire, R. S.; Kubota, L. T., Application of self-assembled monolayer-based electrode for voltammetric determination of copper. *Electrochimica Acta* **2004**, *49* (22), 3795-3800.
- [44] Shekhah, O.; Wang, H.; Kowarik, S.; Schreiber, F.; Paulus, M.; Tolan, M.; Sternemann, C.; Evers, F.; Zacher, D.; Fischer, R. A., Step-by-step route for the synthesis of metal-organic frameworks. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129* (49), 15118-15119.
- [45] Urcuyo, R.; Cortés, E.; Rubert, A. A.; Benitez, G.; Montero, M. L.; Tognalli, N. G.; Fainstein, A.; Vela, M. E.; Salvarezza, R. C., Aromatic and aliphatic thiol self-assembled monolayers on Au: Anchoring and delivering copper species. *Journal of Physical Chemistry C* **2011**, *115* (50), 24707-24717.
- [46] Somorjai, G. A., *Chemistry in two dimensions: surfaces*. Cornell University Press: 1981.
- [47] Kolb, D., Physical and electrochemical properties of metal monolayers on metallic substrates. *Advances in Electrochemistry and Electrochemical Engineering* **1978**, *11*, 125-271.
- [48] Bard, A. J.; Faulkner, L. R.; Leddy, J.; Zoski, C. G., *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. Wiley New York: 1980; Vol. 2.
- [49] Seo, K.; Borguet, E., Nanolithographic write, read, and erase via reversible nanotemplated nanostructure electrodeposition on alkanethiol-modified Au (111) in an aqueous solution. *Langmuir* **2006**, *22* (4), 1388-1391.
- [50] Baumberg, J. J.; Kelf, T. A.; Sugawara, Y.; Cintra, S.; Abdelsalam, M. E.; Bartlett, P. N.; Russell, A. E., Angle-resolved surface-enhanced Raman scattering on metallic nanostructured plasmonic crystals. *Nano Letters* **2005**, *5* (11), 2262-2267.
- [51] Borissov, D.; Aravinda, C.; Freyland, W., Comparative investigation of underpotential deposition of Ag from aqueous and ionic electrolytes: an electrochemical and in situ STM study. *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109* (23), 11606-11615.
- [52] Kolb, D., An in situ scanning tunneling microscopy study of Ag electrodeposition on Au (111). *Physical Chemistry Chemical Physics* **1999**, *1* (20), 4847-4854.
- [53] Rooryck, V.; Reniers, F.; Buess-Herman, C.; Attard, G.; Yang, X., The silver upd on gold (111) revisited. *Journal of electroanalytical chemistry* **2000**, *482* (2), 93-101.
- [54] Ogaki, K.; Itaya, K., In situ scanning tunneling microscopy of underpotential and bulk deposition of silver on gold (111). *Electrochimica Acta* **1995**, *40* (10), 1249-1257.
- [55] Fonticelli, M.; Benitez, G.; Carro, P.; Azzaroni, O.; Salvarezza, R.; Gonzalez, S.; Torres, D.; Illas, F., Effect of Ag Adatoms on High-Coverage Alkanethiolate Adsorption on Au (111). *The Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112* (12), 4557-4563.
- [56] Jennings, G. K.; Laibinis, P. E., Underpotentially deposited metal layers of silver provide enhanced stability to self-assembled alkanethiol monolayers on gold. *Langmuir* **1996**, *12* (26), 6173-6175.
- [57] Fonticelli, M.; Azzaroni, O.; Benitez, G.; Martins, M.; Carro, P.; Salvarezza, R., Molecular Self-Assembly on Ultrathin Metallic Surfaces: Alkanethiolate Monolayers on Ag (1×1)-Au (111). *The Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108* (6), 1898-1905.
- [58] J. Esplandiu, M.; A. Schneeweiss, M.; M. Kolb, D., An in situ scanning tunneling microscopy study of Ag electrodeposition on Au(111). *Physical Chemistry Chemical Physics* **1999**, *1* (20), 4847-4854.
- [59] Shirley, D. A., High-resolution X-ray photoemission spectrum of the valence bands of gold. *Physical Review B* **1972**, *5* (12), 4709.
- [60] Cortés, E.; Rubert, A. A.; Benitez, G.; Carro, P.; Vela, M. E.; Salvarezza, R. C., Enhanced Stability of Thiolate Self-Assembled Monolayers (SAMs) on Nanostructured Gold Substrates. *Langmuir* **2009**, *25* (10), 5661-5666.
- [61] Kresse, G.; Hafner, J., Ab-initio Molecular-dynamics for Open-shell Transition-metals. *Physical Review B* **1993**, *48* (17), 13115-13118.
- [62] Kresse, G.; Furthmüller, J., Efficiency of ab-initio Total Energy Calculations for Metals and Semiconductors Using a Plane-wave Basis Set. *Computation Materials Science* **1996**, *6* (1), 15-50.
- [63] Dion, M.; Rydberg, H.; Schröder, E.; Langreth, D. C.; Lundqvist, B. I., Van der Waals Density Functional for General Geometries. *Physical Review Letters* **2004**, *92* (24), 246401.
- [64] Klimes, J.; Bowler, D. R.; Michaelides, A., A Critical Assessment of Theoretical Methods for Finding Reaction Pathways and Transition States of Surface Processes. *Journal of Physics: Condensed Matter* **2010**, *22* (7), 074203-074203.

- [65] Blöchl, P. E., Projector Augmented-wave Method. *Physical Review B* **1994**, *50* (24), 17953-17979.
- [66] Monkhorst, H. J.; Pack, J. D., Special Points for Brillouin-Zone Integrations. *Physical Review B* **1976**, *13* (12), 5188-5192.
- [67] Pearson, W. B., *Handbook of Lattice Spacing and Structure of Metals*. Pergamon Press, Inc.: New York, 1958.
- [68] Bader, R. F., *Atoms in molecules*. Wiley Online Library: 1990.
- [69] Azzaroni, O.; Vela, M. E.; Andreasen, G.; Carro, P.; Salvarezza, R. C., Electrodesorption Potentials of Self-Assembled Alkanethiolate Monolayers on Ag(111) and Au(111). An Electrochemical, Scanning Tunneling Microscopy and Density Functional Theory Study. *Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106* (47), 12267-12273.
- [70] Pensa, E.; Rubert, A. A.; Benitez, G.; Carro, P.; Orive, A. G.; Creus, A. H.; Salvarezza, R. C.; Vericat, C., Are 4-Mercaptobenzoic Acid Self Assembled Monolayers on Au(111) a Suitable System to Test Adatom Models? *Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116* (49), 25765-25771.
- [71] Abufager, P. N.; Solano Canchaya, J. G.; Wang, Y.; Alcamí, M.; Martín, F.; Alvarez Soria, L.; Martiarena, M. L.; Reuter, K.; Busnengo, H. F., Theoretical Study of the Structure of Self-Assembled Monolayers of Short Alkylthiolates on Au(111) and Ag(111): The Role of Induced Substrate Reconstruction and Chain-chain Interactions. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2011**, *13* (20), 9353-9362.
- [72] Voznyy, O.; Dubowski, J. J.; Yates Jr, J. T.; Maksymovych, P., The role of gold adatoms and stereochemistry in self-assembly of methylthiolate on Au(111). *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131* (36), 12989-12993.
- [73] Maksymovych, P.; Voznyy, O.; Dougherty, D. B.; Sorescu, D. C.; Yates Jr, J. T., Gold adatom as a key structural component in self-assembled monolayers of organosulfur molecules on Au(111). *Progress in Surface Science* **2010**, *85* (5-8), 206-240.
- [74] Wang, B.; Liu, M.; Wang, Y.; Chen, X., Structures and Energetics of Silver and Gold Nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C* **2011**, *115* (23), 11374-11381.

Capítulo 4

Síntesis y caracterización fisicoquímica de nanopartículas de Ag (AgNPs)

En este capítulo se va a describir y explicar la obtención y caracterización fisicoquímica de las nanopartículas sintetizadas para este trabajo de Tesis, tanto de las recubiertas con Citrato (CIT-AgNPs) como con ácido 4-mercaptobenzoico (MBA-AgNPs), permitiendo así conocer el tamaño, la estructura y composición química del recubrimiento superficial, sus propiedades ópticas y las características de su carga superficial.

4.1. Introducción.

Los primeros métodos de síntesis para obtener suspensiones de nanopartículas de metales nobles aún hoy en día se utilizan y continúan siendo el modelo por el cual se comparan nuevos métodos de síntesis.

El método más popular para producir AuNPs es el denominado método de Turkevich, que utiliza la reducción de una sal de oro (HAuCl_4) con varios agentes reductores, entre ellos el citrato de sodio, generando NPs de un tamaño aproximado de 20 nm.⁵ Para suspensiones de AgNPs, un método común es el método de Lee–Meisel, el cual es una variación del método de Turkevich utilizando al AgNO_3 como fuente del metal,⁶ pero a diferencia del método Turkevich, el método de Lee–Meisel produce una amplia distribución de tamaño para las partículas. El método más común para la síntesis de AgNPs es la reducción del AgNO_3 con NaBH_4 . Aplicando la metodología introducida por Creighton, el procedimiento de síntesis habitualmente produce NPs con una estrecha distribución de tamaño ≈ 10 nm.⁷ Este método puede ser adaptado para producir partículas de otros metales, tales como Pd, Ni, Cu, Pt, etc.,⁸⁻¹¹ pese a que los protocolos específicos dependen del potencial de reducción de los iones. Suspensiones de Ni y Cu, por ejemplo, no son muy estables como partículas metálicas y son fácilmente oxidables, así que requieren de fuertes ligandos protectores para evitar su oxidación.^{9, 10}

La síntesis de NPs metálicas y sus reacciones basadas en la reducción en solución de una sal mediante un agente reductor, se realizan en presencia de un agente estabilizante, el cual tiene la función de recubrir la superficie de las NPs, controlando el tamaño y evitando su aglomeración.^{12, 13} La estabilidad de las dispersiones coloidales de NPs, se debe a interacciones electrostáticas o a factores estéricos.¹³ La estabilización electrostática, implica la repulsión coulombica entre partículas, causada por la doble capa eléctrica que se forma por los iones adsorbidos en la superficie de las NPs, por ejemplo, el citrato de sodio. En el caso de la estabilización estérica, las moléculas orgánicas tales como los polímeros y surfactantes, por ejemplo, polivinil alcohol (PVP),¹⁴ bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)¹⁵ o almidón,¹⁶ actúan como un escudo protector sobre la superficie de las NPs.

4.2. Síntesis de AgNPs.

De los tres metales (Ag, Au, Cu) que presentan resonancias de plasmón en el espectro visible, la Ag exhibe la más alta eficiencia de excitación del plasmón.¹⁷ Además, la excitación óptica de las resonancias de los plasmones en AgNPs es el mecanismo más eficiente por el cual la luz interactúa con la materia. Una sola AgNP interactúa con la luz más eficientemente que una NP de la misma dimensión compuesta de cualquier cromóforo orgánico o inorgánico conocido. La sección transversal de la Ag que interactúa con la luz es alrededor de diez veces mayor que la sección transversal geométrica, lo que indica que las partículas capturan mucha más luz que la que físicamente incide sobre ellas.¹⁸

19

Debido al alto potencial de reducción que posee la Ag, la oxidación de las AgNPs es termodinámicamente desfavorable obteniéndose suspensiones acuosas o alcohólicas bastante estables sin la ayuda de ligandos protectores. La agregación puede ser inhibida por las amplias dobles capas eléctricas que se forman alrededor de las NPs metálicas en suspensiones de baja fuerza iónica. Para suspensiones de altas fuerzas iónicas o de fase orgánica, agentes protectores tales como monocapas autoensambladas de tioles,^{20, 21} surfactantes,^{22, 23} polímeros,²⁴⁻²⁶ y dendrímeros^{27, 28} pueden ser utilizados para proteger las NPs y evitar su agregación. Sin embargo, se podrían obtener NPs de morfología anisotrópica si la síntesis se lleva a cabo en presencia de agentes protectores, debido a las diferentes afinidades de los ligandos con las caras cristalinas expuestas. Esto muchas veces es un efecto deseado y algunos investigadores han demostrado que se pueden producir varias formas de NPs mediante la utilización de agentes estabilizantes específicos para tal fin.²⁹⁻³² Alternativamente, las NPs podrían estar protegidas con las moléculas buscadas para su diseño después de su síntesis, en nuestro caso con el ácido 4-mercaptobenzoico (MBA), para facilitar su transferencia a fases no polares o para incluir nuevos grupos superficiales con funcionalidades específicas.

Todo lo mencionado anteriormente, no es de ninguna manera una lista completa de los métodos disponibles para la síntesis de AgNPs, sino más bien

una discusión de los métodos de síntesis más comúnmente empleados. Desafortunadamente, todos los métodos que se han mencionado, tienen algunos problemas o limitaciones inherentes, y mientras cada método presente ciertas ventajas y desventajas, la selección de un procedimiento adecuado dependerá de la naturaleza de la aplicación que se tiene prevista para las NPs. En el caso de las aplicaciones biológicas, se utilizan NPs en fase acuosa (por lo general, en condiciones fisiológicas) y con recubrimientos biocompatibles como el citrato, algunos azúcares o polímeros. El método de síntesis óptimo debería producir NPs sin productos químicos que alteren potencialmente las propiedades ópticas y la química superficial.

4.3. Estructura y forma de las NPs metálicas.

Se conoce bien que la energía superficial (γ) es decisiva para entender y predecir la morfología de las NPs de los metales nobles.³³ La energía superficial se define como el exceso de energía libre por unidad de área de una cara cristalográfica particular, la cual determina en gran medida el facetado y el crecimiento de cristales de las partículas a escala nanométrica. Los metales nobles como la Ag, con una red cúbica centrada en las caras (*fcc*: *face centered cube*, en inglés) tienen diferentes γ para los diferentes planos cristalinos.³⁴ La existencia de estas caras cristalinas, dependerá del valor de γ que presenten y aquellas caras cristalinas que minimizan el valor de γ predominan sobre las demás. Los resultados de anisotropía en morfologías estables cuando γ se minimiza por los planos cristalinos de bajo índice, muestran un empaquetamiento atómico compacto. Para Au, Ag, Cu, Ni, Pd y Pt a $T = 0K$, los cálculos de energía superficial predicen que algún plano cristalino de alto índice podría espontáneamente facetarse dentro de las combinaciones lineales de los planos de bajo índice $\{111\}$, $\{100\}$ y $\{110\}$.³⁵ Cada faceta cristalina posee un valor de γ diferente, siendo $\gamma \{111\} < \gamma \{100\} < \gamma \{110\}$.³⁶

La forma predicha en equilibrio termodinámico para NPs monocristalinas con un tamaño entre 3 – 100 nm a $T = 0K$ es un octaedro truncado limitado por los planos $\{111\}$ y $\{100\}$, con una relación $\{111\}/\{100\} \approx 0,9$ (**Figura 3.1**).³⁷ Incluso,

la mayoría de NPs "esféricas" pueden ser descritas por este tipo de estructura. Ahora bien, a medida que las NPs son más pequeñas, aumenta la fracción superficial de sitios y su forma se convierte en decaedro o icosaedro, este último formado exclusivamente por los planos cristalinos de tipo $\{111\}$ (Figura 3.1).³⁸ Debido a la energía de deformación acumulada, la estabilidad de las formas icosaédricas disminuye significativamente a medida que aumenta el tamaño del clúster.³⁹

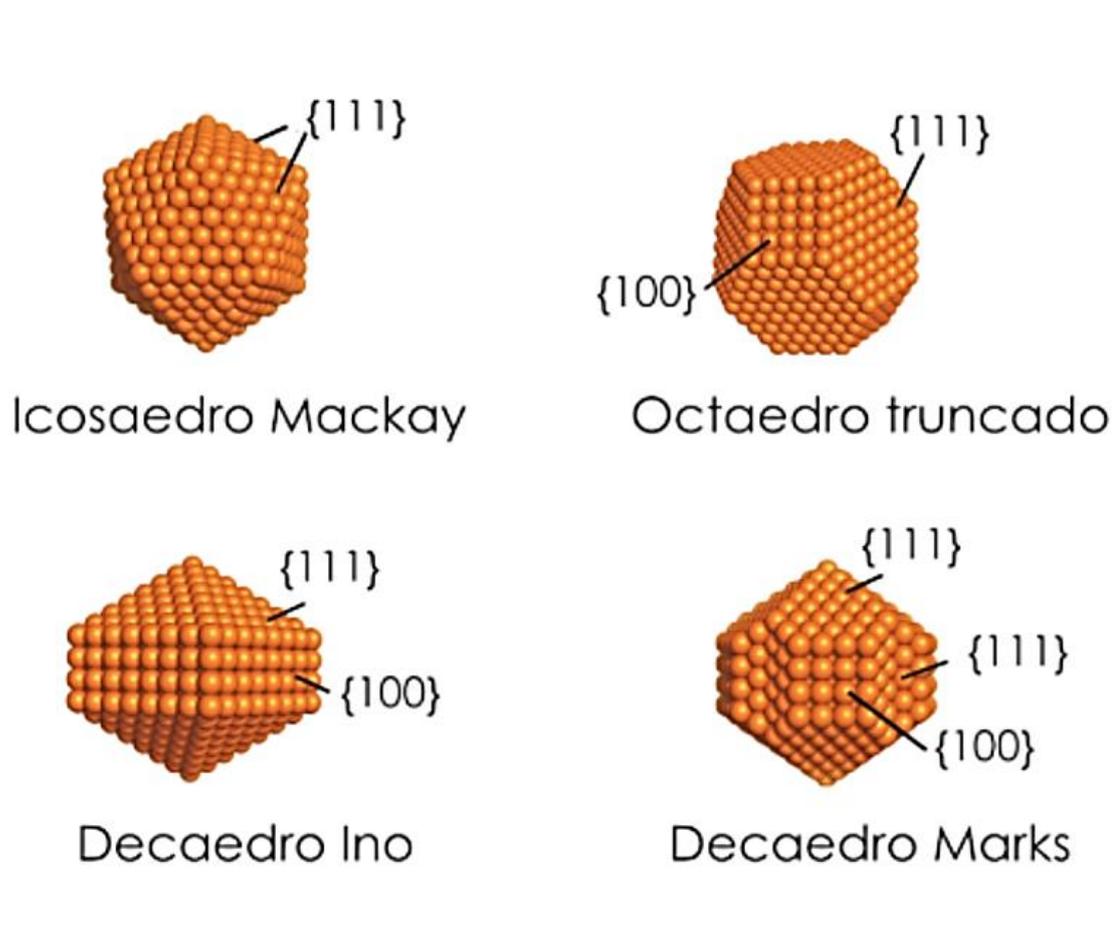


Figura 3.1. Formas que presentan algunas NPs metálicas.³⁶

4.4. Parte Experimental: Métodos de síntesis para las AgNPs.

4.4.1. Síntesis I: CIT–AgNPs y MBA–AgNPs.

Las nanopartículas de plata (AgNPs) en solución acuosa fueron preparadas por reducción del AgNO_3 con NaBH_4 y estabilizadas usando citrato trisódico. Todos los reactivos usados en la síntesis fueron de grado analítico, y las soluciones fueron preparadas con agua Milli-Q ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$).

La síntesis consistió en la mezcla de un volumen de 10 mL de una solución acuosa 0.25 mM de AgNO_3 y de 10 mL de una solución acuosa 0.25 mM de citrato de sodio bajo una suave agitación magnética. Luego, se adicionaron gota a gota 25 μL de una solución 100 mM de NaBH_4 preparada al momento de ser utilizada. Ambas soluciones fueron enfriadas en un baño de hielo/agua a una temperatura de alrededor de 0°C . Se agitó vigorosamente la mezcla durante 3 min. La coloración inicial de la solución es amarilla. La concentración final de Ag en la solución de NPs es de $2.1 \times 10^{-2} \text{ mg Ag/mL}$. Ésta suspensión coloidal de NPs se dializó durante 2 h, para eliminar el exceso de citrato. Después, a la solución dializada de AgNPs cubiertas por citrato (CIT–AgNPs), se le añadió una solución acuosa de MBA 1 mM con 0.1 M de NaOH en una relación de 5:1 (CIT–AgNPscitrato:Solución MBA), para promover la formación de la monocapa autoensamblada de este tiol sobre la superficie de las AgNPs. Finalmente, después de 2 h de reacción, la suspensión coloidal fue nuevamente dializada por aproximadamente 12 h en una solución 0.01 M de NaOH. La coloración de la solución cambió de amarillo a naranja. La dispersión de MBA–AgNPs posee un valor final de $\text{pH} \approx 8\text{--}9$.

4.4.1.1. Caracterización de las AgNPs.

De acuerdo a los espectros UV–Vis obtenidos para las AgNPs (**Figura 4.2**), se observa la presencia de la Ag metálica a $\sim 400 \text{ nm}$, antes y después de la diálisis (purificación); indicando que el procedimiento de intercambio de

ligandos no modifica las propiedades de las CIT-AgNPs que juegan el papel de semillas y tampoco ocurre sinterización, ya que haría aparecer hombros a longitudes de onda mayores.

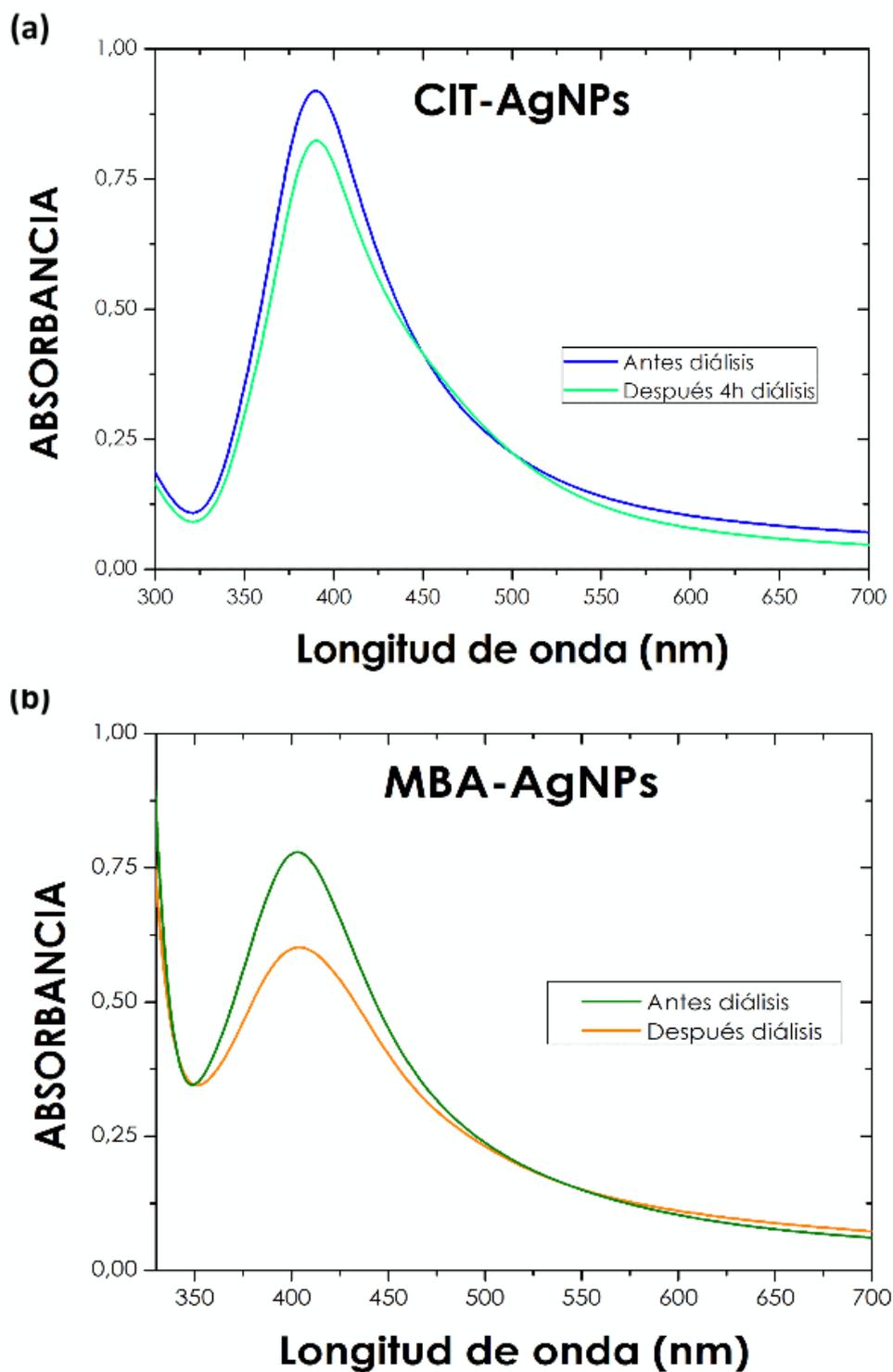


Figura 4.2. Comparación de los espectros UV-Vis obtenidos a partir de las soluciones de NPs sin dializar y dializadas, (a) CIT-AgNPs, (b) MBA-AgNPs.

También, se realizaron medidas de fluorescencia de las MBA–AgNPs dializadas (**Figura 4.3**). Los datos demuestran la presencia de MBA después del procedimiento de reemplazo de ligandos de las CIT–AgNPs para formar las MBA–AgNPs; si bien esta técnica no permite discernir si el MBA está quimisorbido o fisisorbido formando multicapas más adelante se aclarará esta cuestión con los resultados de XPS.

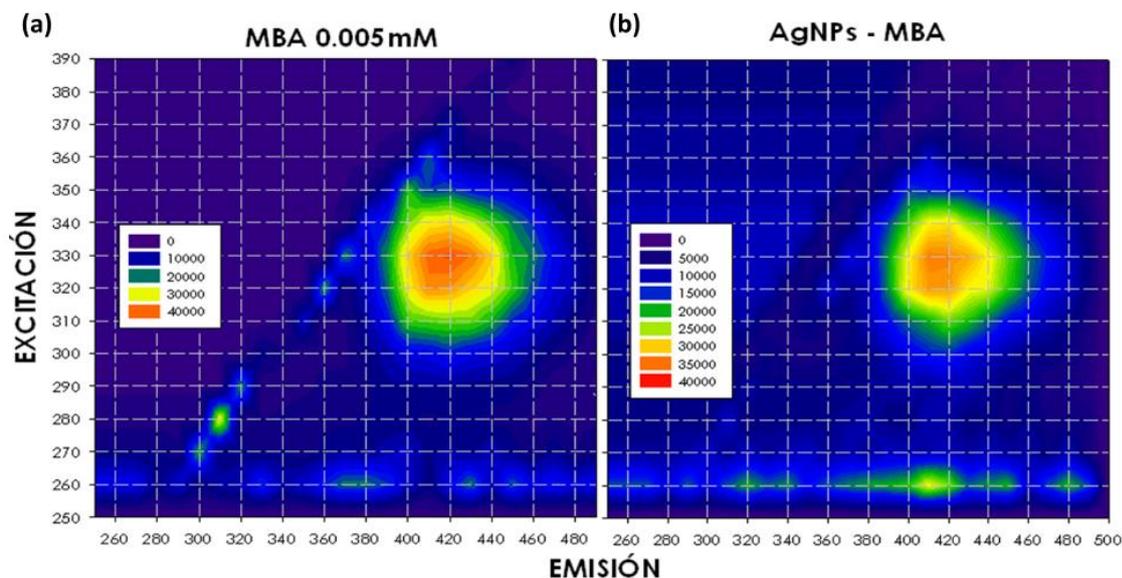


Figura 4.3. Espectros de fluorescencia: (a) solución 0.005 mM de MBA. (b) suspensión acuosa de MBA–AgNPs.

Las AgNPs también fueron analizadas por espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS). Los resultados de XPS (**Figura 4.4a**) de las MBA-AgNPs recién preparadas, muestran que en la región del S2p aparece la señal correspondiente al enlace tiolato (162.67 eV); y en el espectro en la región de la Ag3d, se obtienen los dos picos correspondientes a la Ag (no oxidada) a 368.73eV. Estos resultados confirman que el MBA se encuentra unido a la Ag de las NPs a través del enlace tiolato.

A fin de corroborar la ausencia de sulfuro en las MBA-AgNPs que pudiese estar presente por la ruptura del enlace S–resto aromático tal como se observó en NPs de Ag modificadas con alilmercaptanos,⁴⁰ se comparó el espectro de XPS de las MBA-AgNPs con aquellos obtenidos al incubar dos láminas (placas) de

Ag metálica, una con solución de Na₂S 1mM durante 5 min y otra con una solución de MBA 1mM durante 1h 30 min. Este ensayo permitió confirmar que en las AgNPs no hay sulfuro presente, ya que no está presente el pico correspondiente a 161.47 eV observado en la lámina (placa) de Ag incubada con sulfuro de sodio que se adsorbe en su superficie. En el espectro XPS de las MBA-AgNPs si se observa la señal que corresponde al enlace del tiolato a 162.52 eV, tal como el que se obtiene en los espectros de la lámina (placa) de Ag metálica incubada con MBA (**Figura 4.4b**).

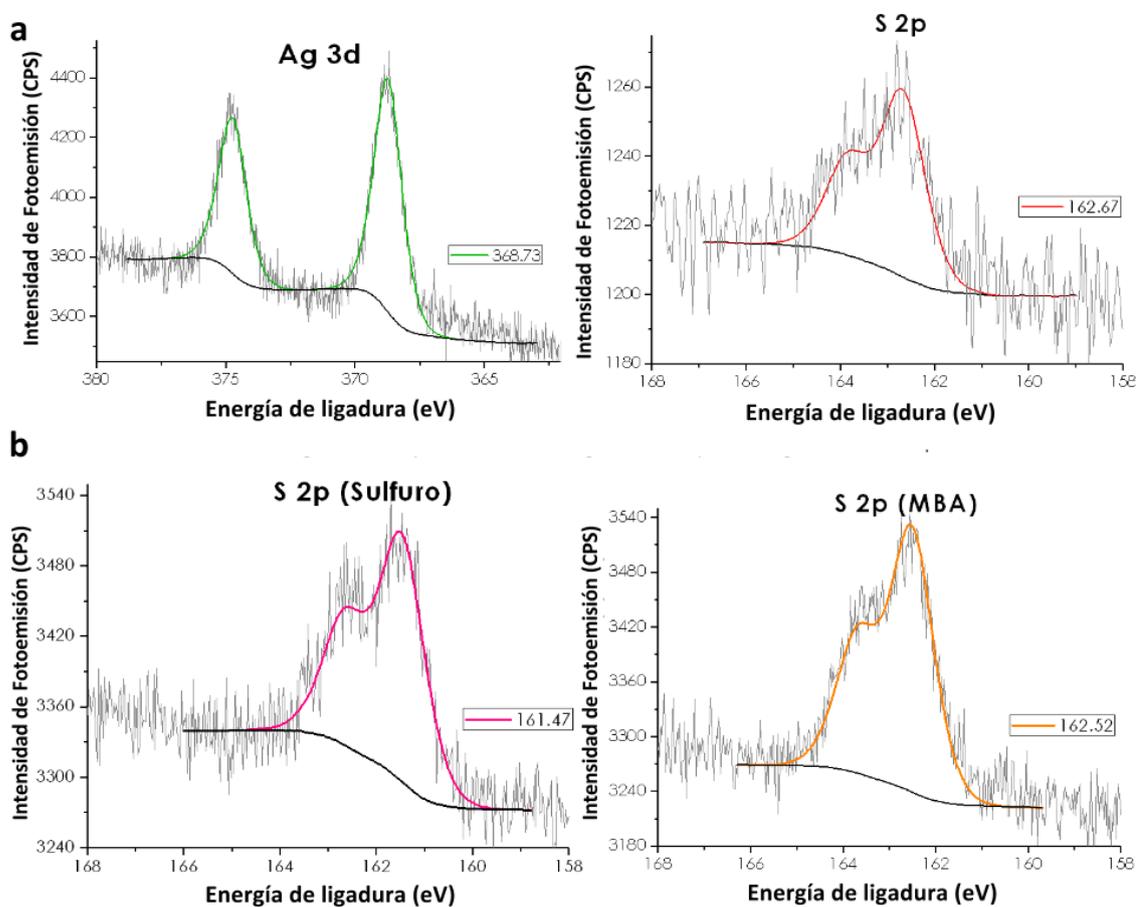


Figura 4.4. Espectros XPS: (a) MBA-AgNPs en la región Ag3d y S2p. (b) Láminas (placas) de Ag incubadas con Na₂S y MBA en la región S2p.

Una imagen típica de TEM para las MBA-AgNPs recién preparadas, se muestra en la **Figura 4.5a**. El histograma indica que el tamaño promedio es de 6 ± 3 nm (**Figura 4.5b**). La imagen de HRTEM permite resolver la estructura atómica

de una partícula única de Ag funcionalizada con MBA (**Figura 4.5c**). Esta imagen es compatible con un eje de zona [110] de una estructura fcc tal como es la de la Ag metálica. La presencia de éstos y otros planos evidencia la cristalinidad de las nanopartículas.

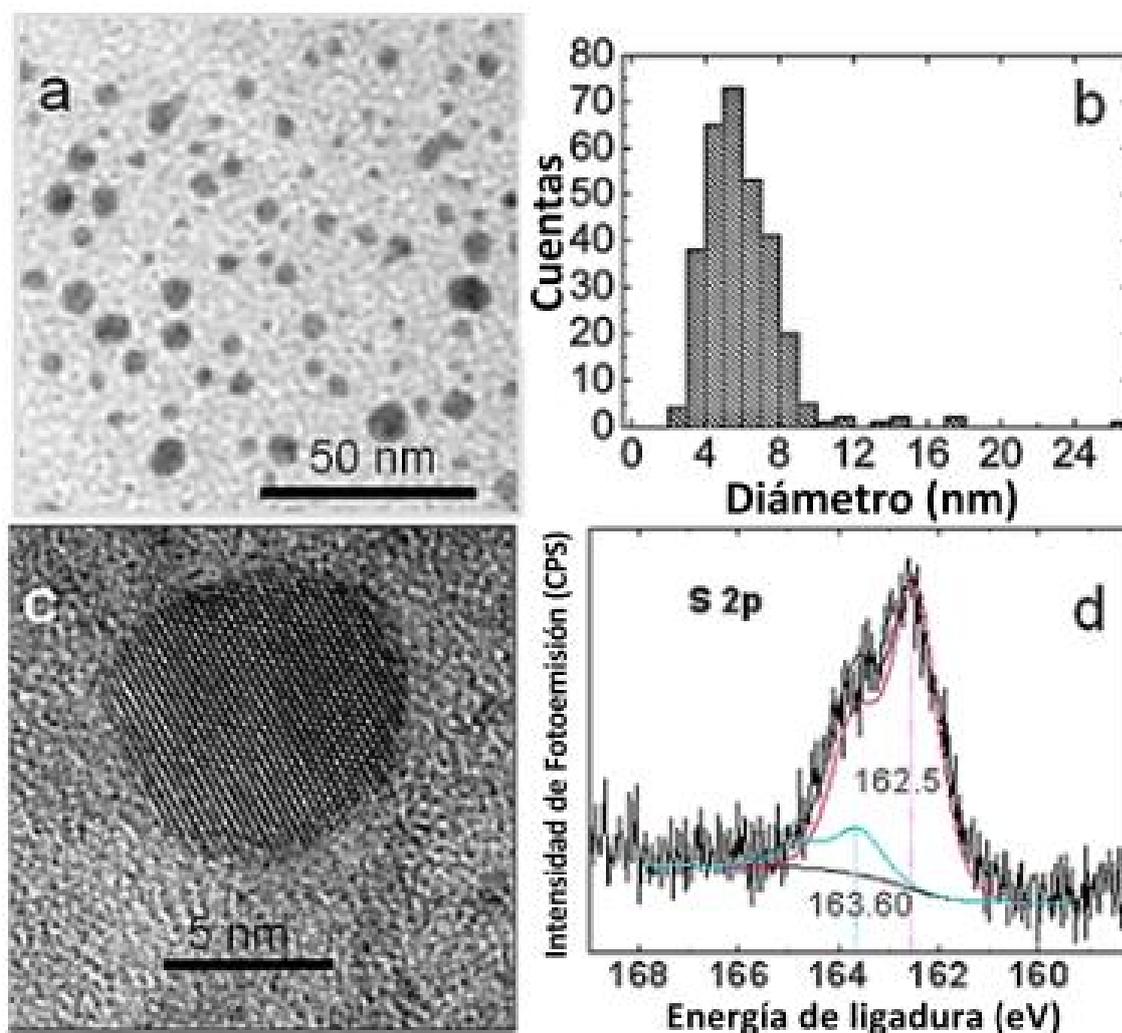


Figura 4.5. (a) Imagen TEM de MBA-AgNPs recién preparadas. (b) Análisis de tamaño de una muestra con 309 MBA-AgNPs. (c) HRTEM de una única MBA-AgNP. (d) Espectro XPS de MBA-AgNPs obtenidas por el método de intercambio de ligando de las CIT-AgNPs.

Otro espectro XPS de estas MBA-AgNPs se muestran en la **Figura 4.5d**. La señal en la región S 2p indica un componente principal a ≈ 162.5 eV que contribuye en un 84.5% del área total del espectro y uno a ≈ 163.6 eV con un 13.5%, cuya asignación corresponde a especies tiolato y a moléculas de MBA fisorbidas, respectivamente. Sin embargo, se encontró que a 162 eV la relación

de áreas de los picos S 2p/Ag 3d es $r = 0.50$, mientras que para una superficie plana de Ag orientada preferencialmente al plano (111) es $r = 0.22$, tal como se mostró en el capítulo anterior. Éste no es un valor inesperado ya que el cubrimiento de tiolatos en NPs metálicas es más alto que el encontrado en superficies planas.⁴¹ Para AgNPs menores de 5 nm de diámetro, un gran número de átomos de Ag se localizan en las esquinas y bordes de la superficie, lo que a su vez resulta en un mayor cubrimiento de la monocapa de tiol adsorbido como el que se encontró previamente para AuNPs.⁴¹ Modelos teóricos de AuNPs han demostrado que el cubrimiento es aproximadamente el doble del que se espera para superficies planas de Au (111).⁴² En nuestro caso, la medida de la relación S2p/Ag 3d a 162 eV de es $r = 0.50$, un valor entre $2r = 0.44$ y $2r = 0.6$ medido para MBA ($\theta = 0.25$) y alcanotioles ($\theta = 0.44$) sobre una superficie de Ag (111), respectivamente.

Finalmente, en contraste con lo observado para otras AgNPs cubiertas con tiolatos,^{43, 44} no se encontró evidencia de sulfuros (componente S2p a 161.4 eV) en el espectro XPS para las MBA–AgNPs (**Figura 4.5d**). En principio, esta diferencia se podría dar por los diferentes métodos de síntesis utilizados para preparar las AgNPs cubiertas con tiolatos. Sin embargo, algunos datos de XPS para AgNPs cubiertas con dodecanotiol (C12) sintetizadas por el método de dos fases de Brust–Schiffrin en nuestro laboratorio, mostraron solamente una pequeña cantidad de sulfuro, lo cual no es consistente con las especies tiolato presentes en un modelo de tipo core@shell de Ag@Ag₂S.³⁶ Por otro lado, los datos de análisis termogravimétricos para AgNPs cubiertas con tiolatos preparadas por el método de una fase de Brust–Schiffrin, no mostraron evidencia de un exceso de S en relación a estas especies de tiolato intactas.⁴⁵ Sin embargo, se ha demostrado que las AgNPs cubiertas con tiolato y las NPs tipo core@shell de Ag@Ag₂S cubiertas con tiolato tienen una estabilidad similar,³⁶ por lo que el producto final en la síntesis de este tipo de NPs puede depender de los detalles del procedimiento sintético o de la presencia de impurezas de sulfuro.

Por otra parte, las imágenes de TEM típicas para las MBA–AgNPs después de 2 semanas de haber sido preparadas (NPs envejecidas) que se muestran en

la **Figura 4.6a**, exhiben cambios en la morfología respecto de las recién preparadas.

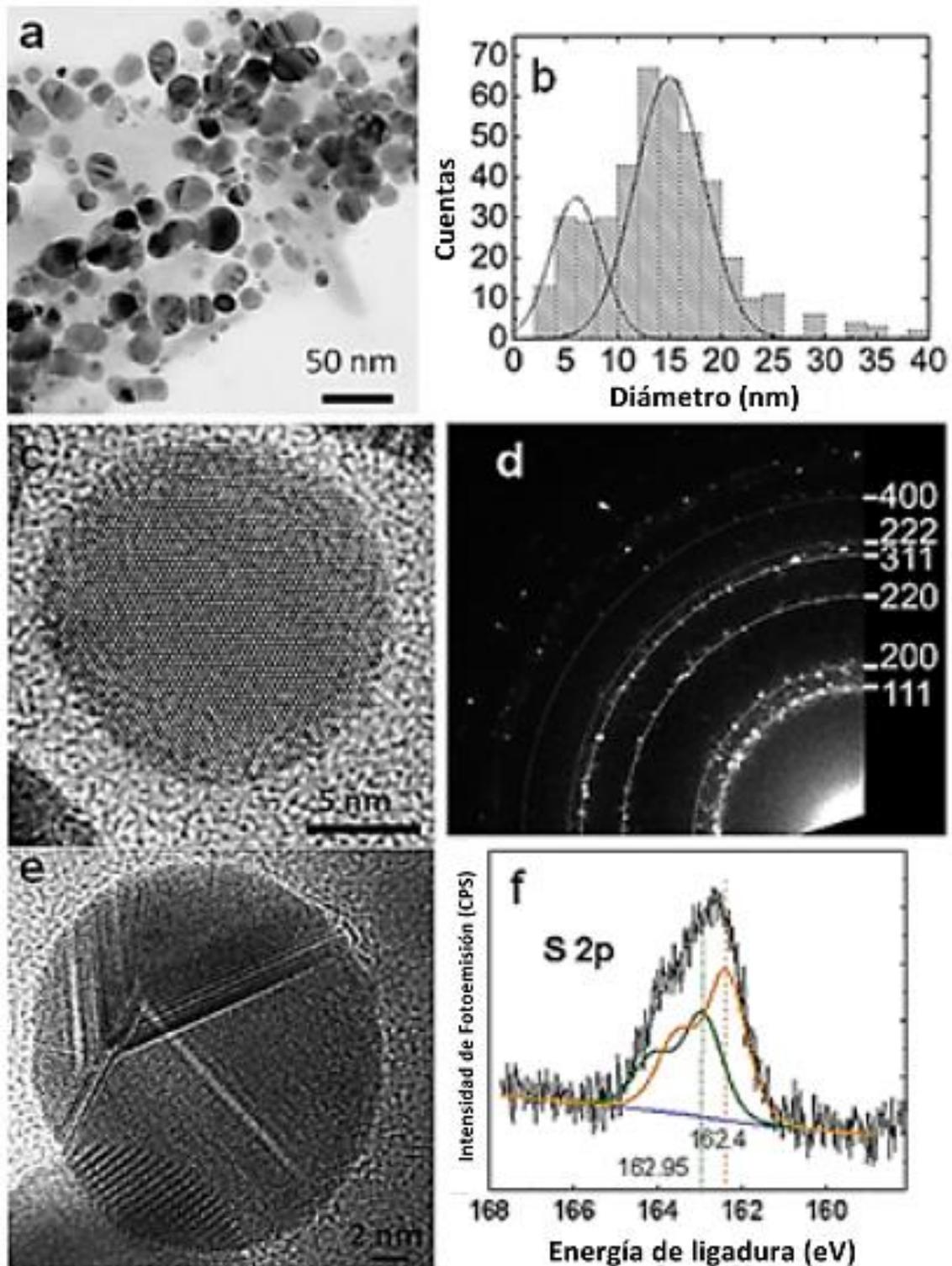


Figura 4.6. (a) Imagen TEM de campo claro de MBA-AgNPs envejecidas (2 semanas). (b) Análisis de distribución de tamaños de una muestra constituida por 422 MBA-AgNPs. (c, e) Imágenes HRTEM de una MBA-AgNP individual. (d) Patrón de difracción de electrones de MBA-AgNPs revelando los planos cristalinos de la Ag en las NPs. (f) Espectro XPS de MBA-AgNPs envejecidas 15 días.

El histograma de tamaños de partículas de las MBA–AgNPs envejecidas obtenido a partir de las imágenes TEM, revela dos distribuciones: una alrededor de 6 ± 2 nm y otra a 15 ± 3 nm (**Figura 4.6b**); es decir, el proceso de envejecimiento produce una sinterización en las AgNPs. La información HRTEM permite encontrar la estructura resuelta a nivel atómico de las AgNPs envejecidas (**Figura 4.6c, e**). La indexación del patrón es compatible con la estructura fcc de la Ag (**Figura 4.6d**) y confirma la ausencia de Ag_2S . En la **Figura 4.6e** se muestran fallas y límites individuales, siendo compatibles con la presencia de partículas facetadas.⁴⁶ Los espectros XPS en la región S2p para las MBA–AgNPs envejecidas (**Figura 4.6f**) indican que la cantidad de S total se redujo levemente con respecto a la medida de las MBA–AgNPs frescas (**Figura 4.5d**), con valores de r de 0.3 y 0.5, respectivamente. Más importante aún, se observó que la componente a 162 eV (60%) disminuye y la componente a 163 eV aumenta (40%) (**Figura 4.6e**) respecto de esas proporciones en MBA–AgNPs recién preparadas (162.5 eV (84.5%) y 163.6 eV (13.5%)). Un comportamiento similar se ha reportado durante el envejecimiento de superficies nanoestructuradas de Au donde el aumento en la componente a 163 eV se asignó a la formación de disulfuro resultante de la oxidación de los tiolatos.⁴⁷ La degradación de la capa protectora de MBA explica el proceso de sinterización y, consecuentemente el aumento en el tamaño de las MBA–AgNPs de 6 a 15 nm. Vale destacar, que estos datos indican que la sinterización tiene lugar incluso con una pequeña degradación de la capa de tiolato que se oxidaría a disulfuro.

La **Figura 4.7a** muestra una típica AgNP recubierta con MBA, donde se pueden observar cinco ejes de zona [110] de una fcc rotados 72° el uno respecto del otro, y en el recuadro se muestra la correspondiente transformada de Fourier (FFT). La existencia de 5 planos simétricos en las estructuras fcc ya fue explicado por Bagley⁴⁸ como 5 planos gemelos (111) con cinco cristales cúbicos centrados en la cara alrededor de un eje común [110]. En las **Figuras 4.7b, c** se muestran vistas diferentes del modelo del decaedro de Marks con cinco caras con las orientaciones cristalinas correspondientes a la estructura de la Ag. Este

modelo interpreta la imagen de HRTEM de la **Figura 4.7a** y permite ver la importante contribución de las caras (111) y (100) sobre el área superficial.

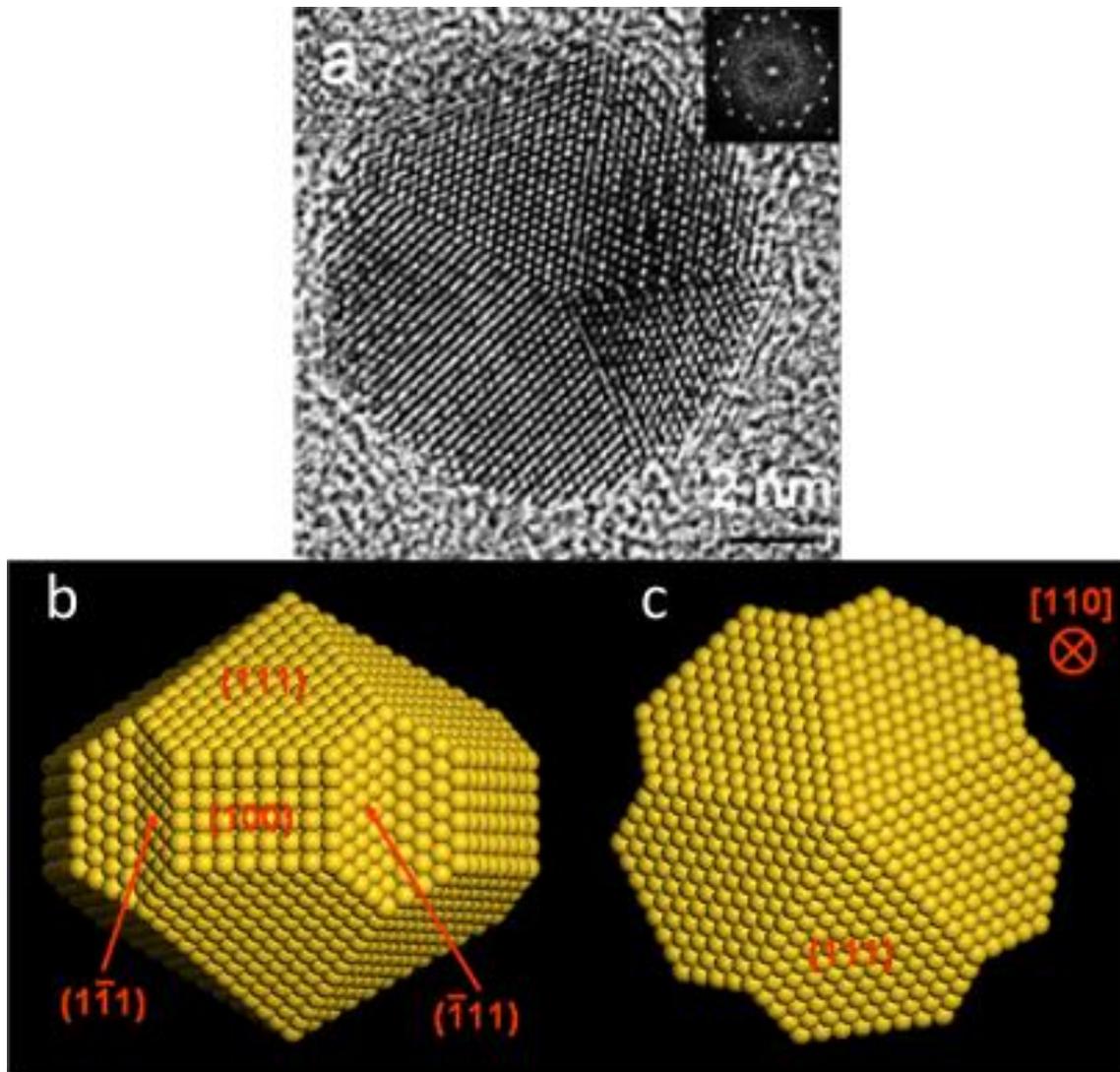


Figura 4.7. (a) Imagen HRTEM de una MBA-AgNP. La imagen es consistente con un decaedro de Marks a una proyección [110] (el recuadro es el patrón FFT). (b) Modelo del decaedro de Marks desde una dirección [100]. (c) Modelo del decaedro de Marks desde una dirección [110]. Todas las caras son etiquetadas de acuerdo a una estructura fcc.

4.4.2. Síntesis II: CIT-AgNPs y MBA-AgNPs de mayor concentración.

Debido a que el pH de la dispersión de las MBA-AgNPs sintetizadas por el método anterior es alcalino y nuestro interés de este tipo de NPs es su interacción

con sistemas biomiméticos, es necesario optimizar una nueva metodología sintética a valores de pH cercanos a los fisiológicos ($\text{pH} \approx 7$) y de una mayor concentración (3 veces respecto de la descrita anteriormente) para que las interacciones con este tipo de sistemas sean posibles de ser detectadas mediante las técnicas disponibles, debido a la presencia de una mayor cantidad de NPs presentes en la dispersión coloidal.

Estas soluciones más concentradas de CIT–AgNPs y MBA–AgNPs, se obtuvieron triplicando las concentraciones de las soluciones de nitrato de plata (0.75 mM), citrato de sodio (0.75 mM), borohidruro de sodio (300 mM) y ácido 4–mercaptobenzoico (3 mM), utilizadas para el procedimiento de síntesis descrito en la sección anterior. Experimentos con concentraciones más altas de NPs no se pudieron realizar debido a su coalescencia. Entonces, el procedimiento de síntesis se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de la sección anterior, sólo que en esta síntesis II, el procedimiento de diálisis se realiza en una solución buffer de fosfatos a pH 7.2, dializando durante un tiempo de 12 hs.

4.4.2.1. Caracterización de las AgNPs.

Imágenes típicas de TEM de alta resolución (HRTEM) de MBA–AgNPs recién preparadas y de CIT–AgNPs se muestran en la **Figura 4.8**. Las imágenes de baja magnificación en **(a)** y **(b)** muestran que ambas NPs tienen forma esférica con diámetros promedio de 8.7 ± 2 nm para las CIT–AgNPs y de 8.2 ± 2 nm para las MBA–AgNPs, según la distribución de tamaños de sus correspondientes histogramas, **(c)** y **(d)**. Las imágenes HRTEM permiten resolver la estructura atómica de las AgNPs (**Figura 4.8e, f**). Las imágenes son compatibles con los ejes de zona [100] y los ejes de zona [110] de una estructura fcc de Ag metálica. Las imágenes confirman la naturaleza cristalina de ambas AgNPs funcionalizadas. La imagen de HRTEM de la **Figura 4.8f**, muestra claramente una microestructura facetada de las MBA–AgNPs, donde se exponen al exterior caras gemelas de orientación {111} con una simetría de rotación de quinto grado alrededor del eje [110].

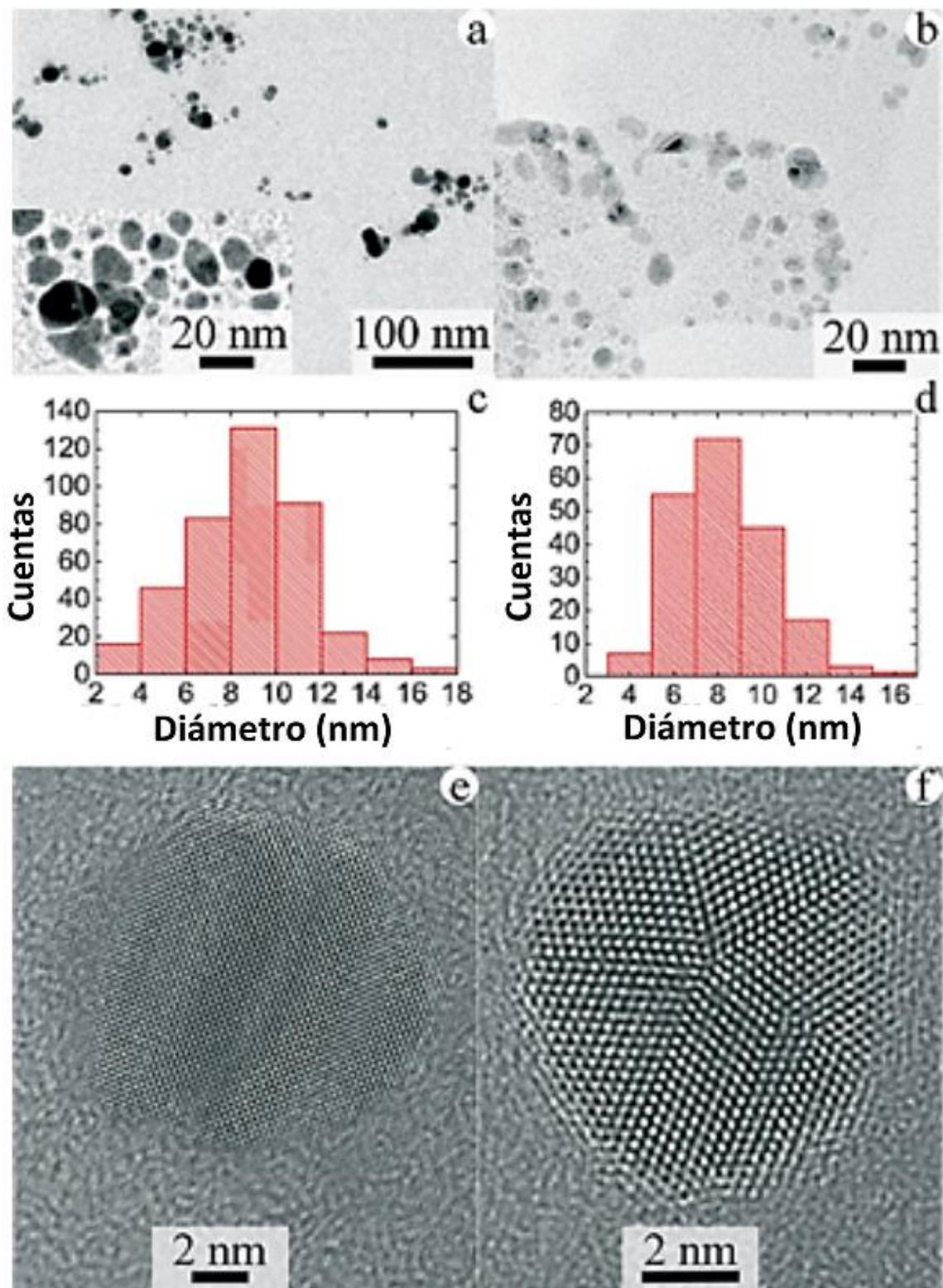


Figura 4.8. Imágenes TEM, histogramas de distribución de tamaño e imágenes HRTEM de las CIT-AgNPs [(a), (c) y (e)] y de las MBA-AgNPs [(b), (d) y (f)].

Además, esta clase de imágenes de HRTEM fueron simuladas como un decaedro de Marks para Ag y otros sistemas, como se realizó con las MBA–AgNPs de la síntesis I.^{49, 50}

La estructura del decaedro de Marks tiene 10 caras triangulares del tipo {111}, 10 caras de trapecios tipo isósceles {111} y 5 caras rectangulares {100}. Usando este modelo, puede verificarse que la superficie de tipo (111) tiene 104 átomos. De modo que la **Figura 4.7b** que corresponde a una MBA–AgNP, está compuesta por 521 átomos. Además, el plano (1 $\bar{1}$ 1) y el plano contiguo ($\bar{1}$ 11) tienen 70 átomos. La adición de átomos puestos sobre las caras de tipo {111} es 1392. El plano (100) contiene 48 átomos. Luego, los átomos de todas las caras de tipo {100} son 240. Por esta razón, el porcentaje de átomos ubicados sobre las caras de tipo {111} es: $1392/(1392+240)$. En otras palabras, la simulación de la imagen mostrada en la **Figura 4.8f**, involucra más del 85% de los átomos de la superficie ubicados en las caras de tipo {111}. Teniendo en cuenta el parámetro de red de la Ag, el diámetro de esta partícula es 5.1 nm. Para partículas de mayor tamaño, la relación de las caras tipo {111} sobre la cantidad total de caras de otras familias, disminuye. Sin embargo, para diámetros promedio cerca de 8.2 nm, como es el caso de las AgNPs sintetizadas, la relación sigue siendo mayor que 73% mostrando la predominancia de los planos (111) en estas NPs. La **Figura 4.7b** indica un tamaño de partícula menor que el tamaño promedio de las partículas para facilitar la explicación. Cuánto más grande sea la partícula, menos pronunciadas son las caras del decaedro de Marks.⁵¹

Un espectro de alta resolución de XPS de las MBA–AgNPs en la región S2p se muestra en la **Figura 4.9a**. La región S2p puede ser ajustada con una componente principal a una BE \approx 162.5 eV para el S2p_{3/2} (línea roja) asignada al enlace tipo tiolato–Ag y otro pico mucho más pequeño a 163.8 eV (línea azul) debida a las moléculas de MBA no quimisorbidas.^{50, 52} La relación (*r*) entre el área integrada del pico S2p a 162 eV y de la Ag3d, es una medida del cubrimiento del tiolato en la superficie de la AgNP. De esta manera se obtiene un valor de *r* = 0.50–0.53, en concordancia con las MBA–AgNPs suspendidas en medio alcalino.⁵⁰ La existencia del enlace tiolato–Ag implica que los grupos carboxilatos del MBA son expuestos a la parte exterior de la interfase de las

AgNPs, dando la posibilidad de que, dependiendo del pH (MBA sobre Ag $pK_a=5.8-6.0$),⁵³⁻⁵⁵ el grupo carboxilato cargado negativamente podría jugar un papel importante, en particular considerando las diferentes fuerzas que podrían tener lugar en la interface AgNPs/monocapa del fosfolípido que se discutirán en los capítulos siguientes. La región C1s puede ser ajustada con cuatro componentes: a 284.7–284.9 eV pico asignado al C enlazado al H y a otros átomos de C (línea naranja), otra a 286.1–286.4 eV (línea azul) debida al enlace $\underline{C}-COOH$ y $\underline{C}-OH$ (en las CIT-AgNPs) y la contribución del $\underline{C}OO^-$ y $\underline{C}OOH$ a 288.4–288.6 eV (línea fucsia) y a 289.8–290.6 eV (línea verde), respectivamente.⁵⁵⁻⁵⁷

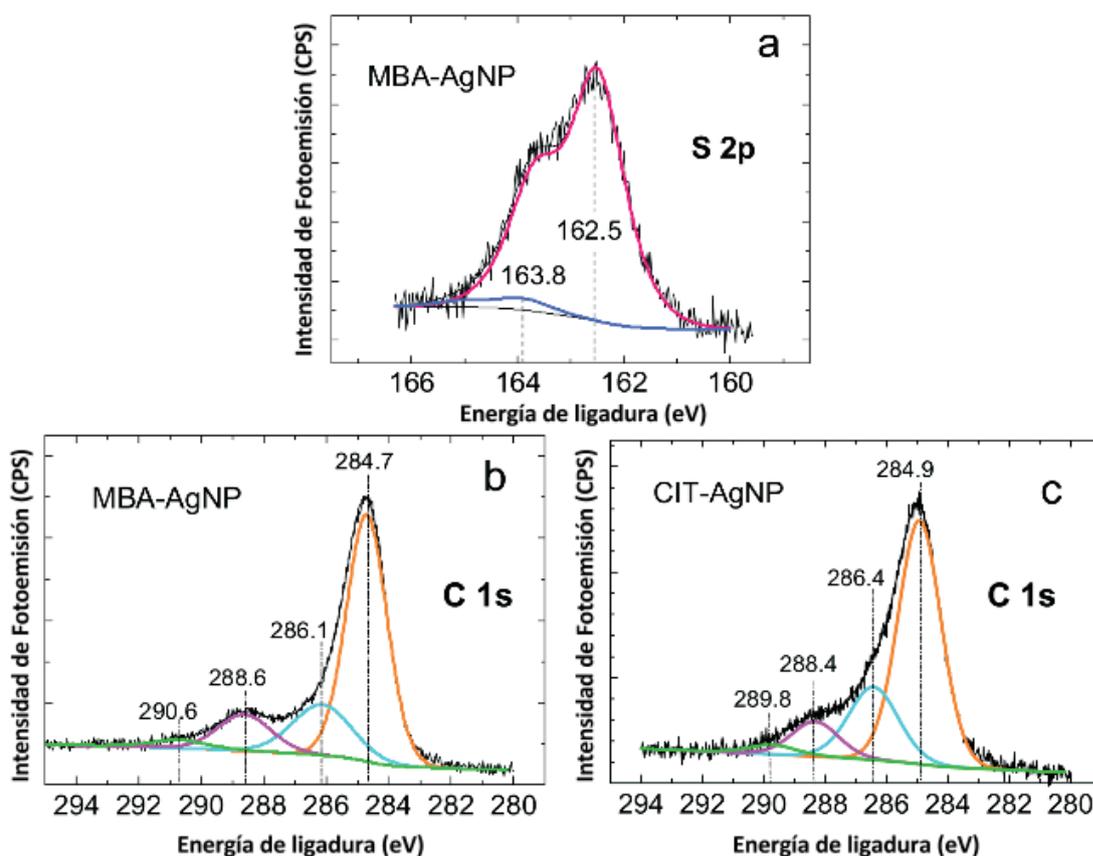


Figura 4.9. Espectros XPS: (a y b) MBA-AgNPs (c) CIT-AgNPs.

En (a) se obtienen dos componentes: una correspondiente a las moléculas del enlace tiolato-Ag (línea rosa) y la otra a las altas energías de enlace, correspondientes a los tioles fisisorbidos (línea azul). La región del carbono con sus cuatro componentes se encuentra descrita en el texto.

Algunos datos interesantes de las relaciones atómicas surgen del análisis cuantitativo de los componentes de los espectros obtenidos en las AgNPs y se presentan en la **Tabla 4.1**.

	$\text{COO}_{\text{total}}/\text{Ag}^{\text{a}}$	$\text{S}_{\text{total}}/\text{Ag}$
MBA–AgNPs	0.75	0.51
CIT–AgNPs	0.26	-
^a $\text{COO}_{\text{total}}$ corresponde a la suma de las contribuciones de COO^- y COOH .		

Tabla 4.1. Relaciones atómicas obtenidas de los espectros XPS de las MBA–AgNPs y las CIT–AgNPs.

Estos datos indican que la relación atómica de los grupos carboxílicos en las MBA–AgNPs es tres veces mayor que en las CIT–AgNPs.

En las MBA–AgNPs, la relación atómica $\text{COO}_{\text{tot}}/\text{S}$ debería ser 1 de acuerdo a la fórmula molecular del MBA mientras que el valor experimental es de $0.75/0.51=1.47$. Teniendo en cuenta la atenuación de los electrones emitidos por el S debido al espesor efectivo de la molécula,⁵⁸ la relación corregida $\text{S}_{\text{tot}}/\text{Ag}$ es de $0.51/0.88=0.58$, y por lo tanto $\text{COO}_{\text{tot}}/\text{S}=1.34$. Todavía hay un exceso de grupos carboxílicos respecto al S de acuerdo a la fórmula molecular. Esto podría deberse a un desplazamiento incompleto en el proceso de intercambio de ligandos de los aniones citrato por parte del MBA que conduce a una capa protectora compleja formada por ambas moléculas, como se ha propuesto para las AuNPs.⁵⁹⁻⁶¹

Del análisis de los datos XPS para las MBA–AgNPs surge entonces que la capa protectora de estas nanopartículas está compuesta por ambas moléculas, MBA y citrato. Es posible estimar la relación atómica CIT/MBA en su superficie de la siguiente manera: La relación atómica $\text{COO}_{\text{tot}}/\text{Ag}$ es 0.75 y S/Ag es 0.51. De la fórmula molecular de MBA (un átomo de azufre por grupo carboxílico) se debería esperar que $\text{COO}_{\text{tot}}/\text{Ag}$ sea 0.51. La diferencia

$0.75 - 0.51 = 0.24$, correspondería a grupos carboxílicos del citrato que no han sido desplazados por MBA durante el proceso de síntesis. Teniendo en cuenta que hay tres grupos carboxílicos por molécula de citrato, la relación CIT/Ag es 0.08 ($0.24/3$), mientras que MBA/Ag es 0.51. En conclusión, la superficie de las AgNPs está cubierta por ambas especies en una relación molecular MBA/CIT $\cong 6$.

Para las CIT–AgNPs, la relación atómica de 0.26 para $\text{COO}_{\text{tot}}/\text{Ag}$ es tres veces menor que en las AgNPs tioladas (0.75), lo que es un punto relevante para interpretar su comportamiento cuando interactúan tanto las CIT–AgNPs como las MBA–AgNPs con monocapas del fosfolípido DMPC, que se analizará en el capítulo de interacción de AgNPs con DMPC (**Capítulo 6**).

CONCLUSIONES

- ✓ Las imágenes HRTEM permiten resolver la estructura atómica de ambos tipos de AgNPs y confirman su naturaleza cristalina. Tanto las CIT-AgNPs como las MBA-AgNPs tienen una microestructura facetada, donde se exponen caras de tipo $\{111\}$ principalmente.
- ✓ La capa de MBA quimisorbida sobre Ag es más densa sobre la superficie de las AgNPs que en las superficies lisas de Ag debido a efectos de curvatura.
- ✓ Una pequeña degradación de la capa protectora de MBA tiene lugar sobre la superficie de las AgNPs, transformando el tiolato al correspondiente disulfuro. Este proceso conduce a la sinterización de las NPs incluso para una pequeña cantidad de degradación del tiolato.
- ✓ Del análisis de los datos XPS obtenidos para las MBA-AgNPs, se obtiene que la capa protectora de estas nanopartículas está compuesta por ambas moléculas, MBA y citrato, en una relación molecular MBA/CIT $\cong 6$.
- ✓ En las CIT-AgNPs, la relación atómica para $\text{COO}_{\text{tot}}/\text{Ag}$ es tres veces menor que en las AgNPs tioladas lo que es un punto relevante para interpretar su comportamiento cuando participen de interacciones electrostáticas en contacto con las cabezas polares de los fosfolípidos que constituyen los sistemas modelo de biomembranas empleados en esta tesis.

Referencias Bibliográficas

- [1] Luo, C.; Zhang, Y.; Zeng, X.; Zeng, Y.; Wang, Y., The role of poly(ethylene glycol) in the formation of silver nanoparticles. *Journal of colloid and interface science* **2005**, 288 (2), 444-448.
- [2] Sarkany, A.; Papp, Z.; Sajó, I.; Schay, Z., Unsupported Pd nanoparticles prepared by γ -radiolysis of PdCl₂. *Solid State Ionics* **2005**, 176 (1), 209-215.
- [3] Pal, S.; Tak, Y. K.; Song, J. M., Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **2007**, 73 (6), 1712-1720.
- [4] Narayanan, K. B.; Sakthivel, N., Coriander leaf mediated biosynthesis of gold nanoparticles. *Materials Letters* **2008**, 62 (30), 4588-4590.
- [5] Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J., A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society* **1951**, 11, 55-75.
- [6] Lee, P.; Meisel, D., Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *The Journal of Physical Chemistry* **1982**, 86 (17), 3391-3395.
- [7] Creighton, J. A.; Blatchford, C. G.; Albrecht, M. G., Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics* **1979**, 75, 790-798.
- [8] Scott, R. W.; Ye, H.; Henriquez, R. R.; Crooks, R. M., Synthesis, characterization, and stability of dendrimer-encapsulated palladium nanoparticles. *Chemistry of Materials* **2003**, 15 (20), 3873-3878.
- [9] Hou, Y.; Gao, S., Monodisperse nickel nanoparticles prepared from a monosurfactant system and their magnetic properties. *Journal of Materials Chemistry* **2003**, 13 (7), 1510-1512.
- [10] Sinha, A.; Das, S. K.; Kumar, T. V.; Rao, V.; Ramachandrarao, P., Synthesis of nanosized copper powder by an aqueous route. *Journal of Materials Synthesis and Processing* **1999**, 7 (6), 373-377.
- [11] Sastry, M.; Patil, V.; Mayya, K.; Paranjape, D.; Singh, P.; Sainkar, S., Organization of polymer-capped platinum colloidal particles at the air-water interface. *Thin Solid Films* **1998**, 324 (1), 239-244.
- [12] Cushing, B. L.; Kolesnichenko, V. L.; O'Connor, C. J., Recent advances in the liquid-phase syntheses of inorganic nanoparticles. *Chemical reviews* **2004**, 104 (9), 3893-3946.
- [13] Schmid, G., *Nanoparticles: from theory to application*. John Wiley & Sons: 2011.
- [14] Johans, C.; Clohessy, J.; Fantini, S.; Kontturi, K.; Cunnane, V. J., Electrosynthesis of polyphenylpyrrole coated silver particles at a liquid-liquid interface. *Electrochemistry communications* **2002**, 4 (3), 227-230.
- [15] Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J., Wet chemical synthesis of silver nanorods and nanowires of controllable aspect ratio. Electronic supplementary information (ESI) available: UV-VIS spectra of silver nanorods. See <http://www.rsc.org/suppdata/cc/b1/b100521i>. *Chemical Communications* **2001**, (7), 617-618.
- [16] Raveendran, P.; Fu, J.; Wallen, S. L., Completely "green" synthesis and stabilization of metal nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125 (46), 13940-13941.
- [17] Kreibitz, U.; Vollmer, M., *Optical properties of metal clusters*. Springer Science & Business Media: 2013; Vol. 25.
- [18] Evanoff, D. D.; Chumanov, G., Size-controlled synthesis of nanoparticles. 2. Measurement of extinction, scattering, and absorption cross sections. *The Journal of Physical Chemistry B* **2004**, 108 (37), 13957-13962.
- [19] Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C., The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment. *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, 107 (3), 668-677.
- [20] Li, X.; Zhang, J.; Xu, W.; Jia, H.; Wang, X.; Yang, B.; Zhao, B.; Li, B.; Ozaki, Y., Mercaptoacetic acid-capped silver nanoparticles colloid: formation, morphology, and SERS activity. *Langmuir* **2003**, 19 (10), 4285-4290.
- [21] He, S.; Yao, J.; Jiang, P.; Shi, D.; Zhang, H.; Xie, S.; Pang, S.; Gao, H., Formation of silver nanoparticles and self-assembled two-dimensional ordered superlattice. *Langmuir* **2001**, 17 (5), 1571-1575.
- [22] Sondi, I.; Goia, D. V.; Matijević, E., Preparation of highly concentrated stable dispersions of uniform silver nanoparticles. *Journal of colloid and interface science* **2003**, 260 (1), 75-81.

- [23] Cason, J. P.; Khambaswadkar, K.; Roberts, C. B., Supercritical fluid and compressed solvent effects on metallic nanoparticle synthesis in reverse micelles. *Industrial & engineering chemistry research* **2000**, *39* (12), 4749-4755.
- [24] Velikov, K. P.; Zegers, G. E.; van Blaaderen, A., Synthesis and characterization of large colloidal silver particles. *Langmuir* **2003**, *19* (4), 1384-1389.
- [25] Tan, Y.; Dai, X.; Li, Y.; Zhu, D., Preparation of gold, platinum, palladium and silver nanoparticles by the reduction of their salts with a weak reductant-potassium bitartrate. *Journal of Materials Chemistry* **2003**, *13* (5), 1069-1075.
- [26] Chen, D.-H.; Huang, Y.-W., Spontaneous formation of Ag nanoparticles in dimethylacetamide solution of poly (ethylene glycol). *Journal of colloid and interface science* **2002**, *255* (2), 299-302.
- [27] Esumi, K.; Suzuki, A.; Yamahira, A.; Torigoe, K., Role of poly (amidoamine) dendrimers for preparing nanoparticles of gold, platinum, and silver. *Langmuir* **2000**, *16* (6), 2604-2608.
- [28] Crooks, R. M.; Zhao, M.; Sun, L.; Chechik, V.; Yeung, L. K., Dendrimer-encapsulated metal nanoparticles: synthesis, characterization, and applications to catalysis. *Accounts of Chemical Research* **2001**, *34* (3), 181-190.
- [29] Maillard, M.; Giorgio, S.; Pileni, M.-P., Tuning the size of silver nanodisks with similar aspect ratios: synthesis and optical properties. *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107* (11), 2466-2470.
- [30] Chen, S.; Carroll, D. L., Synthesis and characterization of truncated triangular silver nanoplates. *Nano letters* **2002**, *2* (9), 1003-1007.
- [31] Sun, Y.; Yin, Y.; Mayers, B. T.; Herricks, T.; Xia, Y., Uniform silver nanowires synthesis by reducing AgNO₃ with ethylene glycol in the presence of seeds and poly (vinyl pyrrolidone). *Chemistry of Materials* **2002**, *14* (11), 4736-4745.
- [32] Zhang, J.; Han, B.; Liu, M.; Liu, D.; Dong, Z.; Liu, J.; Li, D.; Wang, J.; Dong, B.; Zhao, H., Ultrasonication-induced formation of silver nanofibers in reverse micelles and small-angle X-ray scattering studies. *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107* (16), 3679-3683.
- [33] Wang, Z., Transmission electron microscopy of shape-controlled nanocrystals and their assemblies. *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104* (6), 1153-1175.
- [34] Tao, A. R.; Habas, S.; Yang, P., Shape control of colloidal metal nanocrystals. *small* **2008**, *4* (3), 310-325.
- [35] Frenken, J.; Stoltze, P., Are vicinal metal surfaces stable? *Physical review letters* **1999**, *82* (17), 3500.
- [36] Azcárate, J. C.; Corthey, G.; Pensa, E.; Vericat, C.; Fonticelli, M. H.; Salvarezza, R. C.; Carro, P., Understanding the Surface Chemistry of Thiolate-Protected Metallic Nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry Letters* **2013**, *4*, 3127-3138.
- [37] Barnard, A. S.; Lin, X.; Curtiss, L. A., Equilibrium morphology of face-centered cubic gold nanoparticles > 3 nm and the shape changes induced by temperature. *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109* (51), 24465-24472.
- [38] Barnard, A. S.; Young, N. P.; Kirkland, A. I.; Van Huis, M. A.; Xu, H., Nanogold: a quantitative phase map. *ACS Nano* **2009**, *3* (6), 1431-1436.
- [39] Cleveland, C. L.; Landman, U.; Schaaff, T. G.; Shafiqullin, M. N.; Stephens, P. W.; Whetten, R. L., Structural evolution of smaller gold nanocrystals: The truncated decahedral motif. *Physical review letters* **1997**, *79* (10), 1873.
- [40] Battocchio, C.; Meneghini, C.; Fratoddi, I.; Venditti, I.; Russo, M. V.; Aquilanti, G.; Maurizio, C.; Bondino, F.; Matassa, R.; Rossi, M., Silver nanoparticles stabilized with thiols: a close look at the local chemistry and chemical structure. *The Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116* (36), 19571-19578.
- [41] Vericat, C.; Benitez, G. A.; Grumelli, D. E.; Vela, M. E.; Salvarezza, R. C., Thiol-Capped Gold: from Planar to Irregular Surfaces. *Journal of Physics: Condensed Matter* **2008**, *20* (18), 184004.
- [42] Luedtke, W. D.; Landman, U., Structure and Thermodynamics of Self-Assembled Monolayers on Gold Nanocrystallites. *Journal of Physical Chemistry B* **1998**, *102* (34), 6566-6572.
- [43] Padmos, J. D.; Zhang, P., Surface Structure of Organosulfur Stabilized Silver Nanoparticles Studied with X-ray Absorption Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116* (43), 23094-23101.
- [44] Battocchio, C.; Meneghini, C.; Fratoddi, I.; Venditti, I.; Russo, M. V.; Aquilanti, G.; Maurizio, C.; Bondino, F.; Matassa, R.; Rossi, M.; Mobilio, S.; Polzonetti, G., Silver Nanoparticles Stabilized with Thiols: A Close Look at the Local Chemistry and Chemical Structure. *Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116* (36), 19571-19578.

- [45] Farrag, M.; Thämer, M.; Tschurl, M.; Bürgi, T.; Heiz, U., Preparation and Spectroscopic Properties of Monolayer-Protected Silver Nanoclusters. *Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116* (14), 8034-8043.
- [46] Ling, T.; Xie, L.; Zhu, J.; Yu, H.; Ye, H.; Yu, R.; Cheng, Z.; Liu, L.; Yang, G.; Cheng, Z.; Wang, Y.; Ma, X., Icosahedral Face-Centered Cubic Fe Nanoparticles: Facile Synthesis and Characterization with Aberration-Corrected TEM. *Nano Letters* **2009**, *9* (4), 1572-1576.
- [47] Cortés, E.; Rubert, A. A.; Benítez, G.; Carro, P.; Vela, M. E.; Salvarezza, R. C., Enhanced Stability of Thiolate Self-Assembled Monolayers (SAMs) on Nanostructured Gold Substrates. *Langmuir* **2009**, *25* (10), 5661-5666.
- [48] Bagley, B. G., A Dense Packing of Hard Spheres with Five-fold Symmetry. *Nature* **1965**, *208* (5011), 674-675.
- [49] Tan, C. Y.; Chen, J. S.; Liu, B. H.; Chow, G. M., Microstructure of FePt nanoparticles produced by nanocluster beam. *Journal of Crystal Growth* **2006**, *293* (1), 175-185.
- [50] Maya Girón, J. V.; Zelaya, E.; Rubert, A.; Benítez, G.; Carro, P.; Salvarezza, R. C.; Vela, M. E., Surface Chemistry of 4-Mercaptobenzoic Acid Self-Assembled on Ag(111) and Ag Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C* **2013**, *117* (47), 24967-24974.
- [51] Maya Giron, J. V.; Vico, R. V.; Maggio, B.; Zelaya, E.; Rubert, A.; Benitez, G.; Carro, P.; Salvarezza, R. C.; Vela, M. E., Role of the capping agent in the interaction of hydrophilic Ag nanoparticles with DMPC as a model biomembrane. *Environmental Science: Nano* **2016**, *3* (2), 462-472.
- [52] Bensebaa, F.; Ellis, T. H.; Kruus, E.; Voicu, R.; Zhou, Y., Characterization of Self-Assembled Bilayers: Silver-Alkanethiolates. *Langmuir* **1998**, *14* (22), 6579-6587.
- [53] Wang, F.; Widejko, R. G.; Yang, Z.; Nguyen, K. T.; Chen, H.; Fernando, L. P.; Christensen, K. A.; Anker, J. N., Surface-Enhanced Raman Scattering Detection of pH with Silica-Encapsulated 4-Mercaptobenzoic Acid-Functionalized Silver Nanoparticles. *Analytical Chemistry* **2012**, *84* (18), 8013-8019.
- [54] Bishnoi, S. W.; Rozell, C. J.; Levin, C. S.; Gheith, M. K.; Johnson, B. R.; Johnson, D. H.; Halas, N. J., All-Optical Nanoscale pH Meter. *Nano Letters* **2006**, *6* (8), 1687-1692.
- [55] Vallée, A.; Humblot, V.; Al Housseiny, R.; Boujday, S.; Pradier, C.-M., BSA adsorption on aliphatic and aromatic acid SAMs: Investigating the effect of residual surface charge and sublayer nature. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, *109*, 136-142.
- [56] Urcuyo, R.; Cortés, E.; Rubert, A. A.; Benítez, G.; Montero, M. L.; Tognalli, N. G.; Fainstein, A.; Vela, M. E.; Salvarezza, R. C., Aromatic and aliphatic thiol self-assembled monolayers on Au: Anchoring and delivering copper species. *Journal of Physical Chemistry C* **2011**, *115* (50), 24707-24717.
- [57] Park, J.-W.; Shumaker-Parry, J. S., Structural Study of Citrate Layers on Gold Nanoparticles: Role of Intermolecular Interactions in Stabilizing Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (5), 1907-1921.
- [58] Laibinis, P. E.; Bain, C. D.; Whitesides, G. M., Attenuation of photoelectrons in monolayers of n-alkanethiols adsorbed on copper, silver, and gold. *The Journal of Physical Chemistry* **1991**, *95* (18), 7017-7021.
- [59] Zhang, S.; Leem, G.; Srisombat, L.-o.; Lee, T. R., Rationally Designed Ligands that Inhibit the Aggregation of Large Gold Nanoparticles in Solution. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (1), 113-120.
- [60] Duan, J.; Linman, M. J.; Chen, C.-Y.; Cheng, Q. J., CHCA-Modified Au Nanoparticles for Laser Desorption Ionization Mass Spectrometric Analysis of Peptides. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2009**, *20* (8), 1530-1539.
- [61] Park, J.-W.; Shumaker-Parry, J. S., Strong Resistance of Citrate Anions on Metal Nanoparticles to Desorption under Thiol Functionalization. *ACS Nano* **2015**, *9* (2), 1665-1682.

Capítulo 5

Interacción de CIT–AgNPs y MBA–AgNPs con bicapas del fosfolípido DMPC, soportadas sobre superficies lisas

En este capítulo se estudiará la interacción de los dos tipos de AgNPs que se emplearon en este trabajo de Tesis con bicapas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) en superficies lisas, de mica muscovita. La caracterización de estos sistemas se realizará mediante la Microscopía de Fuerzas Atómicas (AFM: *Atomic Force Microscopy*).

5.1. Introducción.

Las membranas biológicas contienen bicapas lipídicas como su unidad estructural básica, a las que las proteínas y los hidratos de carbono pueden estar asociados o unidos covalentemente. Las bicapas lipídicas son ensamblados de miles de moléculas de lípidos anfifílicos que se mantienen juntas por interacciones no covalentes. Dentro de las fuerzas no covalentes involucradas las fuerzas atractivas de van der Waals, las fuerzas electrostáticas de doble capa, las fuerzas de hidratación, las fuerzas estéricas y las fuerzas hidrofóbicas son las más relevantes.¹ Tales bicapas forman los límites entre citoplasma intracelular y el medio ambiente fuera de la célula, así como entre

el interior de muchas de las organelas de la célula y su citoplasma. Aunque esta estructura de bicapa lipídica fue reconocida primero como base de la arquitectura de la membrana celular en 1925,² el estudio detallado de la estructura de los lípidos de las membranas celulares comenzó hace sólo cuatro décadas. En 1972, Singer y Nicholson³ propusieron por primera vez un modelo de mosaico fluido para explicar la estructura de la membrana. La hipótesis de este modelo es que los lípidos y las proteínas difunden libremente en el plano de la membrana celular. Desde entonces, el descubrimiento de grandes dominios de la membrana (por ejemplo, basal, la membrana lateral y apical de la región glandular, células endoteliales y células epiteliales) y las estructuras de microdominios laterales (por ejemplo, balsas de lípidos, caveolas y depresiones revestidas), reveló la naturaleza compleja de la estructura de la membrana celular (**Figura 5.1**).⁴⁻⁶ En cuanto a la composición, además de todas las proteínas y los hidratos de carbono, los lípidos son los principales componentes de la fracción molar de la membrana celular.⁷

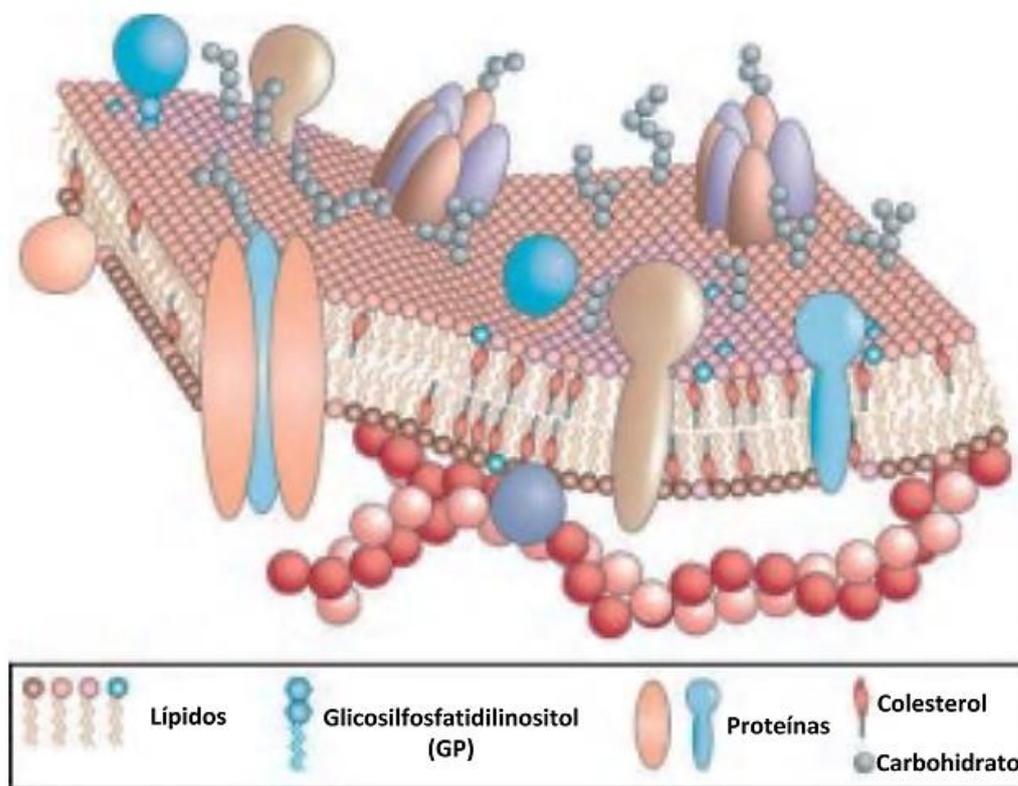


Figura 5.1. Modelo del mosaico fluido de la membrana celular. Como un mosaico, la membrana celular es una estructura compleja compuesta de muchas partes diferentes, tales como proteínas, fosfolípidos y colesterol. Las cantidades relativas de estos componentes varían de membrana a membrana, y los tipos de lípidos en las membranas también pueden variar.⁶

Los lípidos de membrana se pueden dividir en tres grupos de acuerdo a su estructura química: los lípidos a base de glicerol, colesterol y esfingolípidos basados en ceramida. Los lípidos a base de glicerol, se pueden dividir en dos categorías generales: glicosilglicéridos y fosfolípidos. Los fosfolípidos se dividen en diferentes grupos con base en sus grupos cabeza hidrofílicos: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina, que son los lípidos predominantes en la membrana celular, mientras que el fosfatidilinositol y el fosfatidilglicerol (la cardiolipina) están presentes en pequeñas cantidades. Los esfingolípidos tienen una base esfingoide como columna vertebral; estos lípidos imparten una mayor hidrofobicidad a la esencia de la bicapa lipídica. El colesterol tiene un grupo hidroxilo hidrofílico que interactúa con los grupos cabeza hidrofílicos de los fosfolípidos, mientras que la región voluminosa de esteroides interactúa con las cadenas hidrófobas de acilo de los lípidos. Entre otras propiedades físicas importantes de las membranas, estas interacciones regulan la fluidez, el empaquetamiento de la membrana lipídica y la formación de microdominios. Finalmente, los esfingolípidos tienen una característica principal que permiten la formación de una bicapa lipídica altamente impermeable debida a la naturaleza de estas moléculas.^{7, 8}

Se conoce muy bien que los componentes de la membrana no siempre están dispuestos de forma homogénea en la bicapa de la membrana de las células biológicas, sino más bien que están organizados en microdominios laterales complejos (**Figura 5.1**). Esta naturaleza polifórmica de la disposición de los lípidos, además de una variedad importante de lípidos con diferentes propiedades físicas (tal como, área de sección transversal, fluidez, carga eléctrica, peso molecular), es la razón por la que las membranas lipídicas sean estructuras extremadamente complejas.^{8, 9} Además, la asociación covalente con proteínas y carbohidratos se suma a la complejidad de la estructura de la membrana. Esta complejidad estructural de la membrana celular, junto con la naturaleza altamente dinámica de las interacciones lípido-lípido y lípido-proteína en la membrana celular, hacen muy difícil investigar las interacciones biofísicas con nanopartículas, fármacos y los sistemas de suministro de fármacos (*drug delivery*, en inglés). Por lo tanto, se han desarrollado sistemas

simplificados de membrana artificial, que imitan a la membrana lipídica natural.⁸

Debido a 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.¹⁰ Este tipo de organización está íntimamente relacionada con el diseño anfílico de las moléculas de los fosfolípidos, que tienen composición variable, pero fundamentalmente 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. 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 resulta en general negativa o bien neutra (*zwitterion*), teniendo en cuenta la carga negativa del grupo fosfato. Las cadenas hidrofóbicas pueden tener diferentes grados de insaturación, dependiendo de la funcionalidad de la membrana.¹¹

Los fosfolípidos por poseer capacidad de autoorganización, han atraído la atención en la fabricación de sistemas biomiméticos para el estudio de las propiedades básicas de las membranas, igualmente como soporte de diferentes tipos de macromoléculas en dispositivos de sensado, biocatálisis transporte de fármacos (*drug delivery*), recubrimiento de implantes, etc.¹²

5.2. Fusión de vesículas.

Dependiendo de condiciones específicas y de la naturaleza de los lípidos, se pueden formar tres tipos de agregados lipídicos cuando los lípidos anfipáticos se mezclan con el agua (**Figura 5.2**).

Las micelas son estructuras autoensambladas, generalmente esféricas, que contienen en su estructura desde unas pocas docenas a unos pocos miles de moléculas anfipáticas. Las micelas se encuentran en equilibrio dinámico con los monómeros. En agua, las micelas disponen las moléculas anfipáticas con sus regiones hidrofóbicas en el interior, donde está excluida el agua, y sus grupos cabeza hidrófilos en la superficie, en contacto con el agua. La formación de micelas se ve favorecida cuando el área de la sección transversal del grupo cabeza, es mayor que la de la cadena de acilo lateral (**Figura 5.2a**), como en los ácidos grasos libres, lisofosfolípidos (fosfolípidos que carecen de un ácido graso), y detergentes tales como el dodecilsulfato de sodio (SDS).¹

Un segundo tipo de agregados de lípidos en el agua es la bicapa, en el que dos monocapas de lípidos, forman una lámina bidimensional. La formación de la bicapa se produce más fácilmente cuando las áreas de sección transversal de la cadena de acilo lateral del grupo cabeza son similares, como en los glicerofosfolípidos y esfingolípidos, formando espontáneamente bicapas de aproximadamente 5nm de espesor. Las porciones hidrofóbicas en cada monocapa, excluidas de agua, interactúan entre sí. Los grupos cabeza hidrofílicos interactúan con el agua en cada superficie de la bicapa (**Figura 5.2b**). Debido a que las regiones hidrofóbicas en sus bordes están transitoriamente en contacto con el agua, la lámina de dos capas es relativamente inestable y espontáneamente forma un tercer tipo de agregado: se pliega sobre sí mismo para formar una esfera hueca, una vesícula o liposoma (**Figura 5.2c**). Mediante la formación de vesículas, las bicapas pierden sus zonas hidrofóbicas de borde, logrando una máxima estabilidad en su ambiente acuoso. Estas vesículas bicapa encierran agua, creando un compartimento acuoso separado. Es probable que los precursores

de las primeras células vivas se parecían a los liposomas, sus contenidos acuosos segregados del resto del entorno por una cobertura hidrofóbica.¹³ Las vesículas que se forman espontáneamente son multilamelares (MLVs) con una estructura que semeja a las capas de la cebolla; a partir de las MLVs, ya sea por extrusión o ultrasonificación, se pueden formar vesículas de tamaño definido como la que se muestra en la **Figura 5.2c**.

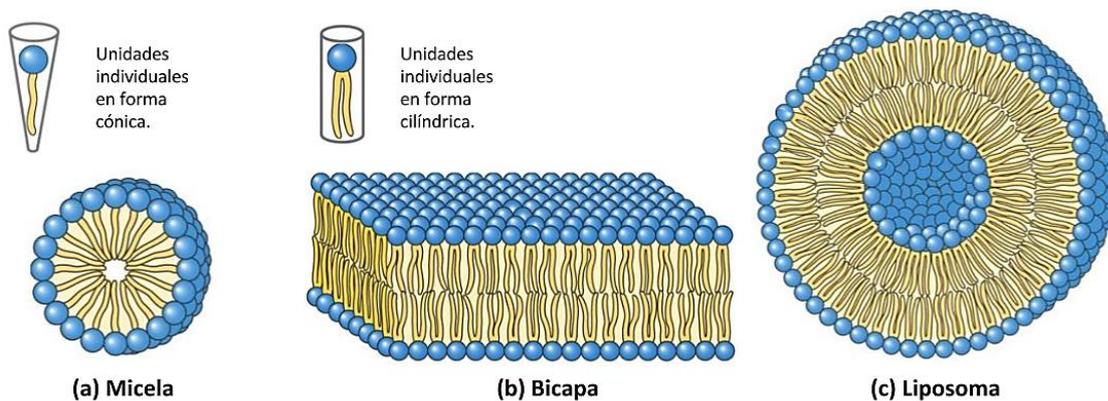


Figura 5.2. Agregados de lípidos anfipáticos que se forman en el agua. (a) Micela, la sección transversal de la cabeza es más grande que el de la cadena lateral. (b) Bicapa, la sección transversal de la cabeza es igual a la de la cadena lateral. (c) Liposoma, cuando una bicapa bidimensional se pliega sobre sí misma, se forma una bicapa cerrada, una vesícula tridimensional con un hueco que encierra una cavidad acuosa.¹³

La unión de dos vesículas separadas y la mezcla de su contenido acuoso, generan su fusión, el cual es un proceso espontáneo, aunque altamente regulado en los seres vivos. Debido a que estas vesículas son entes estables y para que esta unión se lleve a cabo, debe producirse un grado de estrés en la curvatura, que conduzca a una disminución de energía en el nuevo sistema. En las células este proceso está mediado por péptidos y proteínas que promueven la agregación y reordenamiento de la bicapa.¹⁴

Cuando una vesícula se pone en contacto con un sustrato, la vesícula adsorbida cambia de forma y se podría comparar con una gota de líquido adheriéndose a una superficie. Seifert y Lipowsky, desarrollaron teóricamente una forma simple de evaluar la unión y la estabilidad de las vesículas adsorbidas en la superficie. Proponen que la adsorción, la deformación y la

ruptura de las vesículas se determinan por el balance entre el aumento en la energía de adhesión (energía que se establece por el área de adhesión) y el costo energético en la curvatura de las vesículas (brindado por la flexibilidad de la bicapa).¹⁵ La **Figura 5.3** describe el mecanismo de fusión de vesículas de acuerdo a resultados de numerosas observaciones experimentales con distintas técnicas, entre las cuales caben destacar la microbalanza de cristal de cuarzo (QCM)¹⁶ y AFM,¹⁷ se pueden resumir en varias etapas.

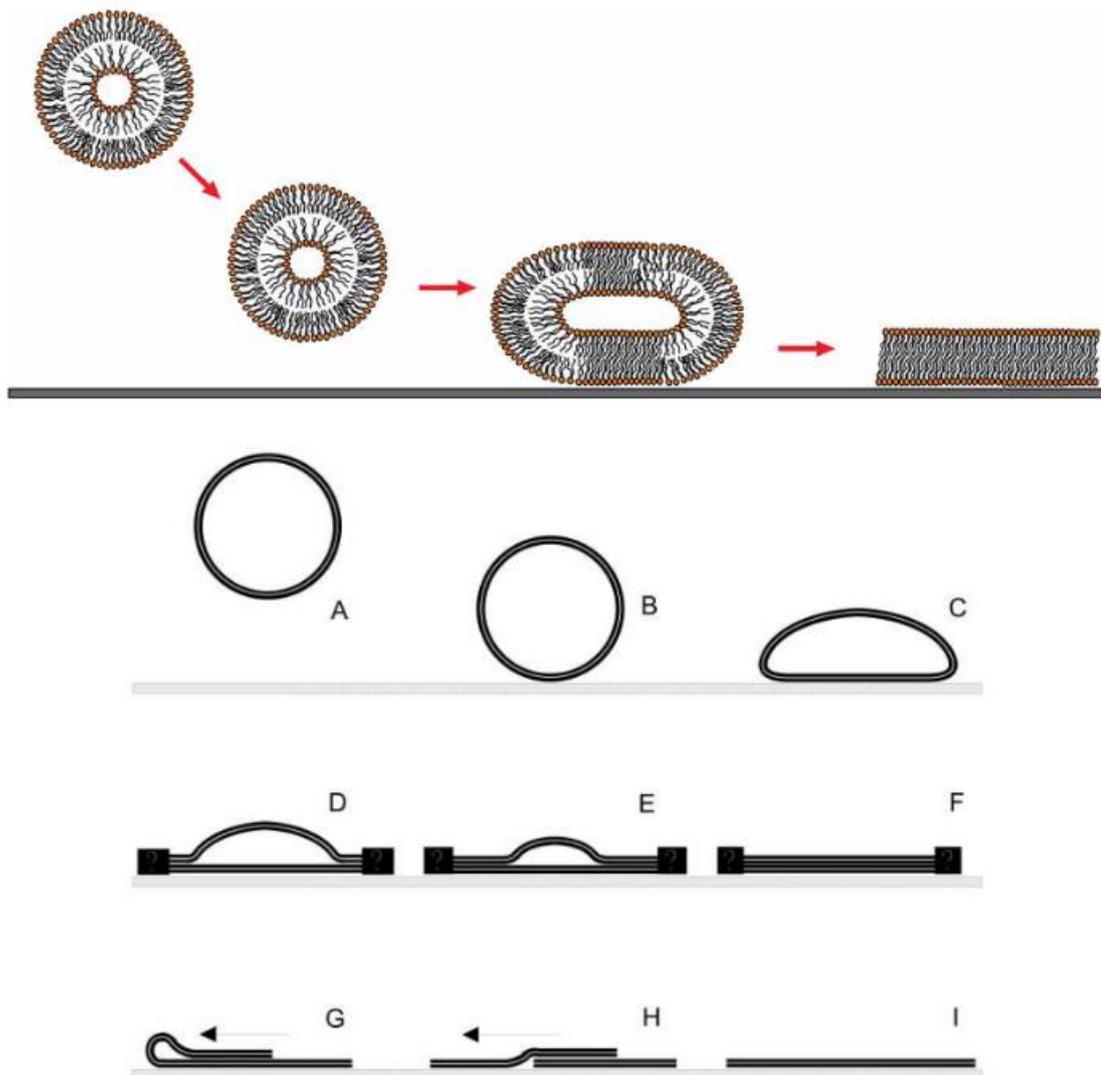


Figura 5.3. Proceso para la fusión de vesículas sobre una superficie. ^{18, 19}

Inicialmente, las vesículas o liposomas difunden desde la solución próxima a la superficie (**Figura 5.3A**), se adsorben (**Figura 5.3B**) y se agregan a la superficie (**Figura 5.3C**), hasta alcanzar una concentración crítica de vesículas adheridas. A medida que se adsorbe, empiezan a aplanarse los bordes (**Figura 5.3D**). Las áreas exteriores, aplanadas se expanden y propagan (**Figura 5.3E**), obteniendo una vesícula parcialmente aplanada (**Figuras 5.3D y 5.3E**). La vesícula colapsa para formar dos bicapas (**Figura 5.3F**) apiladas una encima de la otra. La bicapa más alta, se mueve desde la inferior a las áreas no ocupadas en la superficie. Este movimiento puede ocurrir por dos mecanismos, bicapas laminadas como en la **Figura 5.3G** y deslizantes como en la **Figura 5.3H**, en ambos casos se obtiene una estructura de bicapa única (**Figura 5.3I**).¹⁹

La fusión de vesículas es una de las vías más útiles para la creación de bicapas lipídicas soportadas (SLBs). Este proceso de formación es importante desde el punto de vista biofísico y podría ayudar a entender las características de los fenómenos relacionados, como lo es la fusión de membranas mediada por proteínas de fusión o el reconocimiento molecular.²⁰ Además, ofrece perspectivas interesantes a la nanobiotecnología, por ejemplo, el diseño de biosuperficies patrón con diferentes funcionalidades. Por otro lado, estas estructuras ofrecen la posibilidad de aplicar una serie de técnicas analíticas superficiales que serían difíciles de utilizar en las membranas reales, tales como espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS) y AFM.¹⁸

Algunos de los factores que afectan la adsorción y fusión de vesículas a soportes sólidos son: la composición y concentración lipídica de la vesícula, el tamaño, la densidad de carga superficial, la rugosidad y limpieza de la superficie, el pH de la solución, la fuerza iónica, la presión osmótica de las vesículas, la temperatura, y la presencia de cationes divalentes (especialmente Ca^{2+} y Mg^{2+}).²⁰⁻²³ Sin embargo, el proceso de fusión de vesículas, se puede mejorar mediante el calentamiento,²⁴ la creación de un gradiente osmótico a través de la membrana de la vesícula²¹ y por la adición de agentes fusigénicos tales como polietilenglicol.²⁵ En comparación con la deposición LB, los inconvenientes del método de fusión, están asociados a la

imposibilidad de preparar bicapas asimétricas compuestas de dos capas de diferente naturaleza y la falta de control de la presión lateral en las capas de lípidos. Sin embargo, el enfoque de fusión es más simple y permite la difusión de lípidos.¹⁸

Las variedades de sustratos capaces de soportar las bicapas de fosfolípidos son algo limitadas. Con el fin de soportar una membrana de alta calidad (es decir, poco o nada de defectos y alta movilidad de lípidos) la superficie debe ser hidrófila, lisa y limpia. Los mejores sustratos utilizados son sílice fundida,^{26, 27} vidrio de borosilicato,^{26, 28} mica^{29, 30} y silicio oxidado.²⁶ Se han hecho ensayos para depositar bicapas soportadas en monocristales de TiO₂ y SrTiO₂ así como en películas delgadas de SiO₂ sobre cristales LiNbO₃.³¹⁻³³ Las películas delgadas se pueden utilizar también como soportes sólidos, entre los cuales está TiO₂,²¹⁻²³ óxido de indio-estaño,^{24, 34} oro,^{35, 36} plata³⁷ y platino.³⁸

De todos los sustratos mencionados, la mica muscovita es uno de los más utilizados; debido a que es una superficie plana a nivel atómico y su química superficial permite la formación de bicapas por fusión espontánea de vesículas.³⁹ Además, es un mineral en capas no conductor compuesto de múltiples capas de 1 nm de espesor, que puede ser fácilmente escindido con la ayuda de cinta adhesiva para producir superficies limpias, atómicamente planas.¹⁸ La principal ventaja al utilizar soportes sólidos es claramente el aumento en la robustez y estabilidad de las bicapas lipídicas. Resultan sumamente importantes también la capacidad de investigar las interacciones que ocurren en la superficie de la membrana con técnicas analíticas que son específicas de la superficie (por ejemplo, AFM, QCM, SPR, etc).⁴⁰

Finalmente, existe una gran variedad de técnicas experimentales útiles para estudiar las propiedades de las membranas lipídicas soportadas y no soportadas, como la resonancia magnética nuclear, la reflectividad de neutrones, los métodos de reflexión de rayos X y la difracción, la microscopía de fluorescencia, la microscopía de ángulo de Brewster, la elipsometría, la espectroscopia de fotoelectrones de rayos X, y la espectrometría de masas de iones secundarios. Entre ellas, el AFM en medio líquido, surgió como una

técnica específica para obtener imágenes de la organización lateral de las bicapas lipídicas soportadas (SLBs). La principal ventaja que posee esta técnica con respecto a otras es que la estructura de las muestras biológicas, tal como las membranas celulares o lipídicas, se puede explorar no sólo en medios líquidos, sino también en tiempo real con resolución nanométrica.⁶

5.3. Caracterización mecánica de membranas lipídicas.

Las bicapas lipídicas se encuentran estrechamente relacionadas con el funcionamiento de la biomembrana, debido no sólo a su papel estructural bajo una compleja combinación de fuerzas⁴¹ sino también a su contribución a la función de varias proteínas de membrana.^{42, 43} Por lo tanto, existe un continuo interés en la comprensión de la interacción entre la organización lateral de lípidos y la función general de la membrana. Como también, de las propiedades mecánicas de las bicapas lipídicas, que han sido evaluadas a través de diferentes técnicas.⁴⁴⁻⁴⁹

Durante la última década, la espectroscopia de fuerza basada en AFM (*FS: Force Spectroscopy*, por sus siglas en inglés) se ha convertido en una herramienta esencial para caracterizar cuantitativamente las propiedades mecánicas de las membranas lipídicas, con la ventaja de tener una alta sensibilidad y versatilidad en regiones espaciales, así como también la posibilidad de localizar y sondear áreas confinadas de las membranas en condiciones de ambiente controlado.⁶

La espectroscopia de fuerza basada en AFM ha demostrado ser una técnica apta para examinar las propiedades mecánicas de una amplia variedad de sistemas en la nanoescala. Entre las más destacadas, vale la pena mencionar la indentación de materiales duros durante la aproximación de la punta a la superficie⁵⁰ y el estiramiento de estructuras macromoleculares discretas como polisacáridos⁵¹, proteínas⁵² y ADN⁵³; mientras que la punta se retrae alejándose de la superficie. El papel de esta técnica es medir directamente las fuerzas de interacción cuando un pequeño número de

moléculas están participando. En el caso de las membranas lipídicas, la FS es importante en términos de precisión espacial y resolución de la fuerza. Normalmente, las medidas de FS se realizan en condiciones de velocidad constante, es decir, la deflexión del cantiléver se mide mientras que la punta se aproxima y retrae de la superficie. Cuando se conoce la constante elástica del cantiléver, la deformación medida se convierte en la fuerza.⁶

5.4. Parte Experimental.

5.4.1. Reactivos.

El fosfolípido 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DMPC) fue comprado a Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). El resto de los reactivos y solventes empleados fueron del mejor grado analítico disponible. Para las soluciones acuosas se empleó siempre agua tipo MilliQ (18.2 M Ω cm).

5.4.2. 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 obtenida, se sonicó brevemente para formar vesículas unilamelares.

5.4.3. Preparación de bicapas de DMPC.

Para la formación de las bicapas lipídicas, se emplearon como sustratos, 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 N₂ para evitar la posible ruptura o deformación de las bicapas y conservaron su humedad superficial durante su manipulación al aire, utilizando un recipiente cerrado donde se aseguraba la saturación de humedad a través de un algodón embebido en agua.

5.4.4. Caracterización mediante AFM.

Las medidas experimentales realizadas con AFM se llevaron a cabo en modo contacto y modo intermitente (*tapping mode*) con un microscopio Multimode controlado por una unidad Nanoscope V (Digital Instruments, Inc.). Se empleó, una celda de líquidos (*in situ*) a temperatura ambiente (~ 24°C), conteniendo buffer fosfato 10 mM pH 7.4. Se emplearon puntas de Si₃N₄ (cantilévers triangulares con una constante elástica (*k*) de 0.12 N/m, Veeco Probes) para las medidas de contacto y para las de tapping se usaron puntas cuya *k* fue de 20 N/m. Las imágenes se analizaron usando el programa Nanoscope versión 7.3 y Nanoscope Analysis 1.5.

5.5. Fusión de vesículas de DMPC sobre mica.

Para la fusión de vesículas de DMPC, la suspensión de vesículas (0.5 mg/mL) mezclada con CaCl₂ 0.1 M y HEPES 0.05 M se puso en contacto durante 15 min a temperatura ambiente (~24°C) sobre una superficie de mica recién exfoliada. Transcurrido este tiempo, la mica modificada se colocó a 40–50°C sobre una plancha de calentamiento dentro de un recipiente cerrado con un algodón embebido en agua, durante 15 min más. Luego se enjuagó con agua tipo Milli-Q y se colocó en la celda de líquidos del AFM. La imagen *in situ* (**Figura 5.4**) muestra una zona completamente cubierta por una bicapa de DMPC (**Figura 5.4a**), cuyo perfil de altura característico de 5 nm se muestra en la **Figura 5.4b**. Este valor corresponde a los datos de espesor de bicapa de

DMPC reportados en la literatura, los cuales oscilan entre 4.2 – 5 nm.^{39, 54} Existen dominios de diferentes fases para el 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 la “líquida” (menor altura).³⁹ Algunas 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.

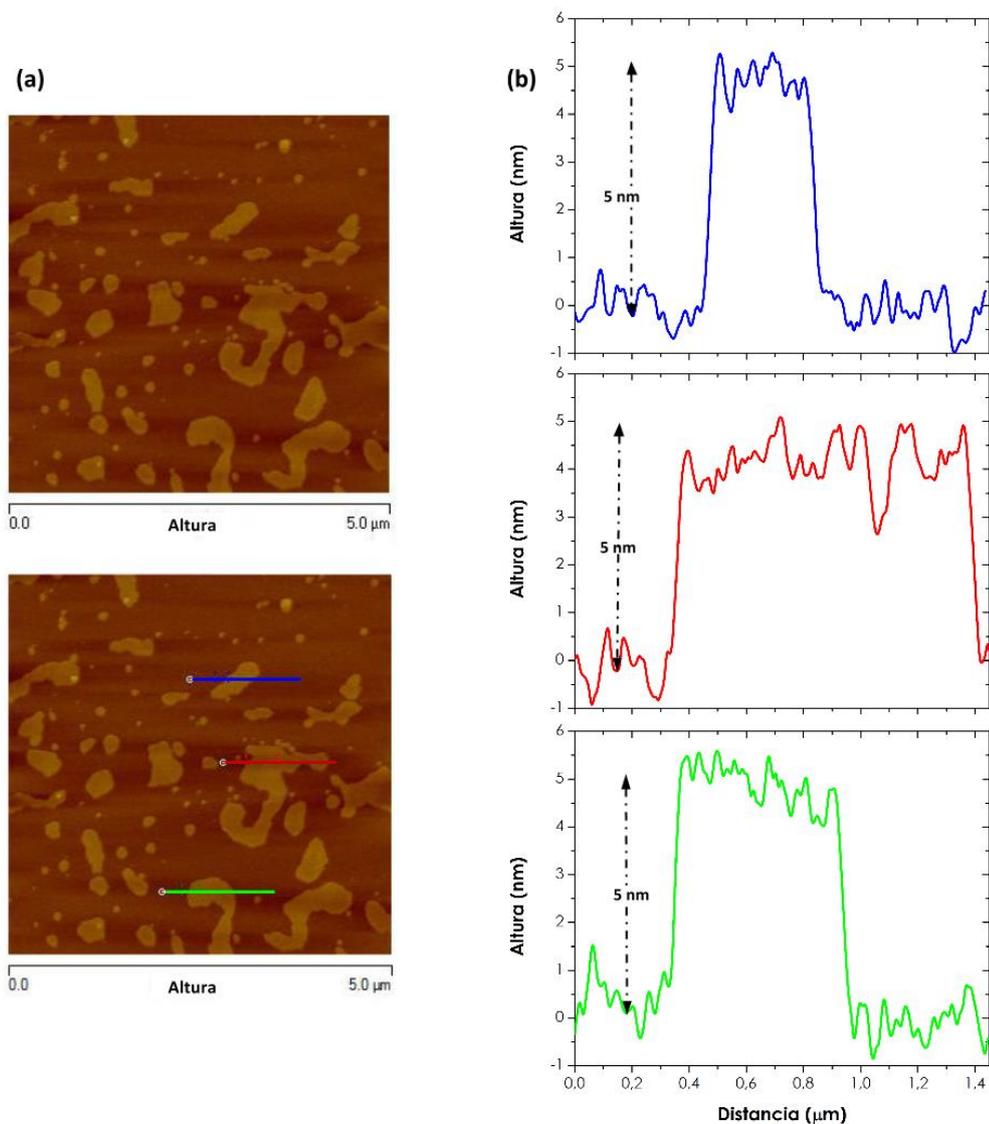


Figura 5.4. (a) Imágenes de AFM *in situ* en modo contacto ($5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$) en la celda de líquidos de la superficie de la mica después de la fusión de vesículas de DMPC, tomada a $\sim 24^\circ\text{C}$ en buffer fosfato 10mM pH 7.4. (b) Perfiles de altura de la bicapa formada.

Además de la caracterización de la altura y cubrimiento por la fusión del DMPC soportado sobre mica, se midieron curvas de fuerza resultantes de un análisis de *Force Volume*, el cual consiste en un análisis conjunto de curvas de fuerza individuales medidas en el centro de los dominios de la bicapa.

Cuando la punta del cantilever está lejos de la bicapa de DMPC, no hay ninguna interacción mecánica entre la punta y la bicapa, como se indica en la **Figura 5.5a, 5.5b (A)**. Al acercarse aún más la punta a la bicapa, se produce contacto mecánico. A medida que la punta se aproxima a la muestra, las interacciones de corto alcance aumentan entre la punta y la muestra. Estas fuerzas de interacción tienen diferentes orígenes, siendo las más notables las fuerzas de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) (que corresponden a la carga de la llamada capa difusa y de las fuerzas de van der Waals), las fuerzas de hidratación, y las fuerzas estéricas.⁵⁵ El origen y la magnitud de estas fuerzas dependen indudablemente de la composición química de la bicapa, la química de la punta, y las propiedades fisicoquímicas del medio líquido. Comúnmente, la combinación de estas fuerzas da lugar a unos pocos piconewtons. Entonces, la bicapa se deforma elásticamente por la punta (**Figura 5.5a y 5.5b (B)**), hasta que rompe la membrana y se pone en contacto con el sustrato (**Figura 5.5a y 5.5b (C)**).

En la **Figura 5.5a** se observa una discontinuidad en la curva de fuerza; esto se interpreta como la penetración de la punta a través de la bicapa.⁵⁶ La fuerza vertical en la que ocurre esta discontinuidad es la fuerza máxima que la bicapa es capaz de soportar antes de romperse y se llama fuerza de ruptura (*F_b*: *breakthrough force*, por sus siglas en inglés). Esta discontinuidad mide alrededor de 4–5 nm de separación medida en el eje de abscisas, que se correlaciona con la altura de una bicapa lipídica. Tal evento de ruptura se produce normalmente en varios nanonewtons de fuerza. Análoga a la fuerza requerida para indentar materiales duros como cristales individuales,⁵⁷ la fuerza de deshibridación del ADN,^{58, 59} o la fuerza de despliegue de las proteínas individuales,⁶⁰ la fuerza de ruptura y su magnitud durante la indentación de bicapas lipídicas, es claramente la huella dactilar de la estabilidad mecánica de estos sistemas en las condiciones experimentales en las que se realizan las

medidas. Se han informado diferentes variables que afectan la estabilidad mecánica de las bicapas lipídicas y, como consecuencia, la magnitud de F_b ; entre ellas la temperatura, la química de los lípidos, el pH, la fuerza iónica, y la composición del electrolito.⁶¹⁻⁶³

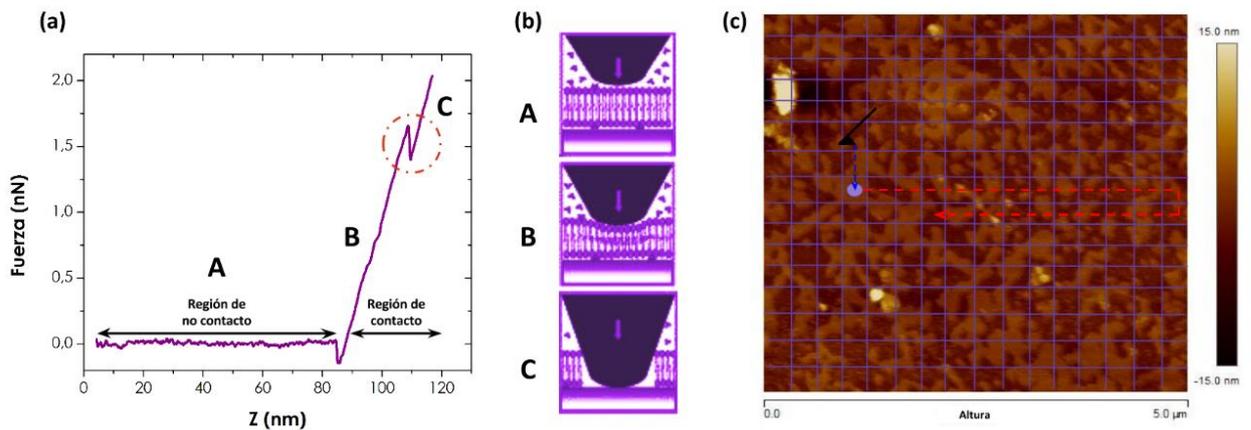


Figura 5.5. Estabilidad mecánica de una bicapa lipídica de DMPC con AFM – FS. (a) Gráfico típico de la fuerza vertical con respecto del movimiento de aproximación de la punta. Se pueden distinguir tres diferentes regiones en la curva asociada con la evolución descrita en (b): A – la punta y la muestra aún no están en contacto mecánico; B – la punta deforma elásticamente la bicapa lipídica; y C – la punta rompe la muestra, poniéndose en contacto con el sustrato de mica. (c) Una cuadrícula de 16x16 que ilustra el “mapeo de *force volume*”, donde las curvas de fuerza vs. distancia, se realizan en cada componente de la cuadrícula a través de una superficie (en este caso $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$).

No todas las curvas de fuerza presentan el quiebre tal como se ha visto previamente en la literatura. En un total de 256 curvas de fuerza (cuadrícula de 16x16) se observan eventos de ruptura en el 91% de las curvas, tal como se indica en el histograma de la **Figura 5.6**. La fuerza de ruptura de la bicapa lipídica para cada fosfolípido depende de la temperatura y de la composición de la solución en contacto con la bicapa.

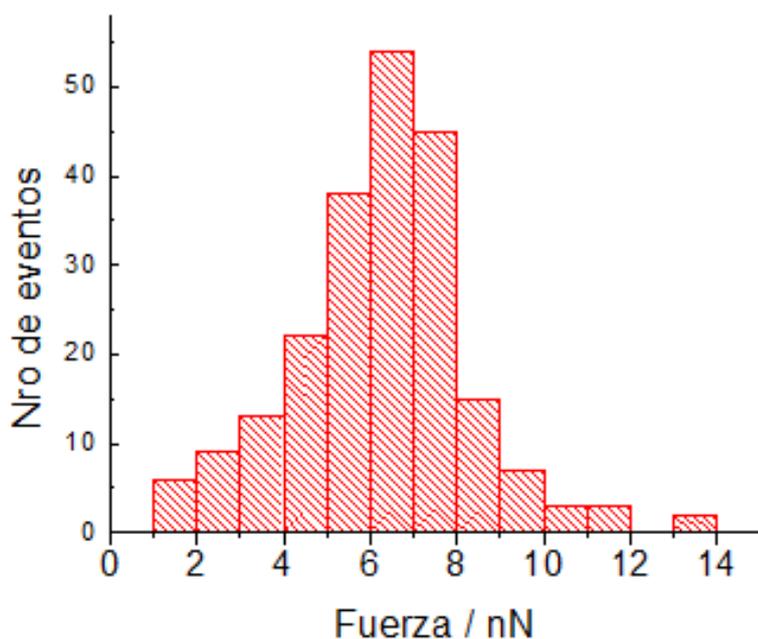


Figura 5.6. Histograma de los eventos de ruptura para un análisis de *Force Volume* de 16x16 curvas de fuerza.

5.6. Caracterización de CIT–AgNPs y MBA–AgNPs sobre mica.

Otras de las medidas hechas de caracterización de las AgNPs empleadas en este Trabajo de Tesis, consistió en la adquisición de imágenes topográficas de AFM en modo contacto al aire tanto de las CIT–AgNPs como las MBA–AgNPs, sobre el sustrato de mica. Para este procedimiento, se gotearon las AgNPs sobre la mica activada previamente con CaCl_2 0,1M para favorecer su inmovilización y luego, se secaron con un flujo suave de N_2 .

Una de las imágenes obtenida para las CIT–AgNPs, se observa en la **Figura 5.7a**, y su correspondiente perfil de altura en la **Figura 5.7b**. Estos valores de alturas obtenidos con esta técnica de AFM, se pueden comparar con los reportados en el *Capítulo 3, Sección 3.3.2.1*; donde se tienen diámetros promedio de 8.7 ± 2.5 nm utilizando HRTEM. Si bien la técnica de AFM no es muy precisa con estos valores, debido a efectos de convolución debido al radio de curvatura de la punta, se obtienen valores promedio similares de algunas CIT–AgNPs individuales teniendo en cuenta la medida en altura de las

mismas y no su dimensión lateral, que es la que está afectada por los efectos antes mencionados.

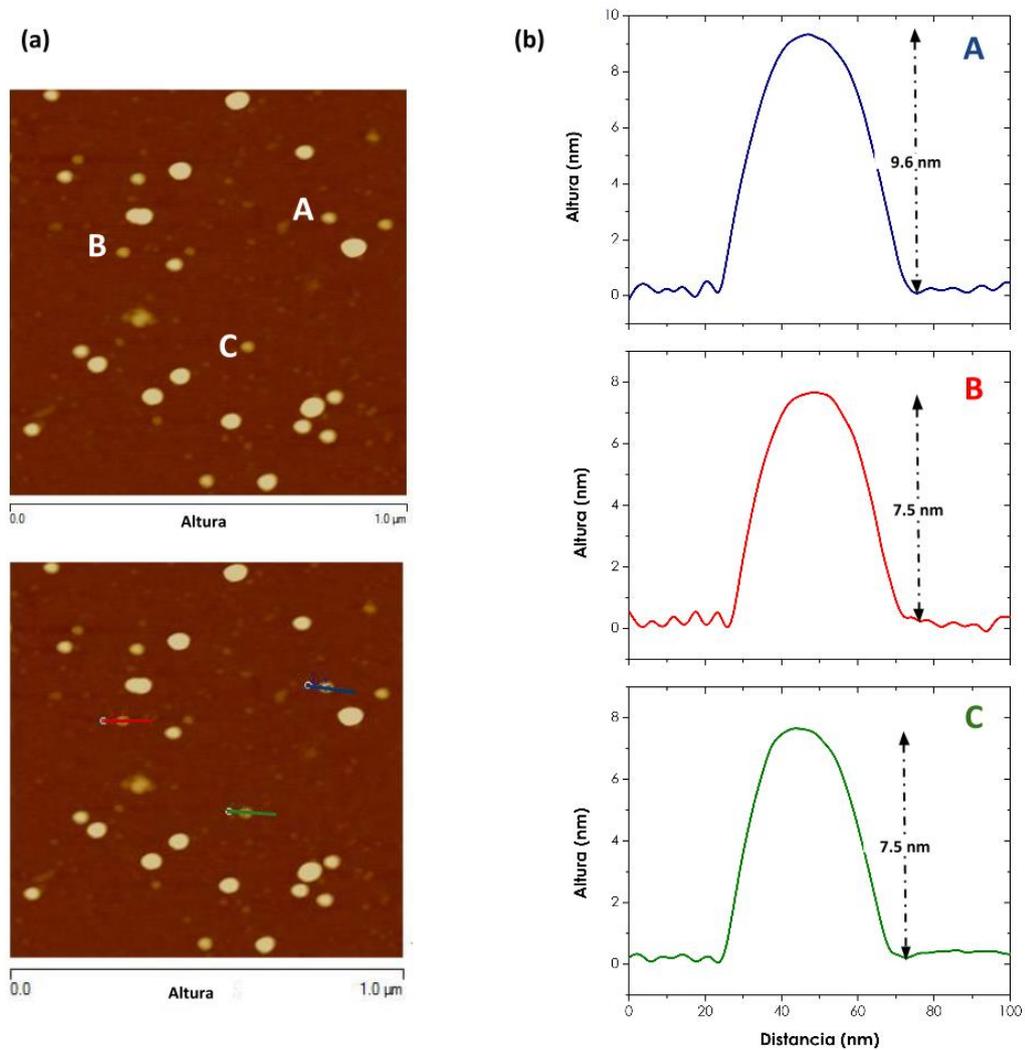


Figura 5.7. (a) Imagen de AFM en modo contacto al aire ($1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$) de la superficie de la mica después de gotear CIT-AgNPs. (b) Perfiles de altura de algunas CIT-AgNPs individuales.

Por otra parte, para las MBA-AgNPs se obtuvieron imágenes similares tales como la mostrada en la **Figura 5.8a**, empleando la misma técnica de AFM modo contacto al aire y realizando el mismo procedimiento de goteo; pero, observándose que este tipo de AgNPs presentan una mayor coalescencia. En el perfil de alturas obtenido en la **Figura 5.8b**; se observa que una de las NPs

seleccionadas para analizar su perfil de altura (**Línea azul, letra A**) tiene una altura promedio de 9,8 nm, valor que se encuentra comprendido en los valores obtenidos por HRTEM (*Capítulo 3, Sección 3.3.2.1*); de 8.2 ± 2.1 nm para las MBA–AgNPs. En otros casos se obtienen valores mayores, tal como el valor de altura obtenido de 17.2 nm para la **Línea roja, letra B** y 40.7 nm para la **Línea verde, letra C**. En estos dos últimos casos, las alturas corresponderían a la presencia de aglomerados (clústeres) de MBA–AgNPs.

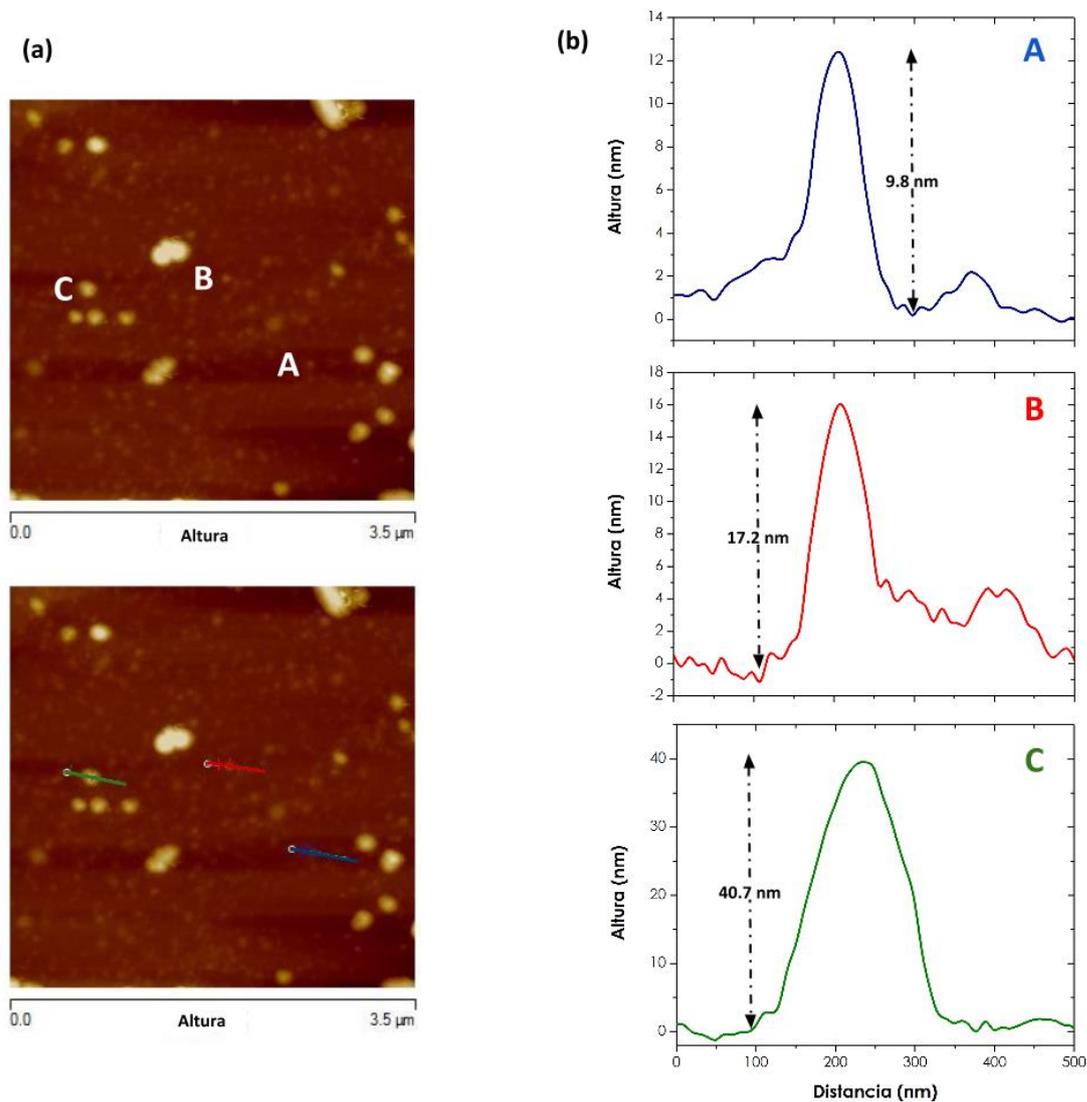


Figura 5.8. (a) Imagen de AFM en modo contacto al aire ($3,5\mu\text{m} \times 3,5\mu\text{m}$) de la superficie de la mica después de gotear MBA–AgNPs. (b) Perfiles de altura de algunas MBA–AgNPs.

5.7. Interacción de DMPC con CIT-AgNPs y MBA-AgNPs.

La encapsulación de nanopartículas en vesículas de fosfolípidos ofrece una ruta biológicamente inspirada en el diseño de agentes terapéuticos y como un medio para reducir la toxicidad de las nanopartículas. Los conjugados de lípidos/NPs híbridas, tienen diversas aplicaciones biomédicas, incluyendo imágenes de células cancerosas, *drug delivery*, terapia focalizada, inmunoensayos, separación células/proteínas, biosensores, etc. En la actualidad, se sabe poco acerca de la influencia de las nanopartículas sobre las propiedades fisicoquímicas de las vesículas lipídicas tales como la estabilidad, elasticidad, fluidez de la membrana y el comportamiento de fase de la bicapa.⁶⁴

Por otra parte, las NPs pueden diseñarse para ser altamente eficaces para penetrar en la membrana plasmática y así alterar los procesos naturales dentro de la célula. De esta manera, sirven como excelentes portadores de cargas terapéuticas a través de la membrana, probablemente debido a los mecanismos de internalización como ruptura física, el transporte mediado a través de la membrana, formación de poros, etc. Recientes estudios sobre los efectos de diferentes NPs metálicas sobre la estabilidad de la membrana y/o la deformación, han revelado que la incorporación de NPs metálicas dentro de la membrana ha alterado el comportamiento de los lípidos provocando una disminución de la temperatura de transición de fase y el aumento de la fluidez de la bicapa. Dado que el comportamiento de la fase polimórfica de los lípidos influye en diferentes procesos relacionados con la membrana, es muy importante estudiar el efecto de la interacción de NPs con diferentes membranas lipídicas.⁶⁵

El proceso de adsorción de NPs en moléculas de lípidos es generalmente favorecido debido su alta relación de aspecto. La presencia de NPs cargadas en la matriz lipídica es termodinámicamente desfavorable puesto que el interior hidrofóbico de la bicapa lipídica altera el balance de fuerzas. Como resultado se forman poros transitorios o agujeros dentro de la bicapa lipídica, que a su vez disminuyen la anisotropía.⁶⁶

En vesículas lipídicas, la encapsulación de NPs puede lograrse atrapando las partículas dentro del núcleo acuoso o en la bicapa hidrofóbica. Para ser incluidas en la bicapa lipídica, las NPs deben poseer dos características importantes. Deben ser más pequeñas en tamaño para caber dentro de una bicapa lipídica y deben tener una superficie hidrófoba (por recubrimiento con agentes apropiados). Cuando las NPs están atrapadas dentro de las bicapas, pueden conducir a cambios en el empaquetamiento de lípidos y pueden perturbar las interacciones lípido-lípido entre los grupos cabeza y/o las colas de acilo. La alteración de estas interacciones entre lípidos, puede resultar en cambios en el comportamiento de fase de la bicapa lipídica, que se relaciona con el grado de ordenamiento de los lípidos y la viscosidad de la bicapa. Cuando algunas proteínas o NPs cargadas se adsorben en la superficie celular, la membrana se somete a deformación y los lípidos constituyentes de las bicapas, se reorganizaron debido a la interacción electrostática entre los lípidos y NPs/proteínas. Puesto que la membrana está cargada negativamente, las NPs cargadas positivamente son atraídas más hacia la superficie de la membrana celular y muestran niveles más altos de internalización, en comparación con partículas sin carga y con carga negativa. Por lo tanto, dependiendo de su tamaño y su química superficial, las NPs incrustadas pueden influir en la estabilidad y la función de las vesículas híbridas, en la formación de dominios, en la separación de fases, etc.⁶⁶

Dependiendo del tamaño, la carga electrostática y la hidrofobicidad, la nanopartícula puede ser en parte o totalmente atrapada en la bicapa. Tres posibilidades diferentes de interacción de NPs se muestran en la **Figura 5.9**. La primera posibilidad, indica una estructura en la que una nanopartícula se incrusta parcialmente en la bicapa o descansa sobre la superficie de la vesícula. La segunda posibilidad muestra que la nanopartícula se extiende por la región hidrófoba creando un contacto equivalente con las dos poblaciones de cadenas hidrocarbonadas. El tercer modo representa el atrapamiento de la nanopartícula perfectamente en el centro de la bicapa debido a las interacciones hidrófobas.⁶⁷

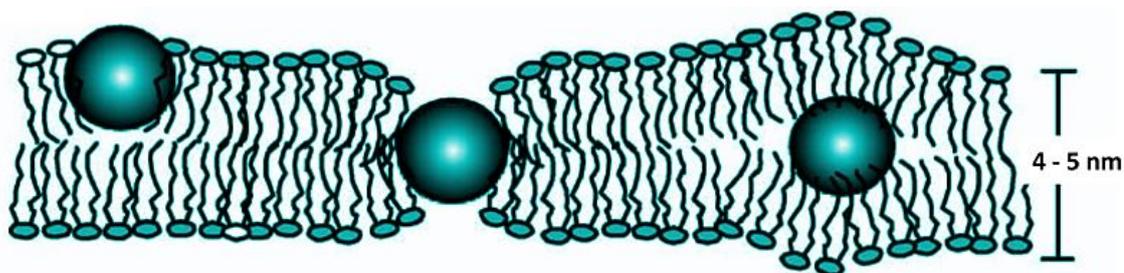


Figura 5.9. Posibles interacciones de NPs con la bicapa lipídica.⁶⁷

En la sección anterior, se demostró mediante medidas de AFM la formación de una bicapa fluida de DMPC sobre los sustratos de mica. Ahora, se va a tratar de entender la interacción que tiene esta bicapa lipídica ya formada, con las AgNPs ya sean recubiertas con citrato o con MBA. Para esto, se procedió a realizar la fusión de las vesículas de DMPC tal y como se describió previamente en la **Sección 5.5**. Luego de obtener la imagen *in situ* para comprobar que las vesículas de DMPC fusionaron correctamente sobre la mica, se gotearon las AgNPs con un tiempo de incubación de 1 h 30 min. Finalmente, se enjuagó con agua tipo MilliQ y se colocó en la celda de líquidos del AFM.

La **Figura 5.10a** es una imagen de AFM *in situ*, tomada en la celda de líquidos, de las CIT–AgNPs con las vesículas de DMPC fusionadas previamente.

De acuerdo al perfil de alturas (**Figura 5.10b**), se observa que después de poner en contacto a las CIT–AgNPs con las vesículas de DMPC fusionadas previamente; las alturas en los lugares que se señalan en la figura ya no corresponden a la de una bicapa lipídica (~ 5 nm) si no que aumentaron entre 7.4–12.6 nm, respecto de la altura inicial de la bicapa lipídica fundida sobre la mica, indicando que las CIT–AgNPs se encuentran sobre la bicapa de DMPC sin penetrar la misma. La **Figura 5.10a** muestra claramente que las CIT–AgNPs están interaccionando con la bicapa preferentemente en los bordes de los dominios DMPC/mica, esto también se refleja en las secciones transversales de la **Figura 5.10b (A, B y C)**.

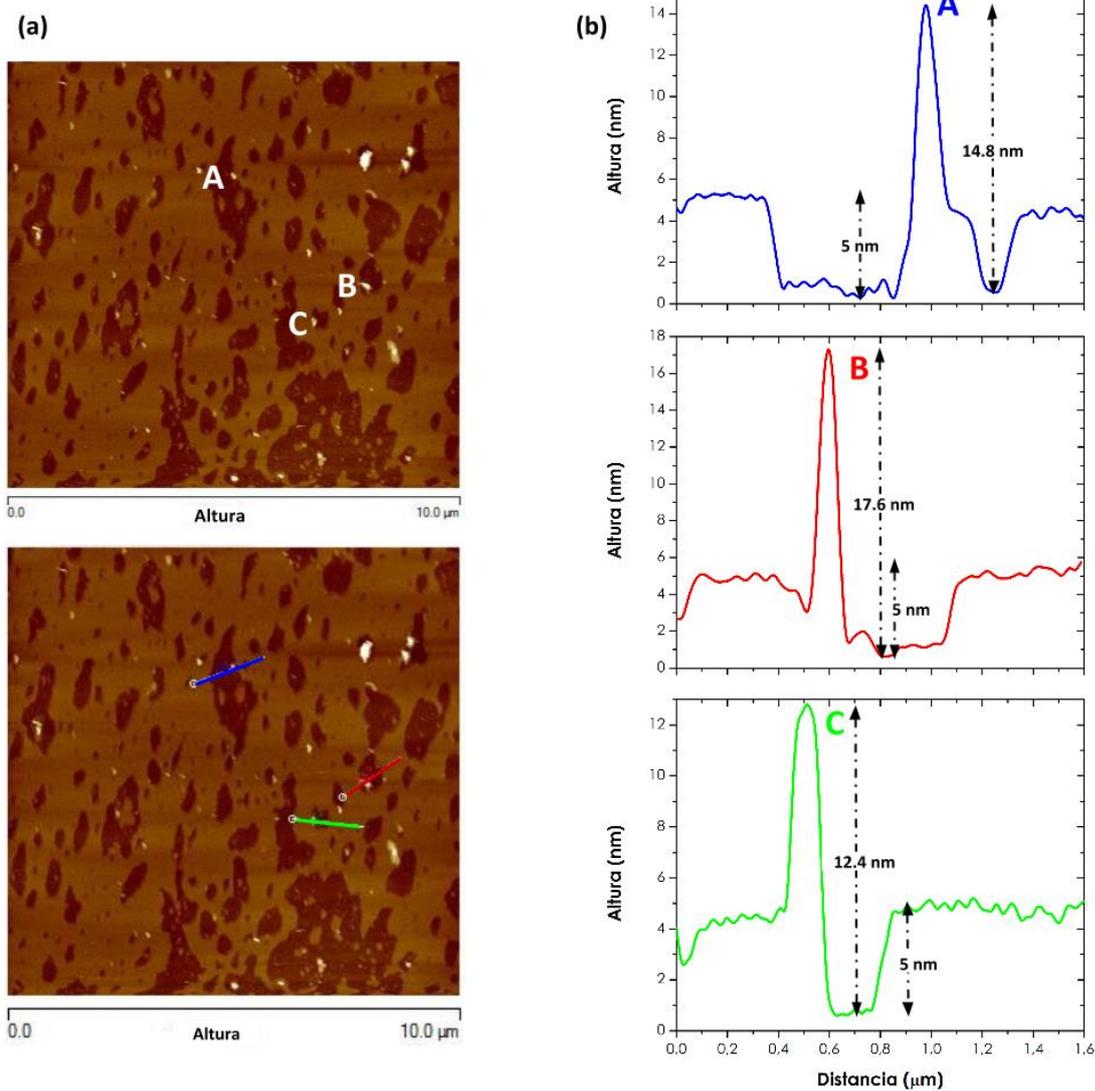


Figura 5.10. (a) Imagen de AFM *in situ* en modo contacto ($10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$) en la celda de líquidos de la superficie de la mica, después de poner en contacto a las vesículas de DMPC fusionadas, con las CIT-AgNPs. (b) Perfiles de altura de las CIT-AgNPs con la bicapa formada.

Para las MBA-AgNPs, se observa algo muy similar con su perfil de alturas (**Figura 5.11b**). Los valores aumentan entre 5– 10 nm, que corresponden a la interacción de las MBA-AgNPs con la bicapa, ubicándose unas pocas en los bordes como se observa en la **Figura 5.11a**.

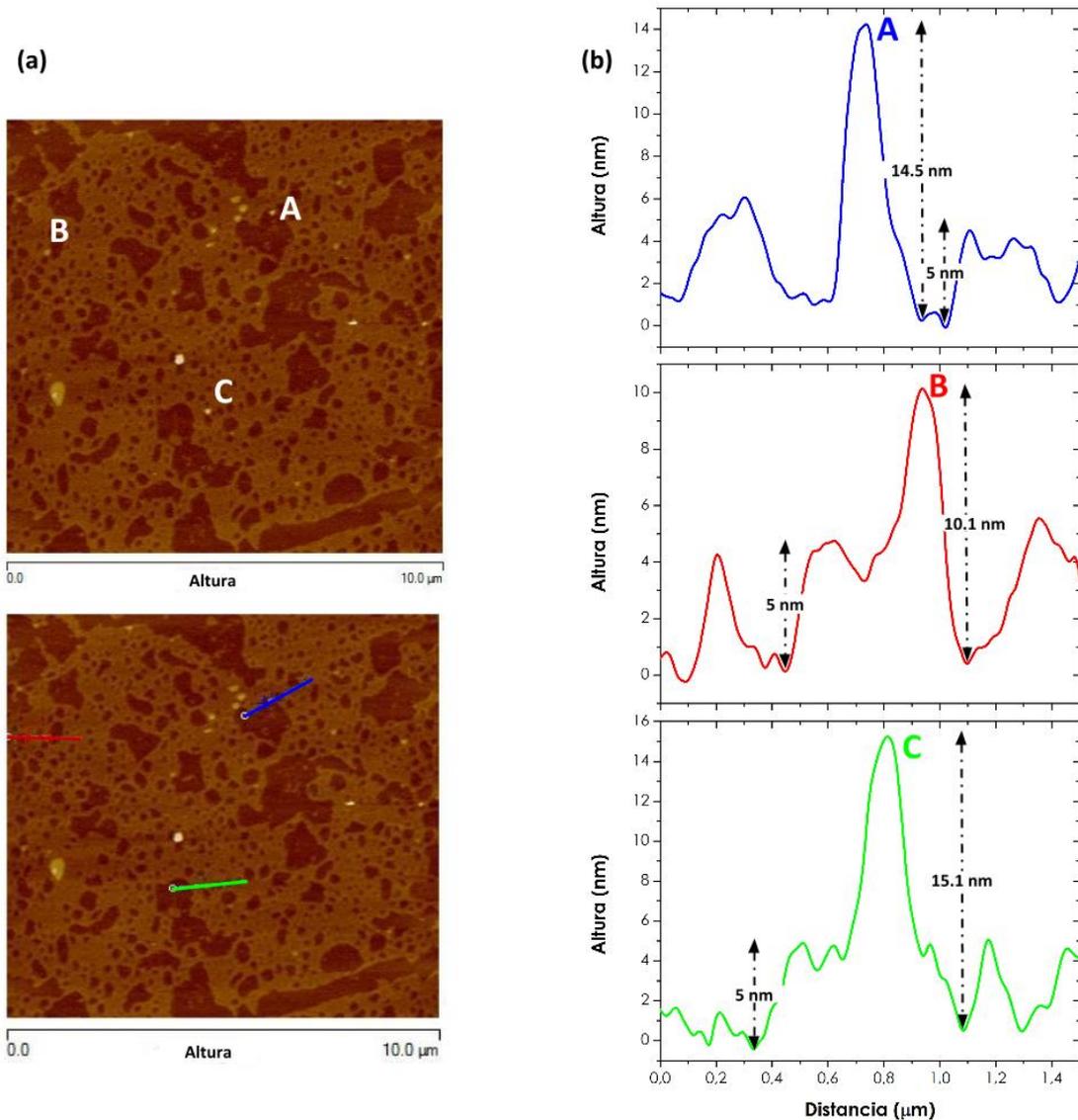


Figura 5.11. (a) Imagen de AFM *in situ* en modo contacto ($10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$) en la celda de líquidos de la superficie de la mica, después de poner en contacto a las vesículas de DMPC fusionadas, con las MBA-AgNPs. (b) Perfiles de altura de las MBA-AgNPs con la bicapa formada.

La interpretación de los resultados obtenidos en cuanto a la adsorción preferencial de las NPs en los bordes de las bicapas respecto de lo que ocurre en zonas planas donde prácticamente no se adsorben, tiene relación directa con lo que ocurre en los el proceso de internalización de NPs en células el cual se ha interpretado como un proceso de dos etapas: en primer lugar ocurre la adsorción en la parte externa de la membrana y luego ocurre la internalización. En la primera etapa, la adsorción, intervienen las fuerzas

electrostáticas y las hidrofóbicas. Esta adsorción se puede enfocar como un proceso reversible.

En el caso de nanopartículas con diámetros comprendidos entre 10 y 100 nm, se propone que inicialmente se adsorben sobre la superficie de la bicapa lipídica ya sea por interacciones específicas del tipo ligando-receptor o mediante interacciones no específicas y luego son envueltas por la membrana e internalizadas por endocitosis.⁶⁸ La eficiencia de este proceso donde la membrana rodea a las nanopartículas depende de su tamaño, forma y orientación respecto a la region donde ocurre la interacción NP-membrana.⁶⁹⁻⁷²

Por otra parte, en el caso de NPs con diámetros inferiores a 10 nm se propone que pueden insertarse o transponer la bicapa aunque con ciertas limitaciones.⁷³⁻⁷⁶

Estudios recientes empleando dinámica molecular⁷⁷ mostraron que AuNPs con diámetros menores que 10 nm y con un recubrimiento anfifílico donde se exponen cargas negativas hacia el exterior producen una modificación en las zonas de mayor curvatura de las bicapas donde se favorecen las interacciones hidrofóbicas. Inicialmente las cargas negativas del recubrimiento de las NPs interaccionan electrostáticamente con los grupos positivos de la cabeza polar del fosfolípido. Estas interacciones electrostáticas provocan reorientaciones donde se producen protrusiones de las terminales lipídicas que permiten interacciones con la parte hidrofóbica del recubrimiento anfifílico de las NPs.

En el esquema de la **Figura 5.12** se muestra la interacción de NPs recubiertas con ácido 11-mercaptoundecanosulfónico (MUS) que a pH fisiológico se encuentra negativamente cargado, con bicapas de 1,2 dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), un fosfolípido zwitteriónico. Las estructuras químicas de estas sustancias se encuentran en la parte superior del esquema.⁷⁷

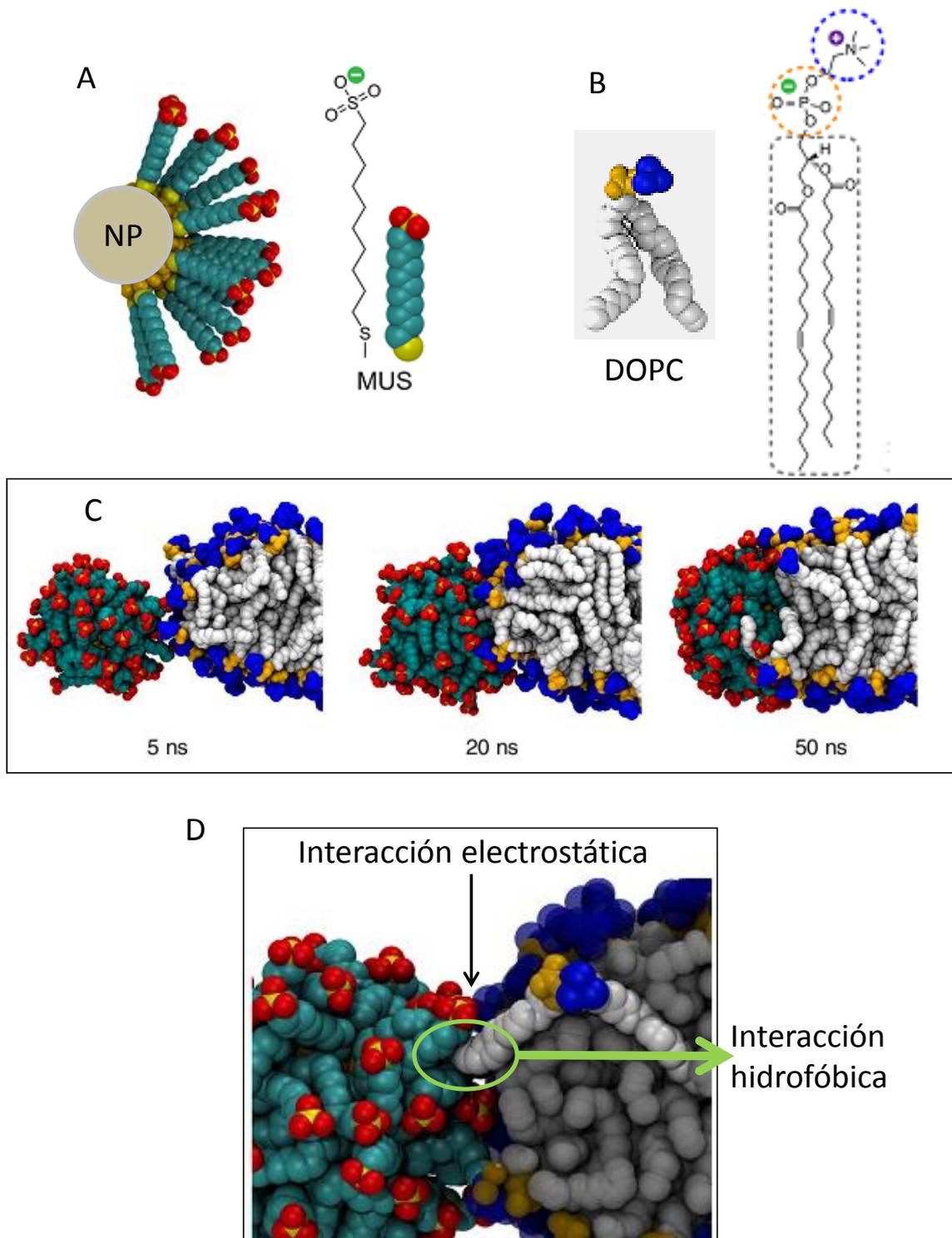


Figura 5.12. **A:** estructura de la NP recubierta con ácido 11-mercaptoundecanosulfónico (MUS) con carga negativa a pH fisiológico. **B:** estructura del DOPC. Las colas hidrofóbicas están en blanco y la cabeza polar tiene en color azul al grupo amonio y en color naranja al fosfato. **C:** estadios del proceso de interacción en función del tiempo entre las NPs funcionalizadas con MUS y la bicapa de DOPC. **D:** detalle mostrando las interacciones electrostáticas entre los grupos sulfonato de las NPs con MUS y los grupos amonio del DOPC y las interacciones hidrofóbicas entre las protrusiones de las colas del DOPC en blanco y la sección hidrofóbica del MUS en celeste. Adaptado de Reid C. Van Lehn and Alfredo Alexander-Katz.⁷⁷

En vista de los antecedentes discutidos anteriormente podemos analizar nuestros resultados en función de las contribuciones presentes en las nanopartículas recubiertas con citratos y con MBA.

Debido a que las MBA–AgNPs, poseen una mayor densidad de aniones carboxilato tal como fue discutido en el *Capítulo 4*, se podría inferir que su permanencia en la bicapa lipídica se basa en las altas interacciones electrostáticas con la fracción positiva de amonio del final polar del DMPC y a las interacciones hidrofóbicas mediadas por los grupos aromáticos, con las protuberancias de la cola hidrocarbonada del lípido o a los defectos de la monocapa lipídica donde la proximidad del anillo aromático/cadena hidrocarbonada se favorece y juega un papel importante para el anclaje de las AgNPs. En el caso de las CIT–AgNPs, la interacción sería fundamentalmente por interacciones electrostáticas con los grupos amonio.

Las imágenes obtenidas tanto para las CIT–AgNPs como para las MBA–AgNPs, muestran que hay pocas AgNPs adsorbidas en las bicapas y que esto ocurre casi exclusivamente en los bordes no observándose presencia prácticamente de AgNPs en las regiones planas. Debido a que las zonas de los bordes por su curvatura aumentan la probabilidad de que las fluctuaciones de las cadenas hidrofóbicas de los lípidos generen las protrusiones que favorecerían las interacciones con el núcleo aromático del MBA. En las zonas planas de la bicapa esas fluctuaciones son menos probables. En el caso de las CIT–AgNPs, donde sólo hay interacciones electrostáticas y la parte hidrofóbica de la molécula es poco representativa en su estructura total, puede que los grupos citrato estén más expuestos a la solución en las regiones planas que en los bordes y se favorezca su solubilidad y disminuya su interacción con el DMPC.⁷⁸

Finalmente, si bien la microscopía de fuerzas atómicas (AFM) es valiosa para estudiar la interacción de las CIT–AgNPs y las MBA–AgNPs con bicapas de DMPC soportadas sobre una superficie lisa como la mica; esta técnica sólo brinda información local. Entonces para poder entender las interacciones a una escala más cercana a la que tendría lugar en sistemas celulares, se empleará como sistema biomimético a las monocapas de Langmuir, donde es posible controlar tanto la composición de la fase lipídica como de la subfase como también la presión lateral de los fosfolípidos.

CONCLUSIONES

- ✓ Se optimizaron las condiciones experimentales para promover la fusión de vesículas de DMPC sobre mica para obtener bicapas soportadas que tuvieran una distribución superficial que expusiera tanto regiones planas y bordes que fueran representativos para que se manifiesten los procesos de adsorción de las nanopartículas en zonas con diferentes curvaturas y defectos.
- ✓ Se caracterizó la morfología de las bicapas que exhibieron un espesor típico de 5 nm tal como se espera para la estructura del DMPC.
- ✓ Se analizó la respuesta mecánica y la estabilidad de las bicapas de DMPC sobre mica mediante el análisis de curvas de fuerza. Estas curvas mostraron la típica "huella digital" que corresponde a la fuerza de ruptura de la bicapa en un valor de 6.5 nN.
- ✓ Las imágenes obtenidas para ambos tipos de AgNPs, indican que se ubican principalmente en los bordes y no en la región plana de la bicapa.
- ✓ La cantidad de AgNPs tanto citratadas como con MBA adsorbidas en los bordes, fue pequeña teniendo en cuenta el tiempo de interacción y la morfología de las bicapas fundidas que permitieron una relación perímetro/área suficiente para favorecer las interacciones.
- ✓ Si bien la técnica de AFM se utiliza como una herramienta para obtener imágenes de los eventos superficiales en condiciones fisiológicas en tiempo real y para estudiar y visualizar la transferencia de material a partir de vesículas adsorbidas sobre mica, no permite cuantificar las interacciones presentes en este tipo de sistemas biomiméticos en distintas condiciones de presión lateral del fosfolípido constituyente de la bicapa por lo cual se discutirá en el capítulo siguiente la posibilidad de emplear como sistema de biomembrana a las monocapas de DMPC en balanza de Langmuir.

Referencias Bibliográficas

- [1] Israelachvili, J. N., *Intermolecular and surface forces / Jacob N. Israelachvili*. Academic Press: London ; San Diego, 1991.
- [2] Gorter, E.; Grendel, F., On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *The Journal of experimental medicine* **1925**, 41 (4), 439-443.
- [3] Singer, S.; Nicolson, G. L., The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Membranes and Viruses in Immunopathology; Day, SB, Good, RA, Eds* **1972**, 7-47.
- [4] Escribá, P. V., Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine. *Trends in molecular medicine* **2006**, 12 (1), 34-43.
- [5] Vereb, G.; Szöllösi, J.; Matko, J.; Nagy, P.; Farkas, T.; Vigh, L.; Matyus, L.; Waldmann, T.; Damjanovich, S., Dynamic, yet structured: the cell membrane three decades after the Singer–Nicolson model. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, 100 (14), 8053-8058.
- [6] Baró, A. M.; Reifenger, R. G., *Atomic force microscopy in liquid: biological applications*. John Wiley & Sons: 2012.
- [7] Van Meer, G.; Voelker, D. R.; Feigenson, G. W., Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature reviews Molecular cell biology* **2008**, 9 (2), 112-124.
- [8] Escribá, P. V.; González-Ros, J. M.; Goñi, F. M.; Kinnunen, P. K.; Vigh, L.; Sánchez-Magraner, L.; Fernández, A. M.; Busquets, X.; Horváth, I.; Barceló-Coblijn, G., Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies. *Journal of cellular and molecular medicine* **2008**, 12 (3), 829-875.
- [9] Escribá, P. V.; Ozaita, A.; Ribas, C.; Miralles, A.; Fodor, E.; Farkas, T.; García-Sevilla, J. A., Role of lipid polymorphism in G protein-membrane interactions: nonlamellar-prone phospholipids and peripheral protein binding to membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1997**, 94 (21), 11375-11380.
- [10] Tanford, C., *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes 2d Ed*. J. Wiley.: 1980.
- [11] Lodish, H.; Berk, A.; Kaiser, C.; Krieger, M.; Scott, M.; Bretscher, A.; Ploegh, H.; Matsudaira, P., *Molecular cell biology*. **2007**.
- [12] Martin, D. K., The Significance of Biomimetic Membrane Nanobiotechnology to Biomedical Applications. In *Nanobiotechnology of Biomimetic Membranes*, Springer: 2007; pp 1-21.
- [13] Nelson, D. L.; Lehninger, A. L.; Cox, M. M., *Lehninger principles of biochemistry*. 2008.
- [14] Blumenthal, R.; Clague, M. J.; Durell, S. R.; Epand, R. M., Membrane fusion. *Chemical Reviews* **2003**, 103 (1), 53-70.
- [15] Seifert, U.; Lipowsky, R., Adhesion of vesicles. *Physical Review A* **1990**, 42 (8), 4768.
- [16] Keller, C.; Kasemo, B., Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance. *Biophysical journal* **1998**, 75 (3), 1397-1402.
- [17] Reviakine, I.; Brisson, A., Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy. *Langmuir* **2000**, 16 (4), 1806-1815.
- [18] Mingeot-Leclercq, M.-P.; Deleu, M.; Basseur, R.; Dufrêne, Y. F., Atomic force microscopy of supported lipid bilayers. *Nature protocols* **2008**, 3 (10), 1654-1659.
- [19] Jass, J.; Tjärnhage, T.; Puu, G., From liposomes to supported, planar bilayer structures on hydrophilic and hydrophobic surfaces: an atomic force microscopy study. *Biophysical journal* **2000**, 79 (6), 3153-3163.
- [20] Johnson, J. M.; Ha, T.; Chu, S.; Boxer, S. G., Early steps of supported bilayer formation probed by single vesicle fluorescence assays. *Biophysical journal* **2002**, 83 (6), 3371-3379.
- [21] Reimhult, E.; Höök, F.; Kasemo, B., Intact vesicle adsorption and supported biomembrane formation from vesicles in solution: influence of surface chemistry, vesicle size, temperature, and osmotic pressure. *Langmuir* **2003**, 19 (5), 1681-1691.
- [22] Csúcs, G.; Ramsden, J. J., Interaction of phospholipid vesicles with smooth metal-oxide surfaces. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1998**, 1369 (1), 61-70.
- [23] Stelzle, M.; Weissmüller, G.; Sackmann, E., On the application of supported bilayers as receptive layers for biosensors with electrical detection. *The Journal of Physical Chemistry* **1993**, 97 (12), 2974-2981.
- [24] Gritsch, S.; Nollert, P.; Jähnig, F.; Sackmann, E., Impedance spectroscopy of porin and gramicidin pores reconstituted into supported lipid bilayers on indium-tin-oxide electrodes. *Langmuir* **1998**, 14 (11), 3118-3125.
- [25] Berquand, A.; Mazeran, P.-E.; Pantigny, J.; Proux-Delrouyre, V.; Laval, J.-M.; Bourdillon, C., Two-step formation of streptavidin-supported lipid bilayers by PEG-triggered vesicle

- fusion. Fluorescence and atomic force microscopy characterization. *Langmuir* **2003**, *19* (5), 1700-1707.
- [26] Tamm, L. K.; McConnell, H. M., Supported phospholipid bilayers. *Biophysical journal* **1985**, *47* (1), 105.
- [27] Lagerholm, B. C.; Starr, T. E.; Volovyk, Z. N.; Thompson, N. L., Rebinding of IgE Fabs at haptented planar membranes: measurement by total internal reflection with fluorescence photobleaching recovery. *Biochemistry* **2000**, *39* (8), 2042-2051.
- [28] Cremer, P. S.; Boxer, S. G., Formation and spreading of lipid bilayers on planar glass supports. *The Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103* (13), 2554-2559.
- [29] Zasadzinski, J.; Helm, C.; Longo, M.; Weisenhorn, A.; Gould, S.; Hansma, P., Atomic force microscopy of hydrated phosphatidylethanolamine bilayers. *Biophysical journal* **1991**, *59* (3), 755.
- [30] Egawa, H.; Furusawa, K., Liposome adhesion on mica surface studied by atomic force microscopy. *Langmuir* **1999**, *15* (5), 1660-1666.
- [31] Starr, T. E.; Thompson, N. L., Formation and characterization of planar phospholipid bilayers supported on TiO₂ and SrTiO₃ single crystals. *Langmuir* **2000**, *16* (26), 10301-10308.
- [32] Ajo-Franklin, C. M.; Kam, L.; Boxer, S. G., High refractive index substrates for fluorescence microscopy of biological interfaces with high z contrast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98* (24), 13643-13648.
- [33] Rossetti, F. F.; Bally, M.; Michel, R.; Textor, M.; Reviakine, I., Interactions between titanium dioxide and phosphatidyl serine-containing liposomes: formation and patterning of supported phospholipid bilayers on the surface of a medically relevant material. *Langmuir* **2005**, *21* (14), 6443-6450.
- [34] Yang, J.; Kleijn, J. M., Order in phospholipid Langmuir-Blodgett layers and the effect of the electrical potential of the substrate. *Biophysical journal* **1999**, *76* (1), 323-332.
- [35] Bunjes, N.; Schmidt, E.; Jonczyk, A.; Rippmann, F.; Beyer, D.; Ringsdorf, H.; Gräber, P.; Knoll, W.; Naumann, R., Thiopeptide-supported lipid layers on solid substrates. *Langmuir* **1997**, *13* (23), 6188-6194.
- [36] Lahiri, J.; Kalal, P.; Frutos, A. G.; Jonas, S. J.; Schaeffler, R., Method for fabricating supported bilayer lipid membranes on gold. *Langmuir* **2000**, *16* (20), 7805-7810.
- [37] Salamon, Z.; Wang, Y.; Tollin, G.; Macleod, H. A., Assembly and molecular organization of self-assembled lipid bilayers on solid substrates monitored by surface plasmon resonance spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1994**, *1195* (2), 267-275.
- [38] Puu, G.; Gustafson, I., Planar lipid bilayers on solid supports from liposomes—factors of importance for kinetics and stability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1997**, *1327* (2), 149-161.
- [39] Tokumasu, F.; Jin, A. J.; Feigenson, G. W.; Dvorak, J. A., Atomic force microscopy of nanometric liposome adsorption and nanoscopic membrane domain formation. *Ultramicroscopy* **2003**, *97* (1), 217-227.
- [40] Castellana, E. T.; Cremer, P. S., Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design. *Surface science reports* **2006**, *61* (10), 429-444.
- [41] Vogel, V.; Sheetz, M., Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nature reviews Molecular cell biology* **2006**, *7* (4), 265-275.
- [42] Phillips, R.; Ursell, T.; Wiggins, P.; Sens, P., Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function. *Nature* **2009**, *459* (7245), 379-385.
- [43] Ursell, T.; Kondev, J.; Reeves, D.; Wiggins, P. A.; RobPhillips, R., Role of lipid bilayer mechanics in mechanosensation. In *Mechanosensitive Ion Channels*, Springer: 2008; pp 37-70.
- [44] Evans, E.; Rawicz, W., Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes. *Physical Review Letters* **1990**, *64* (17), 2094.
- [45] Rawicz, W.; Olbrich, K.; McIntosh, T.; Needham, D.; Evans, E., Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophysical journal* **2000**, *79* (1), 328-339.
- [46] Heinrich, V.; Rawicz, W., Automated, high-resolution micropipet aspiration reveals new insight into the physical properties of fluid membranes. *Langmuir* **2005**, *21* (5), 1962-1971.
- [47] Evans, E.; Heinrich, V.; Ludwig, F.; Rawicz, W., Dynamic tension spectroscopy and strength of biomembranes. *Biophysical journal* **2003**, *85* (4), 2342-2350.
- [48] Benz, M.; Gutschmann, T.; Chen, N.; Tadmor, R.; Israelachvili, J., Correlation of AFM and SFA measurements concerning the stability of supported lipid bilayers. *Biophysical journal* **2004**, *86* (2), 870-879.
- [49] Marra, J.; Israelachvili, J., Direct measurements of forces between phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers in aqueous electrolyte solutions. *Biochemistry* **1985**, *24* (17), 4608-4618.

- [50] Corcoran, S.; Colton, R.; Lilleodden, E.; Gerberich, W., Anomalous plastic deformation at surfaces: Nanoindentation of gold single crystals. *Physical Review B* **1997**, *55* (24), R16057.
- [51] Giannotti, M. I.; Vancso, G. J., Interrogation of Single Synthetic Polymer Chains and Polysaccharides by AFM-Based Force Spectroscopy. *ChemPhysChem* **2007**, *8* (16), 2290-2307.
- [52] Fisher, T. E.; Oberhauser, A. F.; Carrion-Vazquez, M.; Marszalek, P. E.; Fernandez, J. M., The study of protein mechanics with the atomic force microscope. *Trends in biochemical sciences* **1999**, *24* (10), 379-384.
- [53] Lee, G. U.; Chrisey, L. A.; Colton, R. J., Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA. *SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON-* **1994**, 771-771.
- [54] Garcia-Manyes, S.; Redondo-Morata, L.; Oncins, G.; Sanz, F., Nanomechanics of lipid bilayers: heads or tails? *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (37), 12874-12886.
- [55] Butt, H.-J.; Cappella, B.; Kappl, M., Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surface science reports* **2005**, *59* (1), 1-152.
- [56] Franz, V.; Loi, S.; Müller, H.; Bamberg, E.; Butt, H.-J., Tip penetration through lipid bilayers in atomic force microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2002**, *23* (2), 191-200.
- [57] Fraxedas, J.; Garcia-Manyes, S.; Gorostiza, P.; Sanz, F., Nanoindentation: toward the sensing of atomic interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99* (8), 5228-5232.
- [58] Krautbauer, R.; Clausen-Schaumann, H.; Gaub, H. E., Cisplatin changes the mechanics of single DNA molecules. *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, *39* (21), 3912-3915.
- [59] Clausen-Schaumann, H.; Rief, M.; Tolksdorf, C.; Gaub, H. E., Mechanical stability of single DNA molecules. *Biophysical journal* **2000**, *78* (4), 1997-2007.
- [60] Carrion-Vazquez, M.; Oberhauser, A.; Fowler, S.; Marszalek, P.; Broedel, S.; Clarke, J.; Fernandez, J. In *AFM and chemical unfolding of a single protein follow the same pathway*, Biophysical journal, BIOPHYSICAL SOCIETY 9650 ROCKVILLE PIKE, BETHESDA, MD 20814-3998 USA: 1999; pp A173-A173.
- [61] Garcia-Manyes, S.; Oncins, G.; Sanz, F., Effect of ion-binding and chemical phospholipid structure on the nanomechanics of lipid bilayers studied by force spectroscopy. *Biophysical journal* **2005**, *89* (3), 1812-1826.
- [62] Garcia-Manyes, S.; Oncins, G.; Sanz, F., Effect of pH and ionic strength on phospholipid nanomechanics and on deposition process onto hydrophilic surfaces measured by AFM. *Electrochimica Acta* **2006**, *51* (24), 5029-5036.
- [63] Garcia-Manyes, S.; Oncins, G.; Sanz, F., Effect of temperature on the nanomechanics of lipid bilayers studied by force spectroscopy. *Biophysical journal* **2005**, *89* (6), 4261-4274.
- [64] Al-Jamal, W. T.; Kostarelos, K., Liposome-nanoparticle hybrids for multimodal diagnostic and therapeutic applications. **2007**.
- [65] Zhang, L.; Granick, S., How to stabilize phospholipid liposomes (using nanoparticles). *Nano letters* **2006**, *6* (4), 694-698.
- [66] Bhandary, S.; Sultana, P.; Basu, R.; Das, S.; Nandy, P., A Study on the Modulation of the Phase Behavior of Lipid Aggregates—Effect of Some Metal Nanoparticles. *Advanced Science, Engineering and Medicine* **2011**, *3* (3), 213-218.
- [67] Jang, H.; Pell, L. E.; Korgel, B. A.; English, D. S., Photoluminescence quenching of silicon nanoparticles in phospholipid vesicle bilayers. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2003**, *158* (2), 111-117.
- [68] Bareford, L. M.; Swaan, P. W., Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Advanced drug delivery reviews* **2007**, *59* (8), 748-758.
- [69] Chithrani, B. D.; Ghazani, A. A.; Chan, W. C., Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano letters* **2006**, *6* (4), 662-668.
- [70] Huang, C.; Zhang, Y.; Yuan, H.; Gao, H.; Zhang, S., Role of nanoparticle geometry in endocytosis: laying down to stand up. *Nano letters* **2013**, *13* (9), 4546-4550.
- [71] Yi, X.; Shi, X.; Gao, H., A universal law for cell uptake of one-dimensional nanomaterials. *Nano letters* **2014**, *14* (2), 1049-1055.
- [72] Dasgupta, S.; Auth, T.; Gompper, G., Shape and orientation matter for the cellular uptake of nonspherical particles. *Nano letters* **2014**, *14* (2), 687-693.
- [73] Van Lehn, R. C.; Alexander-Katz, A., Penetration of lipid bilayers by nanoparticles with environmentally-responsive surfaces: simulations and theory. *Soft Matter* **2011**, *7* (24), 11392-11404.

- [74] Li, Y.; Li, X.; Li, Z.; Gao, H., Surface-structure-regulated penetration of nanoparticles across a cell membrane. *Nanoscale* **2012**, *4* (12), 3768-3775.
- [75] Nangia, S.; Sureshkumar, R., Effects of nanoparticle charge and shape anisotropy on translocation through cell membranes. *Langmuir* **2012**, *28* (51), 17666-17671.
- [76] Gkeka, P.; Sarkisov, L.; Angelikopoulos, P., Homogeneous hydrophobic–hydrophilic surface patterns enhance permeation of nanoparticles through lipid membranes. *The journal of physical chemistry letters* **2013**, *4* (11), 1907-1912.
- [77] Van Lehn, R. C.; Alexander-Katz, A., Membrane-embedded nanoparticles induce lipid rearrangements similar to those exhibited by biological membrane proteins. *The Journal of Physical Chemistry B* **2014**, *118* (44), 12586-12598.
- [78] Van Lehn, R. C.; Ricci, M.; Silva, P. H. J.; Andreozzi, P.; Reguera, J.; Voitchovsky, K.; Stellacci, F.; Alexander-Katz, A., Lipid tail protrusions mediate the insertion of nanoparticles into model cell membranes. *Nature Communications* **2014**, *5*.

Capítulo 6

Interacción de AgNPs hidrofílicas con DMPC, como una biomembrana modelo

En este capítulo se va a estudiar la interacción de los dos tipos de AgNPs hidrofílicas que se emplearon en este trabajo de Tesis, con monocapas de Langmuir de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) presentes en la interfase agua/aire de una balanza de Langmuir. Se analizará el rol de la densidad de carga superficial y de la naturaleza química de las moléculas protectoras de la superficie sobre la base de estudios de Espectroscopia de Fotoelectrones de Rayos-X (XPS) y en cálculos de la Teoría Funcional de la Densidad (DFT).

6.1. Introducción.

Como se mencionó en la introducción general, las AgNPs son uno de los nanomateriales más utilizados en productos comerciales.¹⁻⁴ En el enfoque de síntesis *bottom-up*, los agentes protectores de distinta naturaleza química, permiten el control de la morfología de la NP, su tamaño y evitan su coalescencia. El agente protector tiene grupos funcionales que por un lado son capaces de interactuar fuertemente con la plata (Ag), y por el otro, proporciona la funcionalidad química que permite dispersar las NPs en un solvente dado y/o interactuar específicamente con un target (blanco), según

la aplicación que se le quiera dar a estas AgNPs.⁵⁻⁷ El citrato es uno de los agentes de protección de nanopartículas de Ag más comúnmente empleado en productos comerciales y la síntesis de Turkevich es un método ampliamente usado que se caracteriza por su simplicidad y reproducibilidad.^{8, 9} Además de sus aplicaciones comerciales, las AgNPs también son empleadas ampliamente, debido a sus propiedades plasmónicas en cuanto a la dispersión Raman.^{10, 11}

Debido a la creciente demanda de aplicaciones de las AgNPs, resulta de particular importancia la comprensión de sus interacciones con materiales de naturaleza biológica.¹²⁻¹⁴ Las interacciones presentes entre los modificadores superficiales de las NPs con biomoléculas, la ruptura y la penetración en la membrana celular, dependen en gran medida de su tamaño, forma, carga superficial y funcionalidad química.¹⁵⁻¹⁸ Para NPs con dimensiones pequeñas entre 4–10 nm, se propone que pueden penetrar directamente la bicapa de las membranas celulares,^{16, 19-21} mientras que para NPs más grandes, su acción se produce a través de alteraciones de la estructura de la membrana generándose poros, que afectan fuertemente su permeabilidad,⁴ potencial de membrana^{22, 23} y sus funciones principales generando citotoxicidad.²⁴⁻²⁶ También las NPs de mayor tamaño pueden ser incorporadas a las células mediante procesos de endocitosis selectivos (**Figura 6.1**).²¹

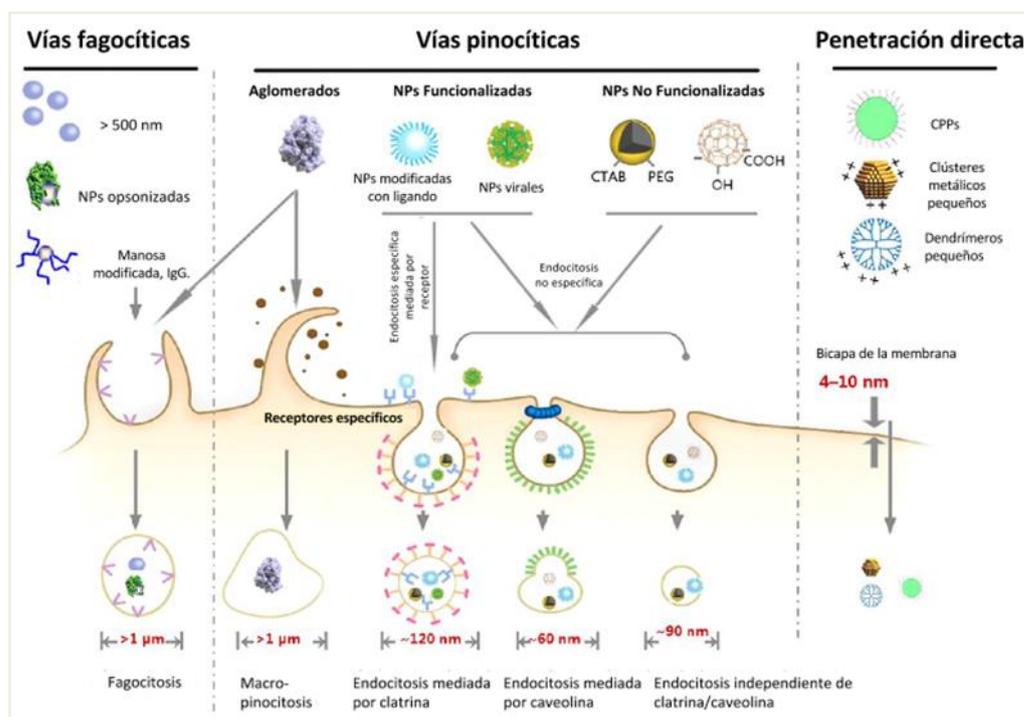


Figura 6.1. Disposiciones en tamaño natural y controladores de acceso dentro de una célula de un mamífero.

Para AuNPs se ha encontrado que mediante el control de su densidad de carga superficial, es posible llegar a un equilibrio entre la toxicidad y la captación celular.²⁷ Las interacciones electrostáticas de las NPs con bicapas lipídicas median su interacción con las membranas biológicas y su disrupción en especial cuando son catiónicas.²¹ El proceso de captación debe involucrar la adsorción de la NP sobre la superficie celular, y a continuación, su internalización.^{28, 29} Tanto el signo y la densidad de carga de las NPs, molecular, afectan su adhesión y penetración dentro de las bicapas lipídicas, convirtiéndose en un tema de gran importancia para ser investigado.

Debido a la complejidad de las membranas biológicas naturales, las monocapas y bicapas lipídicas soportadas sobre un sustrato sólido son los sistemas modelos más comunes utilizados para estudiar sus interacciones con biomoléculas.³⁰⁻³³ Otro modelo apropiado para estudiar las interacciones en nano-biointerfases, son las monocapas de Langmuir, que evitan la transferencia del modelo de biomembrana a un soporte sólido y permiten además el control de la composición y organización, tanto de la interfase como de la subfase; por lo tanto, varios factores que están involucrados en las interacciones NP-membrana, pueden ser investigados.³⁴⁻³⁷ En particular, DMPC es un fosfolípido zwitteriónico que a temperatura ambiente posee una fase líquido-expandida (LE) a lo largo de toda la isoterma de Langmuir y una topografía homogénea en el rango de la mesoescala cuando es examinada por Microscopía de Ángulo de Brewster (BAM: *Brewster Angle Microscopy* en inglés).

En este trabajo de Tesis, se estudió la interacción de monocapas de DMPC con AgNPs similares en tamaño pero protegidas con diferentes moléculas, tales como citrato (CIT-AgNPs) y ácido 4-mercaptobenzoico (MBA-AgNPs), ambas cargadas negativamente a pH fisiológico. Las MBA-AgNPs se obtuvieron a partir de las CIT-AgNPs por un procedimiento de intercambio de ligandos tradicional. Algunos experimentos de XPS de alta resolución revelan que el citrato no se remueve completamente de la superficie de la NP, lo cual tiene una importante influencia en lo que se refiere a la interacción con una monocapa de fosfolípido, tal como se explicará en el presente capítulo.

Las CIT–AgNPs son unas de las nanopartículas más ampliamente utilizadas en productos comerciales y en aplicaciones científicas; mientras que las MBA–AgNPs son comúnmente empleadas como sondas Raman en sensores basados en la Espectroscopia Raman Amplificada de Superficies (SERS).³⁸⁻⁴⁵ Ambos tipos de AgNPs (CIT–AgNPs y MBA–AgNPs), exponen grupos carboxilo y tienen similares potenciales zeta, pero difieren en la naturaleza alifática o aromática del agente protector. Los resultados que se mostrarán en este capítulo, indican comportamientos diferentes en cuanto a su interacción con el modelo de biomembrana: las CIT–AgNPs interaccionan débilmente en DMPC, mientras que las MBA–AgNPs interaccionan irreversiblemente y se mantienen en la interfase al realizar la compresión de la monocapa. Esto también indica que hay un efecto cooperativo de los ligandos en la interacción entre MBA–AgNPs y DMPC. Por otra parte, las moléculas de MBA en solución (sin un núcleo de plata) son incapaces de modificar los parámetros de empaquetamiento (área) del fosfolípido o la presión de superficie tal como lo hacen las NPs. A partir de estos resultados es que proponemos una explicación de la interacción de estas AgNPs con monocapas de DMPC basada en la densidad de carga superficial y en la naturaleza química de la molécula protectora.

6.2. Parte Experimental.

6.2.1. Monocapas en la interfase aire/buffer.

El fosfolípido 1,2–dimiristoil–*sn*–glicero–3–fosfocolina (DMPC) fue comprado a Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Para los estudios de monocapas, se utilizó un buffer fosfato 10 mM a pH 7.2 como subfase. Las soluciones buffer se prepararon con agua tipo Milli–Q.

Las monocapas se obtuvieron mediante el uso de una balanza de Langmuir ubicada en el laboratorio del CIQUIBIC–Universidad Nacional de

Córdoba (Capítulo 2. Figura 2.17) acoplada a una unidad de control (Monofilmeter Mayer Feinttechnik, Alemania). La superficie y el volumen de la cuba de teflón utilizada, presente en una balanza circular, son de 43 cm² y 34 mL, respectivamente. La presión superficial (π) se midió con una placa sensora de Pt-platinizada, usando el método de Wilhelmy.

La ausencia de impurezas en la subfase se comprobó antes de iniciar cada experimento reduciendo la superficie disponible de la cuba a menos del 30% de su valor original (de 43 cm² a 13 cm²) luego de 10 min de haber colocado la solución buffer. Este procedimiento se realizó para evidenciar la adsorción de posibles impurezas que podrían estar presentes en cantidades traza en la subfase acuosa. En los experimentos realizados sólo se usaron subfases que no mostraron cambios de presión de superficie por encima de ± 0.5 mN m⁻¹. Antes de cada experimento, la cuba fue limpiada mediante enjuague con etanol al 98% y varias veces con agua tipo Milli-Q. La cuba también se limpia diariamente con una solución sulfonítrica (70% H₂SO₄/30% HNO₃) y enjuagada con agua tipo Milli-Q y buffer fosfato para remover los contaminantes orgánicos que podrían afectar los experimentos. Se tuvo especial cuidado en los experimentos con MBA-AgNPs y las soluciones de MBA, debido a su posible adsorción en la cuba de teflón. Todos los experimentos se realizaron a $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

Cuando se estudian monocapas insolubles sobre superficies líquidas, al igual que films adsorbidos, lo que puede medirse experimentalmente es la diferencia en la tensión superficial de la interfase limpia con respecto a la superficie cubierta con un film. Esto permite introducir el concepto de presión superficial (π) como la fuerza ejercida por el film, permitiendo la simple interpretación de la tensión superficial en términos de fuerzas intermoleculares. Es por ello que la presión superficial, π , es considerada entonces como la reducción de la tensión superficial del líquido puro (interface limpia) producida por la presencia del film, según la **Ecuación 6.1**:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (6.1)$$

Donde γ_0 es la tensión superficial del líquido puro y γ la tensión superficial en presencia del film.⁴⁶

6.2.2. Adsorción de las AgNPs en la interfase aire/buffer e interacción con monocapas de fosfolípido.

La adsorción de las CIT–AgNPs o de las MBA–AgNPs desde la subfase a la interfase limpia aire/buffer, o a las monocapas de DMPC, fue realizada por inyecciones de soluciones de AgNPs dentro de la subfase del buffer bajo una continua agitación. Normalmente, se usaron 1.5 mL de solución de AgNPs, que contiene $2.02 \times 10^{-2} \text{mg}$ o $6.06 \times 10^{-2} \text{mg}$ de Ag para las suspensiones diluidas y concentradas, respectivamente; dando una concentración final de AgNPs de $2.03 \times 10^{11} \text{NPs mL}^{-1}$ o de $6.08 \times 10^{11} \text{NPs mL}^{-1}$, respectivamente.

Para el estudio de las interacciones entre las AgNPs y DMPC, primero se formó la monocapa del fosfolípido por deposición de una solución clorofórmica de DMPC puro en la interfase aire/buffer hasta alcanzar el valor deseado de π . La presión superficial (π) inicial estudiada de DMPC (π_0^{DMPC}) fue de 3, 5, 10 y 30 mN m⁻¹. Una vez que transcurrieron 10 min después de la formación de la película de DMPC a una cierta π_0 , la solución de AgNPs fue inyectada en el seno de la subfase mediante el uso de una microjeringa.

Después de la inyección de las AgNPs dentro de la subfase, en ausencia o en presencia del DMPC, los cambios en la presión superficial (π) a área constante fueron adquiridos en función del tiempo hasta que se alcanzó la presión de equilibrio en la adsorción (π_{eq}). Una vez después de alcanzar π_{eq} , la película formada se comprimió para obtener una isoterma de Langmuir. La velocidad de la compresión fue de 0.4 cm² s⁻¹. Las isotermas de compresión de Langmuir obtenidas luego de la interacción AgNPs/DMPC se grafican como presión superficial (π) vs. área molecular promedio (MMA: *mean molecular area*, en inglés). Las isotermas de Langmuir relacionan la presión de superficie con el área, permitiendo entonces conocer el área promedio ocupada por una dada entidad (ej. anfifilo) a una cierta π . Para compuestos ampliamente

estudiados, como es el caso de DMPC, es posible inferir a partir de su isoterma de Langmuir el área promedio que ocupa una molécula a un dado valor de π . En el caso de compuestos tensioactivos cuyas isotermas de Langmuir no han sido informadas/estudiadas, es necesario contar con una solución de concentración perfectamente conocida para calcular el área promedio que ocupan estas entidades a lo largo de la isoterma. Conociendo el área de la cuba en la cual se siembra esa solución, y conociendo el volumen sembrado en la interfase se puede inferir el número total de moléculas presentes en la interfase y a partir de allí, normalizar el área que ocupa en promedio una molécula (MMA). La MMA es el área total de la monocapa dividida por el número de entidades en la interfase.

En el caso de las NPs hidrofílicas utilizadas en esta tesis, no es factible conocer el número de partículas adsorbidas desde la subfase a la interfase y por ello, no es posible estimar el área promedio que ocupa cada partícula a una cierta π . También, debido a ello, en las isotermas de Langmuir de AgNPs/DMPC la MMA fue calculada sobre la base del área que debiera ocupar DMPC pura. Cualquier divergencia del área ocupada por AgNPs/DMPC respecto a DMPC pura puede ser atribuida a la presencia/efecto de las NPs.

A modo de control, se midieron isotermas de compresión de Langmuir de DMPC puro, partiendo de diferentes presiones iniciales de superficie hasta llegar al colapso. Estas isotermas se comparan con aquellas que se obtienen clásicamente partiendo desde la fase gaseosa de DMPC ($\pi = 0 \text{ mN m}^{-1}$). No se encontraron diferencias entre las isotermas de DMPC partiendo de diferentes presiones iniciales. Las isotermas de compresión se midieron para las siguientes presiones iniciales de DMPC 5, 10, 30 mN m^{-1} . Para ello se sembró DMPC en la interfase a una dada π y después de 10 min, la película se comprimió.

Otro control realizado fue el estudio de la adsorción de citrato o MBA a interfases limpias o de DMPC. Para ello, se inyectaron soluciones tanto de citrato como de MBA a concentraciones similares o muy superiores que las que

ofrecen las AgNPs en la subfase; la presencia de estas moléculas en ningún caso produjo cambios de la π en función del tiempo (área fija) o en función del área (compresión).

Además, a fin de corroborar que la variación del volumen de la subfase, luego de agregar 1.5 mL de solución de NPs, no afecta la π , se adicionaron hasta 2 mL de buffer puro a la subfase de buffer no observándose cambios en π .

Se hicieron ensayos con diferentes lotes de ambos tipos de AgNPs y no se observaron diferencias. En todos los casos, los experimentos de adsorción y de compresión que se realizaron por triplicado no variaron entre ellos en más de un $0.3 - 0.5 \text{ mN m}^{-1}$ (isotermas de adsorción) o 5% en el área (isotermas de compresión).

Con el fin de comprobar si ambos tipos de NPs, CIT–AgNPs y MBA–AgNPs sufren alguna degradación después de su adsorción en la interfase agua/buffer o después de su adsorción a la monocapa de DMPC, se midieron espectros de UV–Vis de la subfase. Para esto, se tomó una alícuota de la subfase después de la adsorción (típicamente 2 h después de la adición de las AgNPs) y los espectros UV–Vis obtenidos se compararon con el de las AgNPs recién preparadas. No hubo cambios en la respuesta óptica confirmando que no hay coalescencia ni degradación durante los experimentos con las CIT–AgNPs y MBA–AgNPs. Este control se realizó luego de cada experimento, tanto en ausencia como en presencia de DMPC. Las **Figuras 6.2a, b** muestran un ejemplo representativo.

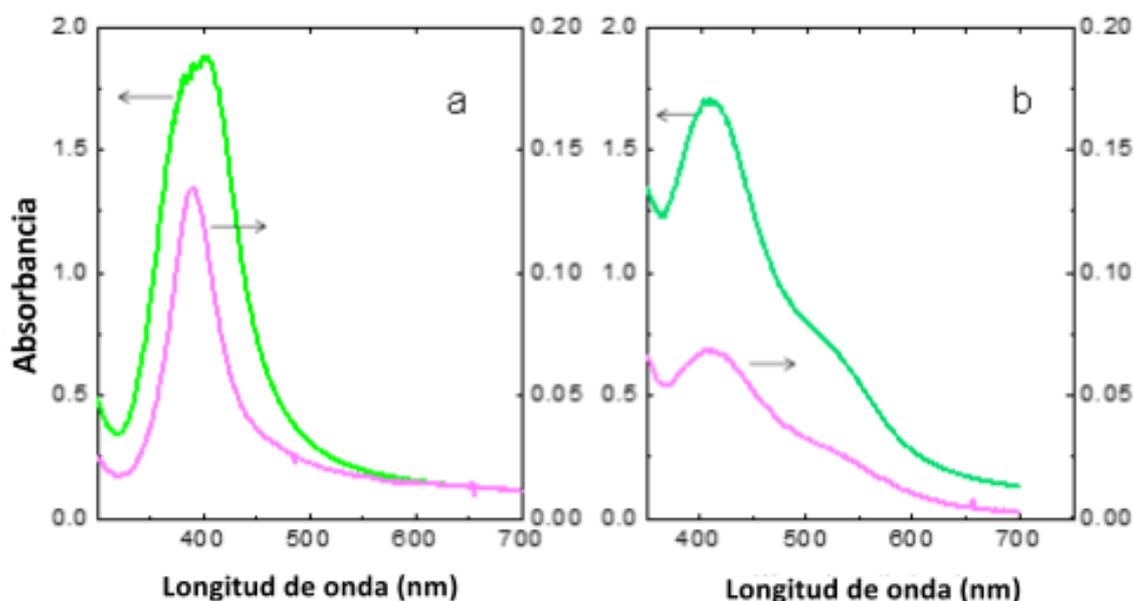


Figura 6.2. Espectros UV-Vis (a) CIT-AgNPs (b) MBA-AgNPs. Las líneas verdes corresponden a las AgNPs recién preparadas. Las líneas rosas son los espectros tomados de una alícuota extraída de la subfase de la balanza de Langmuir después de 2 horas de interacción de las AgNPs con la monocapa de DMPC empaquetado a 5 mN m^{-1} .

6.2.3. Visualización de la microscopía de ángulo de Brewster

Para la visualización por BAM las monocapas de adsorción de las AgNPs a la interfase aire/buffer o de DMPC se prepararon usando una cuba fabricada en el laboratorio con un área de 28 cm^2 y un volumen de subfase de 28 mL . La cantidad de solución de AgNPs inyectada dentro de la subfase fue de 0.5 mL . En el caso de usar volúmenes más grandes, éstos ocasionan reflectividades que evitan una apropiada visualización de la superficie. Los experimentos de interacción entre las AgNPs y el DMPC se realizaron como se mencionó en la sección anterior. La visualización por BAM se realizó sin agitación para evitar el movimiento de las películas. La cuba circular se montó sobre la plataforma de un Elipsómetro Nanofilm EP3 Imaging (Accurion, Göttingen, Germany), la cual se usó en el modo BAM (Capítulo 2, Figura 2.20).

El equipo utilizado posee un láser de $\lambda = 532 \text{ nm}$ que incide en la superficie acuosa, el mínimo de reflexión se estableció en el ángulo de Brewster ($\sim 53.1^\circ$). Durante la adsorción de las AgNPs a la interfase limpia o a la

monocapa de DMPC, la luz reflejada fue colectada a través de un objetivo 20X pasando por lentes analizadores polarizados y siendo capturada por una cámara CCD con una velocidad de 25 Hz. La presión superficial se midió a través del tiempo con una placa sensora de Pt-platinizada utilizando el método de Wilhelmy. Experimentos control se realizaron con citrato y MBA a iguales o a mayores concentraciones que las que proveen las AgNPs.

6.2.4. Cálculos DFT

Los cálculos de DFT se realizaron con un código programado de forma de onda de plana periódica VASP 5.2.12.^{47, 48} Se siguió el esquema de funcionales no locales propuesto por Dion *et al.*⁴⁹ vdW-DF, y la optimización de los intercambios de Becke88 funcional optB88-vdW⁵⁰ para tener en cuenta las interacciones de van der Waals (vdW). Las funciones de onda electrónicas se ampliaron en forma de onda plana programado con una energía de corte de 450 eV. La onda plana proyector aumentada (PAW) debida al método Blöchl se usó para representar los núcleos atómicos⁵¹ con un potencial PBE. Las superficies de plata fueron representadas por un bloque de cinco capas atómicas con ~15 Å de vacío. Las redes óptimas de Monkhorst-Pack⁵² con *k* puntos de 5 x 5 x 1 fueron usadas para la integración numérica en el espacio recíproco de la estructura de la superficie (2√3x4). La relajación de la superficie está permitida en las tres capas de Ag del bloque, así como en las coordenadas atómicas del adsorbato. Las especies radicales del citrato (Citrato H²⁻) fue optimizada en una caja asimétrica de 10 Å x 12 Å x 14 Å. La constante de red calculada es de 4.14 Å, que se compara razonablemente bien con el valor experimental (4.09 Å).⁵³

La energía de enlace promedio por radical citrato adsorbido, E_b , se define en la **Ecuación 6.2**:

$$E_b = \frac{1}{N_{\text{citrato}}} [E^{\text{bloque+citrato}} - E^{\text{bloque}} - N_{\text{citrato}} E^{\text{citrato}}] \quad (6.2)$$

Donde $E^{red+citrato}$, E^{red} y $E^{citrato}$ son las energías totales del sistema relajado superficie–citrato, el sustrato desnudo relajado, y el radical citrato, mientras $N_{citrato}$ es el número de radicales citrato en la superficie de la celda unitaria. Se debe notar que un número negativo indica que la adsorción es exotérmica respecto a la superficie limpia separada y al radical citrato.

6.3. Caracterización de las monocapas de DMPC.

6.3.1. Adsorción de las CIT–AgNPs y las MBA–AgNPs a la interfase de monocapas de DMPC.

Se estudiaron las interacciones de dos tipos de AgNPs cargadas negativamente que tienen el mismo tamaño de núcleo y sección transversal muy similar, funcionalizadas con citrato o MBA. Además, ambas AgNPs tienen casi el mismo valor de potencial zeta (-36 mV para las MBA–AgNPs y -33 mV para las CIT–AgNPs) en la solución del buffer donde las medidas se llevaron a cabo. El potencial zeta refleja el potencial electrostático en la doble capa eléctrica que rodea a una NP en solución y está relacionado con la carga superficial de la NP.⁵⁴ Sin embargo, la naturaleza química del citrato adsorbido para las CIT–AgNPs (alifática) y del ácido 4–mercaptobenzoico (fracción aromática) para las MBA–AgNPs, debe tenerse en cuenta, así como el cubrimiento y la configuración de estas moléculas sobre la superficie de la AgNP.

Se estudiaron las interacciones de ambos tipos de AgNPs, las CIT–AgNPs y las MBA–AgNPs, con monocapas de DMPC a diferentes presiones superficiales iniciales (π_0^{DMPC}), que involucran diferentes empaquetamientos de moléculas del fosfolípido en la interfase. Una vez formado el film de DMPC a una cierta π y luego de que la presión lateral de DMPC se establece, analizamos el efecto de inyectar una cierta concentración de AgNPs dentro de la subfase, tratando de imitar lo que ocurriría en sistemas reales donde las membranas celulares de organismos vivos son expuestas a NPs que pueden alterar su estructura y sus

propiedades de equilibrio. La unión de partículas a las interfaces fluidas es un proceso complejo que se ve afectado por una amplia gama de parámetros fisicoquímicos tales como el tamaño de la NP, la naturaleza química de las moléculas que las recubren, la rugosidad de la superficie, y la humectabilidad (mojabilidad).^{55, 56} La energía total involucrada en la unión de partículas a la interfase fluida depende de la diferencia entre las energías de la partícula en la interfase y en la solución coloidal. Generalmente las partículas de tamaños micrométricos se unen irreversiblemente a las interfases fluidas, mientras que para NPs de 10 nm o menos, la reversibilidad de adsorción puede ser regulada por la modificación del ángulo de contacto.⁵⁶ Law y colegas, señalaron que la unión a la interfase de partículas mayores a 10 nm puede ser considerada completamente irreversible. Sin embargo, para NPs con radios menores a 10 nm, se establece un verdadero equilibrio termodinámico entre el seno de la solución ("bulk") y la interfase.⁵⁷

La interacción de las CIT–AgNPs y las MBA–AgNPs con las biomembranas modelo se caracterizó por medio de los cambios de presión superficial ($\Delta\pi = f(t)$) en función del tiempo (a un área superficial constante) y por el registro de las isothermas de compresión medidas después de que ocurre la interacción/adsorción. Si bien los cambios observados en la presión superficial ($\Delta\pi$) fueron pequeños, se encontró que la magnitud y el intervalo de presiones laterales del fosfolípido donde las interacciones ocurren dependen del empaquetamiento superficial inicial del DMPC y de la naturaleza química de la molécula protectora de la AgNP.

Para realizar estos experimentos, la monocapa del lípido DMPC se formó esparciendo un cierto volumen de una solución de DMPC (en cloroformo) en la interfase aire/buffer a un área superficial fija. Una vez que se alcanza la presión superficial deseada del DMPC (π_0^{DMPC}) y se mantiene constante por 10 min, se inyecta un volumen de 1.5 mL de la solución de AgNPs dentro de la subfase, y la presión superficial se midió hasta su estabilización ($\pi_f^{DMPC+AgNPs}$). Después de esto, el área de la balanza se redujo obteniéndose la isoterma de compresión. El cambio en la presión superficial ($\Delta\pi$) se calculó como se indica

en la ecuación (6.3); el valor obtenido para $\Delta\pi$ se muestra en la **Tabla 6.1**, y las isothermas de adsorción se muestran en las **Figuras 6.4** y **6.5**.

$$\Delta\pi = (\pi_f^{DMPC+AgNPs}) - (\pi_0^{DMPC}) \quad (6.3)$$

$\pi_0(mN m^{-1})$ DMPC	$\Delta\pi(mN m^{-1})$ CIT-AgNPs/DMPC	$\pi_0(mN m^{-1})$ DMPC	$\Delta\pi(mN m^{-1})$ MBA-AgNPs/DMPC
3.5	1.79	—	—
5.2	3.40	5.7	3.42
10.3	1.10	10.5	2.38
33.6	0.50	30	0

Tabla 6.1. Cambios en la presión superficial ($\Delta\pi$) producidos por la interacción de las CIT-AgNPs y las MBA-AgNPs con monocapas de DMPC empaquetadas a diferentes presiones superficiales iniciales (π_0). La subfase fue una solución buffer de fosfato a pH 7.2, T : 23 ± 1 °C. Para las MBA-AgNPs, los experimentos fueron hechos a (π_0) $\geq 5 mN m^{-1}$.

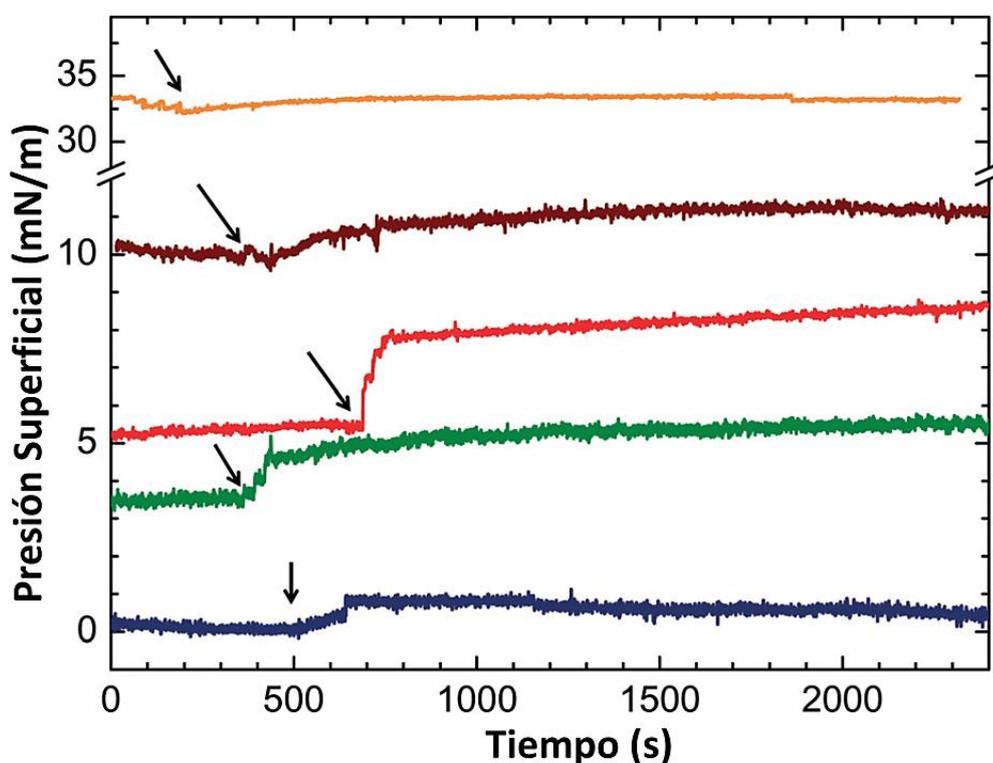


Figura 6.4. Isothermas de adsorción de las CIT-AgNPs en ausencia (línea azul) y en presencia de una monocapa de DMPC, empaquetada inicialmente a $\pi_0^{DMPC} = 3 mN m^{-1}$ (línea verde), $5 mN m^{-1}$ (línea café) y $33 mN m^{-1}$ (línea naranja). Las flechas indican el momento cuando las AgNPs son inyectadas.

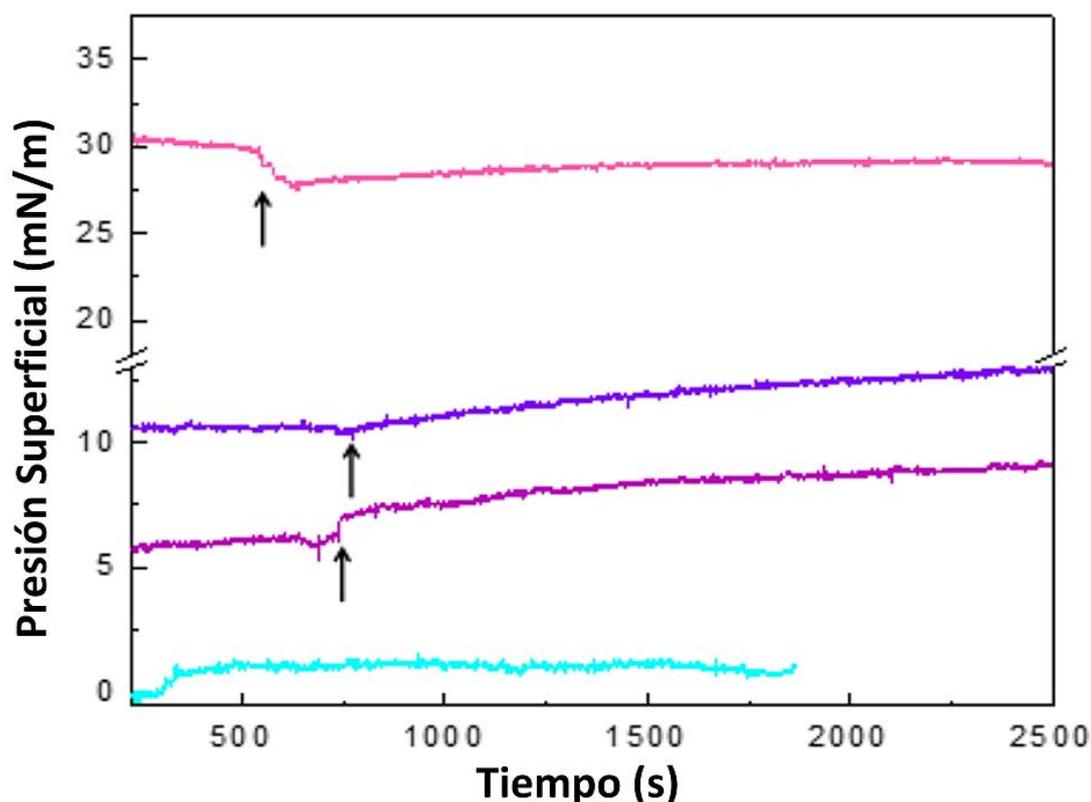


Figura 6.5. Isotermas de adsorción para las MBA-AgNPs en ausencia (línea turquesa) y en presencia de una monocapa de DMPC, empaquetada inicialmente a $\pi_0^{DMPC} = 5 \text{ mN m}^{-1}$ (línea violeta), 10 mN m^{-1} (línea azul) y 30 mN m^{-1} (línea fucsia). Las flechas indican el momento cuando las AgNPs son inyectadas.

Al observar la relación entre $\Delta\pi$ y π_0^{DMPC} en las **Figuras 6.4** y **6.5**, se observa que las CIT-AgNPs y las MBA-AgNPs interactúan más favorablemente con DMPC cuando la monocapa está empaquetada a 5 mN m^{-1} siendo $\Delta\pi$ del mismo orden para ambos tipos de AgNPs. Para presiones iniciales altas de DMPC (π_0^{DMPC}), las AgNPs en la subfase causan cambios despreciables en π , lo que indica que es necesario un cierto grado de empaquetamiento o de organización de la capa de DMPC a fin de que las AgNPs puedan insertarse o adsorberse en la interfase, como se propuso anteriormente.⁵⁸ El intervalo de presión superficial entre 30 y 35 mN m^{-1} en una monocapa ofrece una organización con una compresibilidad comparable a la encontrada principalmente en biomembranas naturales.⁵⁹ Sin embargo, el comportamiento de las membranas naturales es dinámico, y las presiones laterales bajas deben ser tenidas en cuenta en la evaluación de las interacciones en la interfase.⁶⁰

De acuerdo al análisis del comportamiento de las curvas de las **Figuras 6.4 y 6.5**, se seleccionó $\pi_0^{DMPC} \cong 5 \text{ mN m}^{-1}$ para explorar la dependencia de la interacción entre las CIT–AgNPs/DMPC y las MBA–AgNPs/DMPC donde la capa de DMPC se comprime después de la interacción con las AgNPs (**Figuras 6.6a y 6.6b**). Después de inspeccionar las isothermas de compresión, se puede ver que las CIT–AgNPs y las MBA–AgNPs modifican el área ocupada por DMPC cuando se compara con el área obtenida para la monocapa del fosfolípido puro en contacto con la subfase de buffer.

Las CIT–AgNPs cambian el área superficial ocupada por DMPC hasta una presión alrededor de los 35–40 mN m^{-1} (**Figura 6.6a**). Luego de esta región ambas isothermas se superponen hasta el colapso, lo que indica la expulsión de las CIT–AgNPs desde la interfase. En la bibliografía se ha informado la expulsión de NPs de sílica cargadas negativamente (diámetro de 30 nm; potencial zeta de -42 mV) y para AuNPs cubiertas con citrato (diámetro de 17 nm; potencial zeta de -56 mV) de monocapas de un fosfolípido zwitteriónico.³⁵

Por otra parte, para las MBA–AgNPs el cambio en el área relativa al ocupado por el DMPC se mantiene a lo largo de toda la compresión de la película (**Figura 6.6b**). El módulo de compresión superficial C_s^{-1} fue calculado de acuerdo a la **Ecuación 6.4**.⁴⁶ Este parámetro es una característica importante de la monocapa que relaciona su rigidez y la capacidad para almacenar energía elástica.³⁴

$$C_s^{-1} = -A \left(\frac{d\pi}{dA} \right)_T \quad (6.4)$$

En la **Ecuación 6.4**, A representa el área total de la monocapa y se obtiene de las isothermas de Langmuir. A bajas presiones superficiales, las CIT–AgNPs inducen una disminución de C_s^{-1} lo que implica una menor rigidez de la película comparada con el DMPC puro, esta tendencia se observa hasta un área de alrededor 80–82 \AA^2 . Para áreas menores a éstas (mayor empaquetamiento), no se producen cambios en C_s^{-1} del sistema CIT–AgNPs/DMPC con respecto a DMPC, indicando que las CIT–AgNPs no modificaron significativamente la elasticidad superficial de la película, como

se muestra en la **Figura 6.6c**. Sin embargo, para el sistema MBA–AgNPs/DMPC un aumento en C_s^{-1} indica una disminución en la elasticidad de la película debido a la interacción de la monocapa de DMPC con las MBA–AgNPs (**Figura 6.6d**).

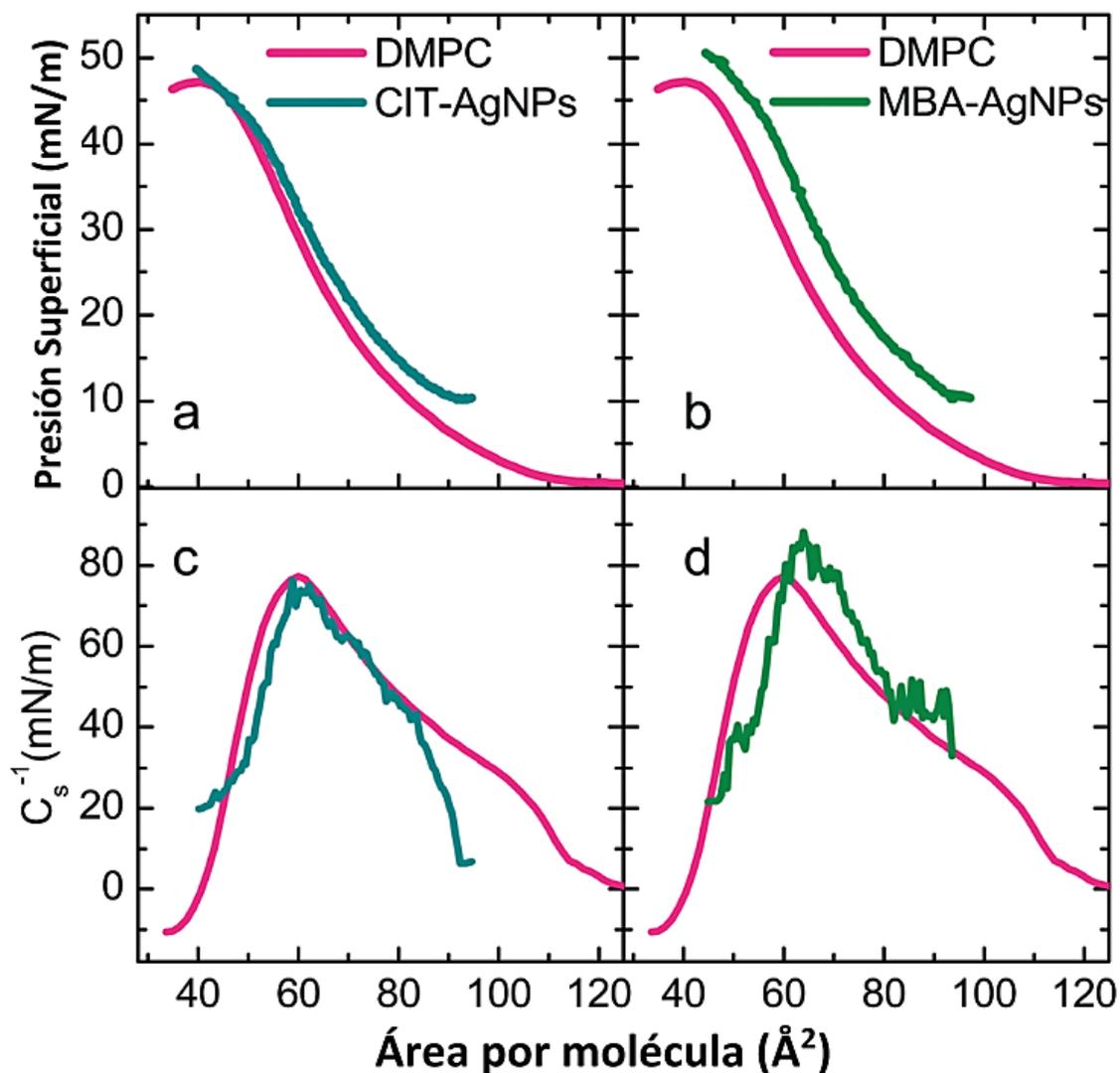


Figura 6.6. Isotermas de compresión (a, b) y el módulo de compresión superficial C_s^{-1} (c, d) obtenido para las CIT–AgNPs (a, c) y las MBA–AgNPs (b, d) adsorbidas en una monocapa de DMPC empaquetada inicialmente a 5 mN m^{-1} .

Un hecho interesante surge cuando se disuelven en la subfase en contacto con DMPC, moléculas citrato o de ácido 4–mercaptobenzoico (que no forman parte del cubrimiento de las AgNPs). En estos casos, no se

observaron cambios con respecto a la isoterma de DMPC obtenida con una subfase buffer; en ambos casos las isotermas se superpusieron (**Figura 6.7**). La concentración de citrato y de ácido 4-mercaptobenzoico en la subfase está en exceso a la que corresponde en la capa protectora de cualquiera de las AgNPs diluidas ($1.35 \times 10^{-2} \text{ mg Ag/mL}$) o concentradas ($4.05 \times 10^{-2} \text{ mg Ag/mL}$). Las áreas en las isotermas de compresión se calcularon en base al área que podría ocupar el DMPC puro.

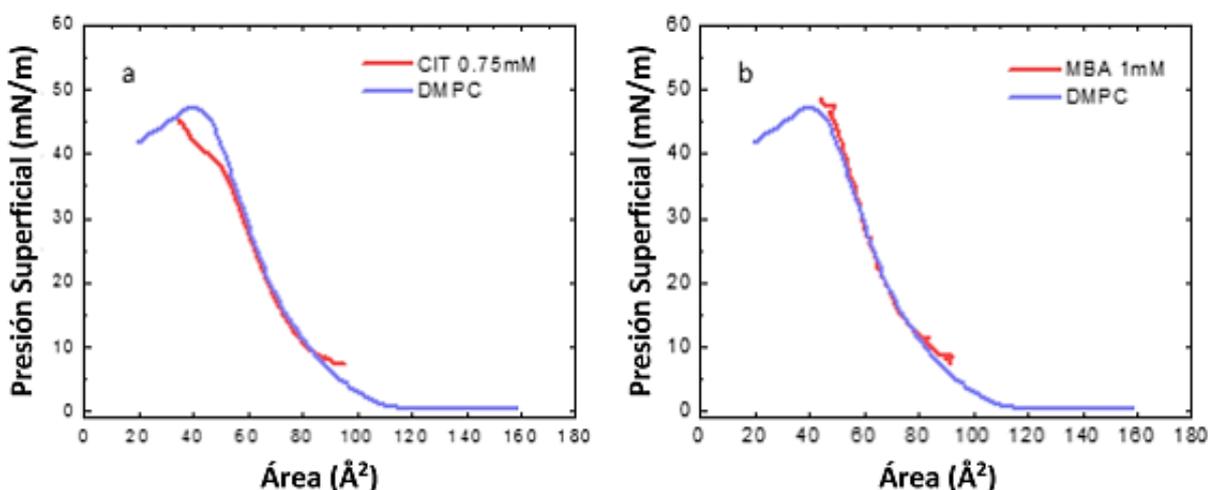


Figura 6.7. Isotermas de compresión obtenidas después de reducir el área de la balanza al adsorber (a) citrato (0,75 mM) y (b) ácido 4-mercaptobenzoico (1 mM) en una solución buffer a pH 7.4 para una monocapa de DMPC empaquetada inicialmente a 5 mN m^{-1} .

Esto refleja la dificultad de transferencia de los iones citrato o MBA desde la fase acuosa a la fase del lípido, contrariamente a lo que se observó para ambas NPs de CIT-AgNPs y MBA-AgNPs (**Figuras 6.6a** y **6.6b**). El componente electrostático de la energía libre de Gibbs dado por la expresión de Born⁶¹ (**Ecuación 6.5**) puede justificar la alta energía que requieren los iones de radio menor (con carga q), comparada con la energía que se requiere cuando los iones son parte de las NPs como agentes protectores para ser transferidos desde la fase acuosa a la capa hidrofóbica del lípido con constantes dieléctricas ϵ_w y ϵ_M , respectivamente.

$$\Delta G_{Born} = -\frac{q^2}{8\pi\epsilon_0 r} \left(\frac{1}{\epsilon_w} - \frac{1}{\epsilon_m} \right) \quad (6.5)$$

Así, los cambios observados en la presión superficial en la **Figura 6.6a** y **6.6b** podrían atribuirse solamente al conjunto de CIT–AgNPs o MBA–AgNPs. Por otra parte, se informó previamente que para las superficies de Au funcionalizadas con MBA o MUA (ácido mercaptoundecanoico), aquella superficie modificada con la capa aromática enlaza mayores cantidades de la proteína BSA (sero albúmina bovina) que la superficie modificada con MUA que contiene una cadena alquílica.⁶² Una posible explicación es la alta densidad electrónica dada por el anillo aromático que favorece las fuerzas de van der Waals con las cadenas hidrocarbonadas de DMPC.

Además del análisis anterior respecto de las interacciones de los anillos aromáticos cabe discutir el rol de los grupos carboxilato terminales ya que ambas AgNPs tienen el mismo comportamiento de interacción hasta 35 – 40 mN m⁻¹ y a presiones más altas, las MBA–AgNPs no son excluidas desde la interfase mientras que las de citrato si lo son.

Dado que ambas AgNPs, CIT–AgNPs y MBA–AgNPs tienen grupos carboxilato terminales con carga negativa al pH de los experimentos, se puede inferir que a $\pi_0^{DMPC} \cong 5 \text{ mN m}^{-1}$, un valor donde ambas AgNPs, CIT–AgNPs y MBA–AgNPs producen el mismo efecto sobre la presión superficial, la interacción preponderante se debe principalmente a las fuerzas electrostáticas atractivas con la carga positiva del átomo de N del grupo polar del DMPC (**Figura 6.8**), como se ha propuesto para las interacciones entre las AuNPs y AgNPs funcionalizadas con citrato,^{52, 63} y NPs hidrofílicas de sílica que interactúan con DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina).^{35, 64}

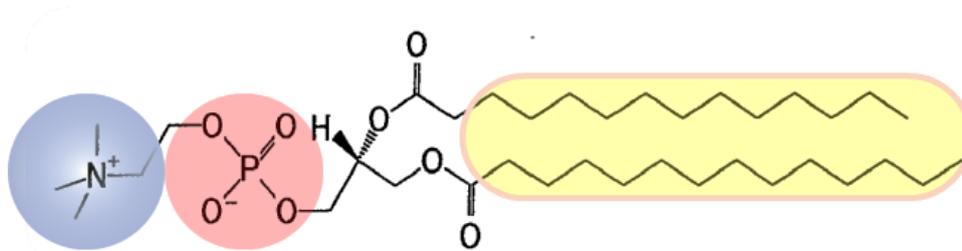


Figura 6.8. Estructura molecular del DMPC. El grupo polar terminal consiste en un parte positiva de amonio cuaternario (azul), un grupo negativo de fosfato (rojo) y la parte hidrofóbica de la molécula (amarillo).

A $\pi_0^{DMPC} \cong 5 \text{ mN m}^{-1}$, ambas AgNPs, CIT–AgNPs y MBA–AgNPs son adsorbidas o parcialmente insertadas en la capa de DMPC, expandiendo el área superficial. Cuando se realiza la compresión, la fuerza lateral favorece un mayor empaquetamiento de las moléculas de DMPC, optimizando sus fuerzas de van der Waals que son más importantes que las interacciones electrostáticas que se establecen con las CIT–AgNPs, recuperándose el comportamiento del DMPC puro, mientras que esto no ocurre con las MBA–AgNPs (**Figura 6.6a**).

La topografía de la interfase desde el lado del aire se visualizó por BAM. Una serie de imágenes desde el tiempo inicial de la inyección de las NPs dentro de la subfase hasta los 110 min se muestra en la **Figura 6.9**. En este experimento, las AgNPs son inyectadas dentro de la subfase en una balanza de Langmuir donde se equilibra el DMPC a $\pi_0^{DMPC} \cong 5 \text{ mN m}^{-1}$. Las imágenes del buffer puro y del DMPC (mostradas en las primeras dos imágenes de ambas secuencias) exhiben una topografía homogénea, y no se observaron cambios durante períodos de tiempo comparables a los de las siguientes imágenes que corresponden a soluciones buffer que contienen AgNPs. A lo largo de las 110 min, unos pocos puntos brillantes aparecen en la interfase, que son atribuidos a las AgNPs, CIT–AgNPs y MBA–AgNPs, interactuando con el fosfolípido, como se muestra en las **Figuras 6.9** y **6.10**. Este resultado va de acuerdo con las isothermas de adsorción y las isothermas de compresión descriptas previamente.

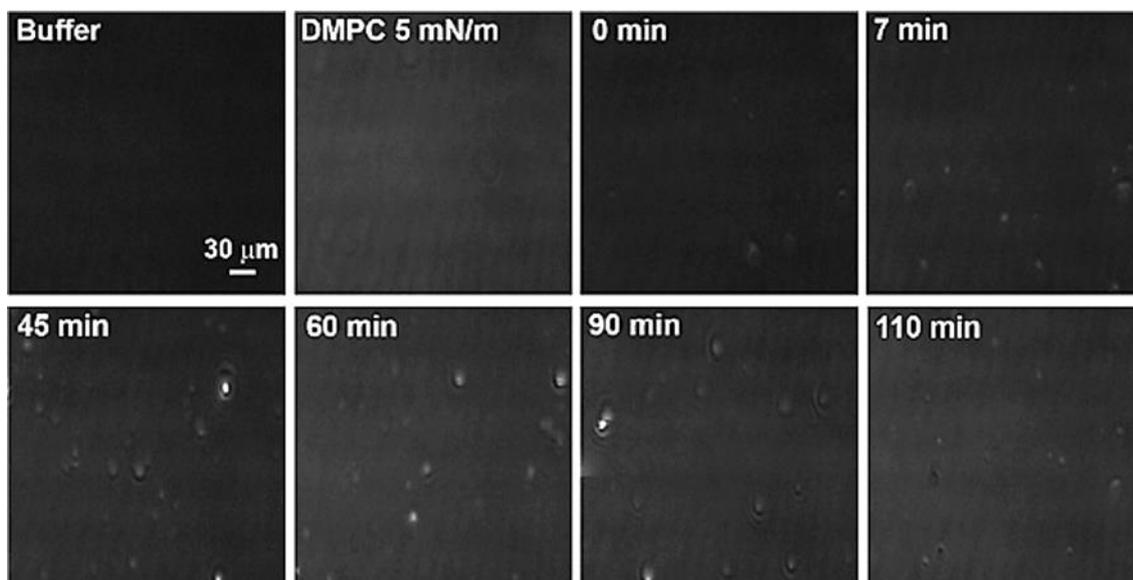


Figura 6.9. Secuencia temporal de imágenes BAM de una monocapa de DMPC a 5 mN m^{-1} en contacto con una solución buffer a pH 7.2 conteniendo CIT-AgNPs.

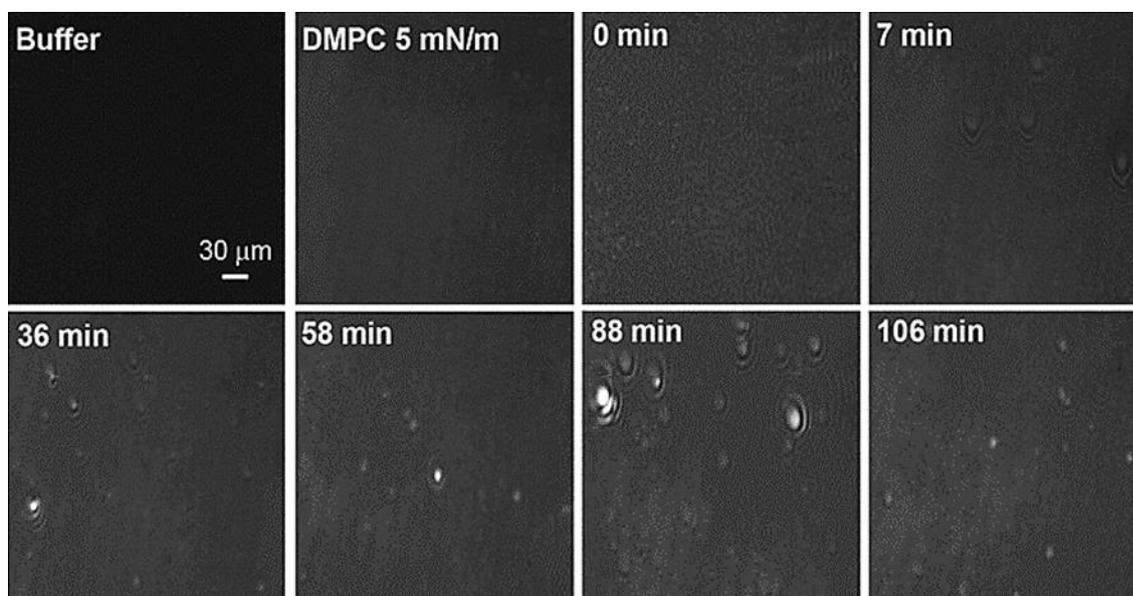


Figura 6.10. Secuencia temporal de imágenes BAM de una monocapa de DMPC a 5 mN m^{-1} en contacto con una solución buffer a pH 7.2 conteniendo MBA-AgNPs.

Teniendo en cuenta toda la evidencia experimental, la tendencia general indica que estas AgNPs interactúan con la cabeza polar del lípido sin insertarse completamente o penetrar a través de la monocapa lipídica. Sin embargo, ellas permanecen adsorbidas en la interfase, perturbando o modificando el empaquetamiento del fosfolípido (como se indica en las isotermas), lo que puede tener fuertes implicaciones en sus efectos toxicológicos considerando que su degradación produce iones plata^{63, 65, 66} cuya difusión podría facilitarse teniendo en cuenta la expansión y el desarreglo de la capa lipídica producida por la adsorción/inserción de las AgNPs. Los iones Ag^+ podrían participar en la formación de especies reactivas de oxígeno (EROS) que promueve reacciones oxidativas en la membrana celular y en el interior de la célula en organismos vivos.⁶⁷

Ahora, la pregunta acerca de la naturaleza de las fuerzas fisicoquímicas que permiten la permanencia de las MBA–AgNPs a lo largo de todas las presiones marca un hecho que señala que hay otro componente que permite una interacción más fuerte. Esto podría deberse a las interacciones electrostáticas mayores de las MBA–AgNPs comparadas con las CIT–AgNPs y/o las fuerzas hidrofóbicas entre las MBA–AgNPs y las colas hidrocarbonadas del DMPC, tal como ya fue analizado previamente en esta sección.

6.3.2. Estructura superficial del citrato y del MBA adsorbidos en AgNPs.

Los resultados obtenidos mediante XPS (*Capítulo 4, Sección 4.4.2.1, Tabla 4.1*) muestran que la relación atómica de los grupos carboxílicos en las MBA–AgNPs es tres veces mayor que en las CIT–AgNPs. Nuestros datos previos de la adsorción del ácido 4–mercaptobenzoico en superficies lisas de Ag (*capítulo 3*) indican que el MBA se adsorbe sobre la Ag a través del enlace tiolato exponiendo los grupos carboxilato hacia la parte externa de la interfase (**Figura 6.11**).

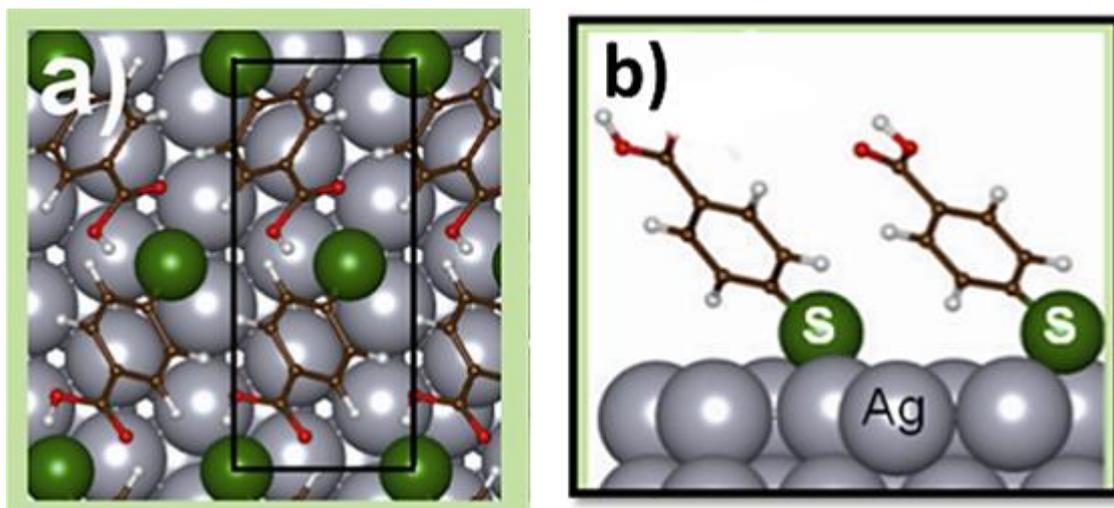


Figura 6.11. (a) Vista superior (b) Vista lateral de la red $(\sqrt{3} \times 4)$ de MBA sobre Ag (111).

En el caso de las CIT–AgNPs, considerando que el citrato tiene tres grupos carboxilato por molécula, surge la pregunta de cuál de ellos están involucrados en la adsorción sobre la Ag y cuál de ellos están expuestos a la solución y son capaces de interactuar con los grupos polares de las monocapas de DMPC.

Los cálculos de DFT se emplearon para explorar las características energéticas y estructurales de la adsorción del citrato sobre superficies lisas de Ag (111) ya que este plano es preponderante para las AgNPs, como se demostró en las imágenes de HRTEM. Una estimación aproximada utilizando el modelo de Marks para simular las imágenes HRTEM, da que más del 85% de los átomos metálicos se extienden en las caras de tipo $\{111\}$ y los restantes en las caras de tipo $\{100\}$, tal como se indica en la **Figura 6.12**. Allí se puede observar una partícula de acuerdo al modelo de Marks de una estructura fcc arbitraria. Utilizando este modelo, se pudo constatar que la superficie (111) tiene 104 átomos. Por lo tanto, en la figura de la derecha pueden verse los 521 átomos. Además, el plano $(\bar{1}11)$ y el plano $(1\bar{1}1)$ contiguo, tienen 70 átomos. La adición de los átomos sobre las caras $\{111\}$ es 1392. En tanto, el plano (100) contiene 48 átomos. Así que, todos los átomos de las caras $\{100\}$ son 240. Por esta razón, el porcentaje de átomos puestos en las caras $\{111\}$ es: $1392/(1392+240)$. En otras

palabras, más del 85% de los átomos están sobre las caras $\{111\}$ en esta estructura.

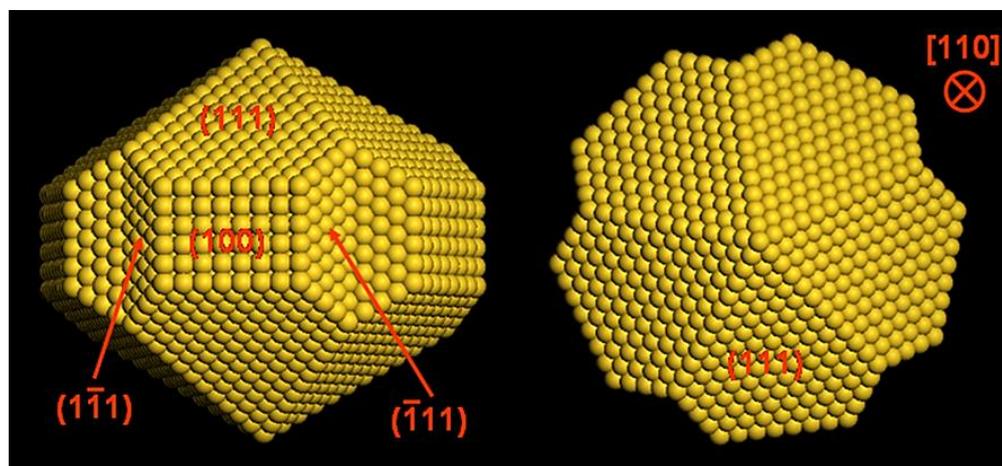


Figura 6.12. Modelo del decaedro de Marks de una fcc $[100]$ y de una fcc $[110]$. Todas las caras son etiquetadas de acuerdo a una estructura fcc.

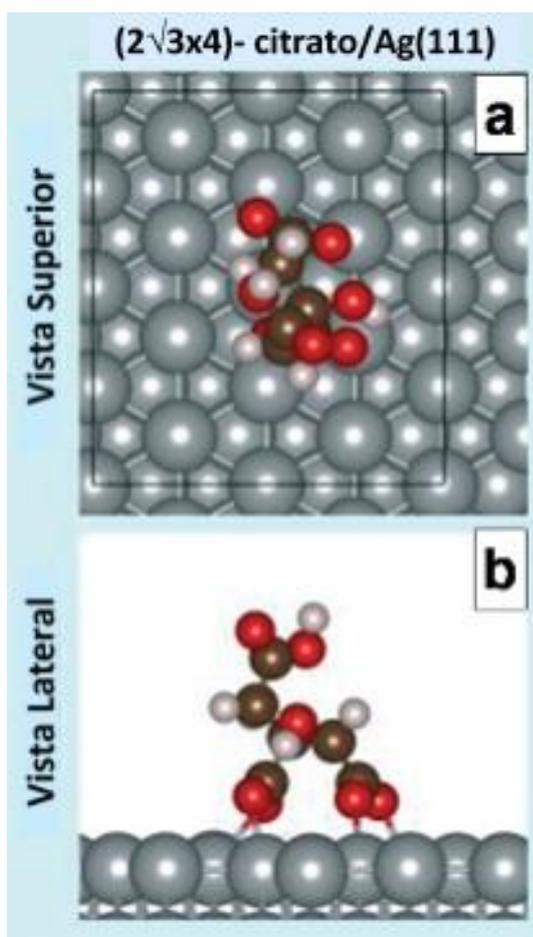


Figura 6.13. Estructura optimizada para el citrato (CIT) sobre Ag (111) . Gris: Ag. Café: C. Rojo: O. Blanco: H.

La estructura del citrato sobre la Ag (111) se muestra en la **Figura 6.13**, los parámetros estructurales y energéticos obtenidos para esta configuración se enumeran en la **Tabla 6.2**. El radical citrato se adsorbió sobre la superficie de Ag (111) a través de uno de los grupos carboxilato terminales y del carboxilato central $\eta_2\text{-COO}^-$ estando el otro grupo COOH terminal libre expuesto a la solución.

Red Superficial	$2(\sqrt{3} \times 4)$
θ	0.063
E_b/eV	-1.44
$\gamma/\text{me}\text{\AA}^{-2}$	-12.12
$d(\text{Ag-O})/\text{\AA}$	2.28

Tabla 6.2. Cubrimiento (θ), energía de enlace promedio (E_b), energía libre de Gibbs de adsorción (γ) y distancia Ag-O del citrato (CIT) sobre Ag (111).

La relación atómica obtenida experimentalmente mediante XPS (r) $\text{COO}_{\text{Tot}}/\text{Ag}$ para las CIT-AgNPs fue de 0.26 (Capítulo 4, Tabla 4.1), lo que implica que esta relación para las moléculas de citrato es $\cong 0.09$ (tres grupos carboxilato por molécula). La configuración predicha por los cálculos de DFT indica que dos carboxilatos están involucrados en la adsorción sobre la superficie de Ag y el otro resto carboxílico se expone a la parte exterior de la interfase (**Figura 6.13b**, vista lateral). La relación atómica XPS experimental $\text{COO}_{\text{Tot}}/\text{Ag}$ para las MBA-AgNPs fue de 0.75 (Capítulo 4, Tabla 4.1), ocho veces mayor que la correspondiente al grupo carboxilato expuesto a la interfase de las CIT-AgNPs (0.09). De este modo, se podría inferir que al principio del experimento de compresión, después de que las AgNPs interactúan con el DMPC empaquetado a 5 mN m^{-1} , los grupos carboxilato en ambos tipos de AgNPs, CIT-AgNPs y MBA-AgNPs, interactúan de la misma manera con el amonio del grupo de la cabeza polar del DMPC adoptando una configuración donde la monocapa es 10–15% más expandida que en

ausencia de AgNPs en la subfase. Cuando se comprime la monocapa, las CIT–AgNPs son excluidas debido a las menores interacciones electrostáticas, avaladas por las relaciones atómicas más arriba mencionadas, en comparación con las MBA–AgNPs que permanecen en la interfase hasta el colapso de la monocapa. Experimentos realizados con liposomas de diferentes tipos de lípidos, mostraron que el cambio de fase local en el fosfolípido parece depender de la densidad y ubicación de las cargas superficiales de las NPs; donde NPs con altas densidades de carga superficial inducen a la reorganización estructural de los lípidos y modifican su estado de fase a nivel local.^{26, 68} La naturaleza química del citrato o del ácido 4–mercaptobenzoico no es responsable por los cambios en la presión superficial observada en las **Figuras 6.6a** y **b**, que sólo podría ser atribuido al conjunto de las CIT–AgNPs o de las MBA–AgNPs. El hecho de que las NPs con similar potencial zeta y diferentes estructuras en cuanto al modificador superficial tal como las AgNPs empleadas en esta tesis que tienen diferentes comportamientos en su interacción con membranas fue también observado para las AuNPs en su interacción con células.⁶⁹ Nuestra evidencia experimental y los cálculos teóricos sugieren que lo que juega un papel importante, y define probablemente el tipo y la magnitud de las interacciones establecidas, es la densidad de carga superficial sobre la superficie de la NP y no el potencial zeta macroscópico.

Adicionalmente, las interacciones hidrofóbicas del anillo aromático del MBA con la cadena hidrocarbonada del DMPC podrían jugar un papel importante, favoreciendo el anclaje de las AgNPs. Simulaciones de dinámica molecular atomística hechas por Van Lehn, *et.al.*, mostraron una ruta donde un único ligando hidrofóbico, ancla la NP a la bicapa, permitiendo un contacto próximo con la superficie de la membrana hasta que ocurra la salida del lípido y facilite la inserción como se indica en las **Figuras 6.14** y **6.15**.⁷⁰ Una NP fijada en la interfase aumenta la aparición de protrusiones de la cola del lípido, reduciendo la barrera para la inserción de NPs adicionales como en un proceso cinético de nucleación y crecimiento.⁷¹

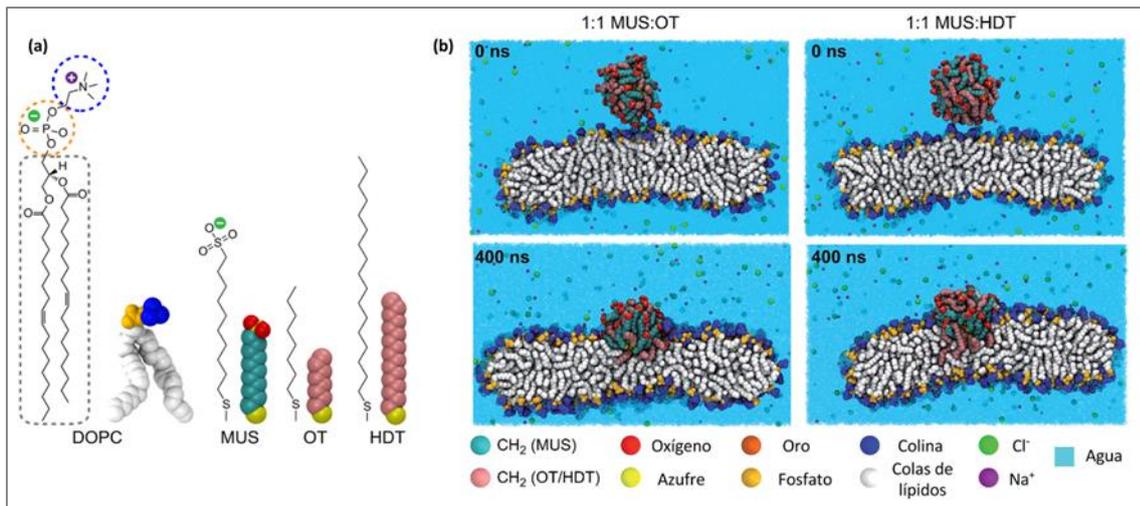


Figura 6.14. Resumen de componentes de simulación. (a) Estructuras químicas y representaciones de simulación, del lípido DOPC y tres ligandos monocapa. (b) Instantáneas de ambas NPs tanto de 1:1 MUS:OT (izq.) como de 1:1 MUS:HDT (der.), en sus configuraciones iniciales por encima de la cinta de lípidos y 400ns de simulación posteriores de la inserción.⁷⁰

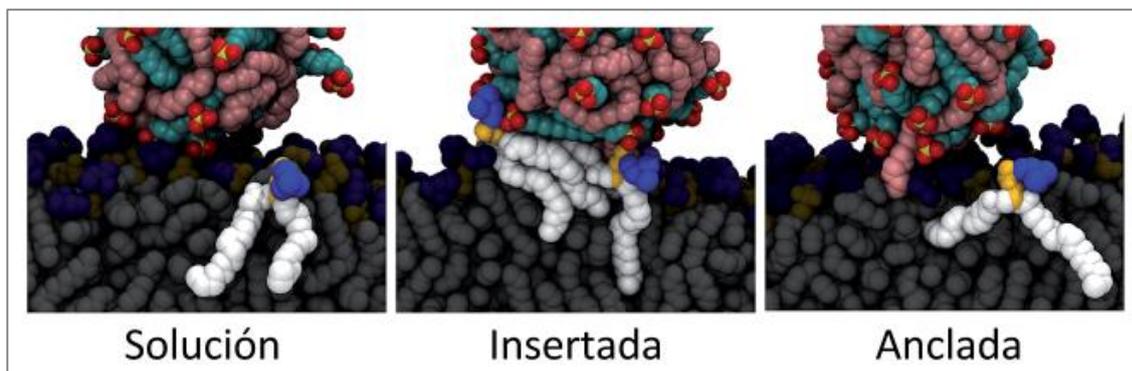


Figura 6.15. Capturas Instantáneas de simulación de tres posibles resultados para NPs. Se clasifica a la NP como en "solución", debido a la relajación de la protuberancia sin el contacto continuo de la NP. La NP fue clasificada como "insertada" con el rápido aumento de los contactos hidrofóbicos, indicando el inicio de la fusión bicapa–NP. La NP podría estar "anclada" cuando la protrusión se relaja de nuevo en la bicapa, pero un ligando hidrofóbico de la NP se inserta dentro del núcleo hidrofobo.⁷⁰

Se debe también tener en cuenta que las interacciones hidrofóbicas dependen del (r) como $1/r^6$, mientras que las fuerzas electrostáticas varían con $1/r$. Por lo tanto, en las MBA–AgNPs, la sinergia de ambas fuerzas de largo alcance (hidrofóbicas) y de corto alcance (electrostáticas) contribuye a estabilizar su permanencia en la interfase y son responsables de la diferencia con las CIT–AgNPs en las interacciones con el DMPC, tal como se ve reflejado en las isothermas de compresión.

CONCLUSIONES

- ✓ Dos tipos de AgNPs cargadas negativamente que poseen el mismo tamaño de núcleo y una sección transversal muy similar, funcionalizadas con citrato (CIT–AgNPs) o ácido 4–mercaptobenzoico (MBA–AgNPs), siguen dos regímenes distintos en sus interacciones con monocapas de Langmuir de DMPC. A bajas presiones superficiales, ambos tipos de AgNPs interactúan de forma similar, expandiendo el área molecular del fosfolípido. Después de la compresión, las CIT–AgNPs son excluidas desde la interfase, mientras que las MBA–AgNPs se mantienen adsorbidas.
- ✓ Las imágenes de BAM no mostraron cambios ni en la penetración, ni en la reflectividad de DMPC, lo cual indica que la interacción se limita a la interfase AgNPs/DMPC.
- ✓ Los resultados de XPS y cálculos de DFT revelan una mayor densidad de aniones carboxilato en las MBA–AgNPs que en las CIT–AgNPs.
- ✓ La falta de expansión para DMPC en presencia de soluciones, ya sea de citrato o MBA, confirma que es necesario el conjunto de estas moléculas con AgNPs para deformar la monocapa del fosfolípido.
- ✓ La permanencia de las MBA–AgNPs en todo el rango de presiones superficiales, podría interpretarse sobre la base de sus altas interacciones electrostáticas con la fracción positiva del amonio del final polar de DMPC, y a las interacciones hidrofóbicas mediadas por los grupos aromáticos con las protuberancias de la cola hidrofóbica del fosfolípido o a los defectos de la monocapa del lípido, donde favorece la proximidad del anillo aromático con la cadena hidrocarbonada. Estos resultados destacan la importancia de entender, a nivel molecular, las interacciones entre nanomateriales y membranas para evaluar sus potenciales efectos toxicológicos a largo plazo.

Referencias Bibliográficas

- [1] Foss Hansen, S.; Heggelund, L. R.; Revilla Besora, P.; Mackevica, A.; Boldrin, A.; Baun, A., Nanoproducts - what is actually available to European consumers? *Environmental Science: Nano* **2016**, 3 (1), 169-180.
- [2] Mie, G., Contributions to the optics of turbid media, particularly of colloidal metal solutions. *Contributions to the optics of turbid media, particularly of colloidal metal solutions Transl. into ENGLISH from Ann. Phys.(Leipzig)*, v. 25, no. 3, 1908 p 377-445 **1976**, 1, 377-445.
- [3] Wijnhoven, S. W. P.; Peijnenburg, W. J. G. M.; Herberts, C. A.; Hagens, W. I.; Oomen, A. G.; Heugens, E. H. W.; Roszek, B.; Bisschops, J.; Gosens, I.; Van De Meent, D.; Dekkers, S.; De Jong, W. H.; van Zijverden, M.; Sips, A. J. A. M.; Geertsma, R. E., Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology* **2009**, 3 (2), 109-138.
- [4] Morones, J. R.; Elechiguerra, J. L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J., B.; Tapia Ramírez, J.; Yacaman, M. J., The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **2005**, 16 (10), 2346.
- [5] Li, C.-C.; Chang, S.-J.; Su, F.-J.; Lin, S.-W.; Chou, Y.-C., Effects of capping agents on the dispersion of silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2013**, 419, 209-215.
- [6] Sun, Y., Controlled synthesis of colloidal silver nanoparticles in organic solutions: empirical rules for nucleation engineering. *Chemical Society Reviews* **2013**, 42 (7), 2497-2511.
- [7] Pacioni, N. L.; Borsarelli, C. D.; Rey, V.; Veglia, A. V., Synthetic Routes for the Preparation of Silver Nanoparticles. In *Silver Nanoparticle Applications*, Alarcon, E. I.; Griffith, M.; Udekwu, K. I., Eds. Springer International Publishing: 2015; pp 13-46.
- [8] Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J., A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society* **1951**, 11 (0), 55-75.
- [9] Henglein, A.; Giersig, M., Formation of Colloidal Silver Nanoparticles: Capping Action of Citrate. *The Journal of Physical Chemistry B* **1999**, 103 (44), 9533-9539.
- [10] Rycenga, M.; Cobley, C. M.; Zeng, J.; Li, W.; Moran, C. H.; Zhang, Q.; Qin, D.; Xia, Y., Controlling the Synthesis and Assembly of Silver Nanostructures for Plasmonic Applications. *Chemical Reviews* **2011**, 111 (6), 3669-3712.
- [11] Stamplecoskie, K. G.; Scaiano, J. C.; Tiwari, V. S.; Anis, H., Optimal Size of Silver Nanoparticles for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C* **2011**, 115 (5), 1403-1409.
- [12] Quang Huy, T.; Van Quy, N.; Anh-Tuan, L., Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* **2013**, 4 (3), 033001.
- [13] Johnston, H. J.; Hutchison, G.; Christensen, F. M.; Peters, S.; Hankin, S.; Stone, V., A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Critical Reviews in Toxicology* **2010**, 40 (4), 328-346.
- [14] Nel, A. E.; Madler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M. V.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M., Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater* **2009**, 8 (7), 543-557.
- [15] Kim, T.-H.; Kim, M.; Park, H.-S.; Shin, U. S.; Gong, M.-S.; Kim, H.-W., Size-dependent cellular toxicity of silver nanoparticles. *J Biomed Mater Res A* **2012**, 100A (4), 1033-1043.
- [16] Mahmoudi, M.; Meng, J.; Xue, X.; Liang, X. J.; Rahman, M.; Pfeiffer, C.; Hartmann, R.; Gil, P. R.; Pelaz, B.; Parak, W. J.; del Pino, P.; Carregal-Romero, S.; Kanaras, A. G.; Tamil Selvan, S., Interaction of stable colloidal nanoparticles with cellular membranes. *Biotechnol. Adv.* **2014**, 32 (4), 679-692.
- [17] Mu, Q.; Jiang, G.; Chen, L.; Zhou, H.; Fourches, D.; Tropsha, A.; Yan, B., Chemical Basis of Interactions Between Engineered Nanoparticles and Biological Systems. *Chem.Rev.* **2014**, 114 (15), 7740-7781.
- [18] Verma, A.; Stellacci, F., Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions. *Small* **2010**, 6 (1), 12-21.
- [19] Baroli, B.; Ennas, M. G.; Loffredo, F.; Isola, M.; Pinna, R.; Lopez-Quintela, M. A., Penetration of Metallic Nanoparticles in Human Full-Thickness Skin. *J Invest Dermatol* **2007**, 127 (7), 1701-1712.
- [20] Shang, L.; Nienhaus, K.; Nienhaus, G., Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *J Nanobiotechnology* **2014**, 12 (1), 5.

- [21] Zhu, M.; Nie, G.; Meng, H.; Xia, T.; Nel, A.; Zhao, Y., Physicochemical properties determine nanomaterial cellular uptake, transport, and fate. *Accounts of chemical research* **2012**, *46* (3), 622-631.
- [22] Warren, E. A. K.; Payne, C. K., Cellular binding of nanoparticles disrupts the membrane potential. *RSC Advances* **2015**, *5* (18), 13660-13666.
- [23] Shin, E. H.; Li, Y.; Kumar, U.; Sureka, H. V.; Zhang, X.; Payne, C. K., Membrane potential mediates the cellular binding of nanoparticles. *Nanoscale* **2013**, *5* (13), 5879-5886.
- [24] Kodali, V.; Littke, M. H.; Tilton, S. C.; Teeguarden, J. G.; Shi, L.; Frevert, C. W.; Wang, W.; Pounds, J. G.; Thrall, B. D., Dysregulation of Macrophage Activation Profiles by Engineered Nanoparticles. *ACS Nano* **2013**, *7* (8), 6997-7010.
- [25] Van Lehn, R. C.; Ricci, M.; Silva, P. H. J.; Andreozzi, P.; Reguera, J.; Voïtchovsky, K.; Stellacci, F.; Alexander-Katz, A., Lipid tail protrusions mediate the insertion of nanoparticles into model cell membranes. *Nature Communications* **2014**, *5*.
- [26] Wang, B.; Zhang, L.; Bae, S. C.; Granick, S., Nanoparticle-induced surface reconstruction of phospholipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (47), 18171-18175.
- [27] Lin, J.; Zhang, H.; Chen, Z.; Zheng, Y., Penetration of Lipid Membranes by Gold Nanoparticles: Insights into Cellular Uptake, Cytotoxicity, and Their Relationship. *ACS Nano* **2010**, *4* (9), 5421-5429.
- [28] Goodman, C. M.; McCusker, C. D.; Yilmaz, T.; Rotello, V. M., Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15* (4), 897-900.
- [29] Cho, E. C.; Xie, J.; Wurm, P. A.; Xia, Y., Understanding the Role of Surface Charges in Cellular Adsorption versus Internalization by Selectively Removing Gold Nanoparticles on the Cell Surface with a I2/KI Etchant. *Nano Lett.* **2009**, *9* (3), 1080-1084.
- [30] Girard-Egrot, A. P.; Blum, L. J., Langmuir-Blodgett Technique for Synthesis of Biomimetic Lipid Membranes. In *Nanobiotechnology of Biomimetic Membranes*, Martin, D. K., Ed. Springer: New York, 2007; Vol. .
- [31] Tatur, S.; Badia, A., Influence of hydrophobic alkylated gold nanoparticles on the phase behavior of monolayers of DPPC and clinical lung surfactant. *Langmuir* **2012**, *28* (1), 628-639.
- [32] Tatur, S.; Maccarini, M.; Barker, R.; Nelson, A.; Fragneto, G., Effect of Functionalized Gold Nanoparticles on Floating Lipid Bilayers. *Langmuir* **2013**, *29* (22), 6606-6614.
- [33] Troiano, J. M.; Olenick, L. L.; Kuech, T. R.; Melby, E. S.; Hu, D.; Lohse, S. E.; Mensch, A. C.; Dogangun, M.; Vartanian, A. M.; Torelli, M. D.; Ehimiaghe, E.; Walter, S. R.; Fu, L.; Anderton, C. R.; Zhu, Z.; Wang, H.; Orr, G.; Murphy, C. J.; Hamers, R. J.; Pedersen, J. A.; Geiger, F. M., Direct probes of 4 nm diameter gold nanoparticles interacting with supported lipid bilayers. *J.Phys.Chem.C* **2015**, *119* (1), 534-546.
- [34] Guzmán, E.; Liggieri, L.; Santini, E.; Ferrari, M.; Ravera, F., Effect of Hydrophilic and Hydrophobic Nanoparticles on the Surface Pressure Response of DPPC Monolayers. *J.Chem.Phys.C* **2011**, *115* (44), 21715-21722.
- [35] Torrano, A. A.; Pereira, Â. S.; Oliveira Jr, O. N.; Barros-Timmons, A., Probing the interaction of oppositely charged gold nanoparticles with DPPG and DPPC Langmuir monolayers as cell membrane models. *Colloids Surf., B, Biointerfaces* **2013**, *108*, 120-126.
- [36] You, S. S.; Rashkov, R.; Kanjanaboos, P.; Calderon, I.; Meron, M.; Jaeger, H. M.; Lin, B., Comparison of the Mechanical Properties of Self-Assembled Langmuir Monolayers of Nanoparticles and Phospholipids. *Langmuir* **2013**, *29* (37), 11751-11757.
- [37] Matshaya, T. J.; Lanterna, A. E.; Granados, A. M.; Krause, R. W. M.; Maggio, B.; Vico, R. V., Distinctive interactions of oleic acid covered magnetic nanoparticles with saturated and unsaturated phospholipids in langmuir monolayers. *Langmuir* **2014**, *30* (20), 5888-5896.
- [38] Pallaoro, A.; Braun, G. B.; Reich, N. O.; Moskovits, M., Mapping Local pH in Live Cells Using Encapsulated Fluorescent SERS Nanotags. *Small* **2010**, *6* (5), 618-622.
- [39] Talley, C. E.; Jusinski, L.; Hollars, C. W.; Lane, S. M.; Huser, T., Intracellular pH Sensors Based on Surface-Enhanced Raman Scattering. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (23), 7064-7068.
- [40] Kneipp, J.; Kneipp, H.; Kneipp, K., SERS-a single-molecule and nanoscale tool for bioanalytics. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (5), 1052-1060.
- [41] Kneipp, J.; Kneipp, H.; Wittig, B.; Kneipp, K., Following the Dynamics of pH in Endosomes of Live Cells with SERS Nanosensors†. *J.Phys.Chem.C* **2010**, *114* (16), 7421-7426.
- [42] Scaffidi, J.; Gregas, M.; Seewaldt, V.; Vo-Dinh, T., SERS-based plasmonic nanobiosensing in single living cells. *Anal Bioanal Chem* **2009**, *393* (4), 1135-1141.
- [43] Wang, F.; Widejko, R. G.; Yang, Z.; Nguyen, K. T.; Chen, H.; Fernando, L. P.; Christensen, K. A.; Anker, J. N., Surface-Enhanced Raman Scattering Detection of pH with Silica-Encapsulated 4-Mercaptobenzoic Acid-Functionalized Silver Nanoparticles. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (18), 8013-8019.

- [44] Raghda, E.-D.; Mariam, G.; Hassan, M. E. A., Silver Nanostructures: Properties, Synthesis, and Biosensor Applications. In *Functional Nanoparticles for Bioanalysis, Nanomedicine, and Bioelectronic Devices Volume 1*, American Chemical Society: 2012; Vol. 1112, pp 359-404.
- [45] Han, X.; Wang, H.; Ou, X.; Zhang, X., Silicon Nanowire-Based Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Endoscope for Intracellular pH Detection. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2013**, *5* (12), 5811-5814.
- [46] Gaines, G. L., Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces. In *Interscience Monographs on Physical Chemistry*, First ed.; Prigogine, I., Ed. Wiley Interscience: New York, 1966.
- [47] Kresse, G.; Hafner, J., Ab-initio Molecular-dynamics for Open-shell Transition-metals. *Phys.Rev.B* **1993**, *48* (17), 13115-13118.
- [48] Kresse, G.; Furthmüller, J., Efficiency of ab-initio Total Energy Calculations for Metals and Semiconductors Using a Plane-wave Basis Set. *Comput. Mater. Sci.* **1996**, *6* (1), 15-50.
- [49] Dion, M.; Rydberg, H.; Schröder, E.; Langreth, D. C.; Lundqvist, B. I., Van der Waals Density Functional for General Geometries. *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *92* (24), 246401.
- [50] Klimes, J.; Bowler, D. R.; Michaelides, A., A Critical Assessment of Theoretical Methods for Finding Reaction Pathways and Transition States of Surface Processes. *J. Phys.: Condens. Matter* **2010**, *22* (7), 074203-074203.
- [51] Blöchl, P. E., Projector Augmented-wave Method. *Phys.Rev.B* **1994**, *50* (24), 17953-17979.
- [52] Monkhorst, H. J.; Pack, J. D., Special Points for Brillouin-Zone Integrations. *Phys.Rev.B* **1976**, *13* (12), 5188-5192.
- [53] Pearson, W. B., *Handbook of Lattice Spacing and Structure of Metals*. Pergamon Press, Inc.: New York, 1958.
- [54] Clogston, J. D.; Patri, A. K., Zeta potential measurement. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* **2011**, *697*, 63-70.
- [55] Maestro, A.; Guzmán, E.; Ortega, F.; Rubio, R. G., Contact angle of micro- and nanoparticles at fluid interfaces. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2014**, *19* (4), 355-367.
- [56] Maestro, A.; Santini, E.; Zabiegaj, D.; Llamas, S.; Ravera, F.; Liggieri, L.; Ortega, F.; Rubio, R. G.; Guzman, E., Particle and Particle-Surfactant Mixtures at Fluid Interfaces: Assembly, Morphology, and Rheological Description. *Adv.Cond.Matter Phys.* **2015**, *2015*, 17.
- [57] Wi, H. S.; Cingarapu, S.; Klabunde, K. J.; Low, B. M., Nanoparticle Adsorption at Liquid-Vapor Surfaces: Influence of Nanoparticle Thermodynamics, Wettability, and Line Tension. *Langmuir* **2011**, *27* (16), 9979-9984.
- [58] Dai, S.; Zhang, X.; Du, Z.; Huang, Y.; Dang, H., Structural properties and Raman spectroscopy of lipid Langmuir monolayers at the air-water interface. *Colloids Surf., B, Biointerfaces* **2005**, *42* (1), 21-28.
- [59] Marsh, D., Lateral pressure in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1996**, *1286* (3), 183-223.
- [60] McMahon, H. T.; Gallop, J. L., Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* **2005**, *438* (7068), 590-596.
- [61] Volkov, A. G.; Hampton, T., Chapter 5 Energetics of Membrane Permeability. In *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, Liu, A. L., Ed. Academic Press: 2008; Vol. 8, pp 155-199.
- [62] Vallée, A.; Humblot, V.; Al Housseiny, R.; Boujday, S.; Pradier, C.-M., BSA adsorption on aliphatic and aromatic acid SAMs: Investigating the effect of residual surface charge and sublayer nature. *Colloids Surf., B, Biointerfaces* **2013**, *109*, 136-142.
- [63] Fen, L. B.; Chen, S.; Kyo, Y.; Herpoldt, K.-L.; Terrill, N. J.; Dunlop, I. E.; McPhail, D. S.; Shaffer, M. S.; Schwander, S.; Gow, A.; Zhang, J.; Chung, K. F.; Tetley, T. D.; Porter, A. E.; Ryan, M. P., The Stability of Silver Nanoparticles in a Model of Pulmonary Surfactant. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47* (19), 11232-11240.
- [64] Guzmán, E.; Liggieri, L.; Santini, E.; Ferrari, M.; Ravera, F., Influence of silica nanoparticles on phase behavior and structural properties of DPPC—Palmitic acid Langmuir monolayers. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **2012**, *413*, 280-287.
- [65] Sridhar, R.; Madhaiyan, K.; Sundarrajan, S.; Gora, A.; Venugopal, J. R.; Ramakrishna, S., Cross-linking of protein scaffolds for therapeutic applications: PCL nanofibers delivering riboflavin for protein cross-linking. *J.Mat.Chem.B* **2014**, *2* (12), 1626-1633.
- [66] Pallavicini, P.; Taglietti, A.; Dacarro, G.; Antonio Diaz-Fernandez, Y.; Galli, M.; Grisoli, P.; Patrini, M.; Santucci De Magistris, G.; Zanoni, R., Self-assembled monolayers of silver nanoparticles firmly grafted on glass surfaces: Low Ag⁺ release for an efficient antibacterial activity. *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *350* (1), 110-116.
- [67] Cordeiro, R. M., Reactive oxygen species at phospholipid bilayers: Distribution, mobility and permeation. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1838* (1, Part B), 438-444.

- [68] Dawson, K. A.; Salvati, A.; Lynch, I., Nanotoxicology: Nanoparticles reconstruct lipids. *Nat Nano* **2009**, *4* (2), 84-85.
- [69] Verma, A.; Uzun, O.; Hu, Y.; Hu, Y.; Han, H.-S.; Watson, N.; Chen, S.; Irvine, D. J.; Stellacci, F., Surface-structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles. *Nat Mater* **2008**, *7* (7), 588-595.
- [70] Van Lehn, R. C.; Alexander-Katz, A., Pathway for insertion of amphiphilic nanoparticles into defect-free lipid bilayers from atomistic molecular dynamics simulations. *Soft Matter* **2015**, *11* (16), 3165-3175.
- [71] Van Lehn, R. C.; Alexander-Katz, A., Membrane-Embedded Nanoparticles Induce Lipid Rearrangements Similar to Those Exhibited by Biological Membrane Proteins. *J.Phys.Chem.B* **2014**, *118* (44), 12586-12598.

Capítulo 7

Conclusiones Generales

En el presente trabajo de Tesis se estudió la interacción de nanopartículas de plata (AgNPs) recubiertas con citrato trisódico (CIT-AgNPs) y con ácido 4-mercaptobenzoico (MBA-AgNPs) con sistemas modelo de biomembrana constituidos por monocapas de Langmuir o bicapas soportadas del lípido dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC).

En primer lugar se estudió la adsorción del ácido 4-mercaptobenzoico (MBA) sobre superficies de Ag (111) UPD debido a que esta orientación cristalina es predominante en las facetas constituyentes de las MBA-AgNPs. Para esto, se realizaron experimentos con SAMs de tioles aromáticos y alcanotioles sobre superficies lisas de Ag-UPD y sobre sustratos de Ag policristalina. Los resultados experimentales mostraron que el MBA se adsorbe como tiolato sobre la superficie, sin formación de sulfuro de plata. Cálculos de DFT de la adsorción de MBA, indican que esta molécula forma una estructura superficial diluida y estable sobre las caras de la Ag (111) con una fracción de cubrimiento superficial de 0.25, que es menor que el encontrado para los alcanotioles de cadena metálica sobre la misma superficie. Adicionalmente estos cálculos sugieren un mayor cubrimiento del tiol en superficies sin

reconstruir después de su adsorción sobre las caras de Ag (100), siendo esta superficie una de las caras monocristalinas expuestas en las AgNPs empleadas si bien su contribución es minoritaria frente a las caras del tipo (111).

Las CIT–AgNPs y las MBA–AgNPs, fueron caracterizadas no sólo para conocer su tamaño y presencia de recubrimiento por citrato o MBA, sino que se indagó respecto a la densidad de cubrimiento, de cargas superficiales, disposición de las moléculas de citrato o MBA a fin de interpretar el tipo de interacciones y comportamiento que puedan presentar cuando participen en interacciones con sistemas modelo de biomembranas.

Las imágenes HRTEM permitieron conocer que ambas AgNPs presentan naturaleza cristalina con una microestructura facetada, donde se exponen predominantemente caras de tipo (111). Además, el análisis de los datos XPS para las MBA–AgNPs indicó que su capa protectora se compone no sólo por moléculas de MBA sino de citrato, mostrando que el tiol no reemplaza completamente al citrato en la superficie sino que coexiste con él. La relación molecular $MBA/CIT \cong 6$. La mayor densidad de aniones carboxilato de las MBA–AgNPs respecto de las CIT–AgNPs es un punto importante para comprender sus interacciones electrostáticas con las cabezas polares de los fosfolípidos.

En cuanto al envejecimiento de las MBA–AgNPs, se observó una pequeña degradación de la capa protectora de MBA, que conduce a la transformación del tiolato al correspondiente disulfuro. Este proceso conduce a la sinterización de las AgNPs incluso para una mínima degradación del tiolato.

Se optimizaron las condiciones para la fusión de vesículas de DMPC sobre mica para obtener bicapas soportadas que permitieran el estudio de las interacciones de las AgNPs en medio líquido. La caracterización morfológica de estas bicapas revela que poseen un espesor típico de 5 nm tal como lo esperado para el fosfolípido utilizado. El análisis de curvas de fuerza mostró la típica "huella digital" que corresponde a la fuerza de ruptura de la bicapa en un valor de 6.5 nN característico de la respuesta mecánica y la estabilidad de

las bicapas. Las imágenes topográficas de AFM de los dos tipos de AgNPs interactuando sobre bicapas de DMPC soportadas sobre mica, indicaron que existe poca densidad de AgNPs respecto del área cubierta por el fosfolípido. Las regiones donde se observó la presencia de las AgNPs correspondieron a bordes entre la bicapa y la mica, y en discontinuidades en las regiones planas de DMPC revelando el rol de los defectos que facilitan la adsorción/inserción de las NPs.

El otro sistema modelo de biomembrana empleado en esta tesis estuvo constituido por monocapas de Langmuir de DMPC. A bajas presiones laterales (5 mN/m) ambos tipos de AgNPs se adsorben más eficientemente en la interfase de las monocapas de DMPC soportadas en balanza de Langmuir expandiendo el área superficial del fosfolípido en la misma magnitud. Esta interacción se debería a las fuerzas electrostáticas entre las cargas negativas de los grupos carboxílicos de las MBA–AgNPs y CIT–AgNPs a pH fisiológico con los grupos amonio del DMPC.

La compresión de las monocapas de DMPC en presencia de las CIT–AgNPs provoca su exclusión de la interfase, mientras que en el caso de las MBA–AgNPs esto no ocurre lo cual es revelado por las isothermas. En las MBA–AgNPs, la sinergia de las fuerzas de largo alcance (hidrofóbicas debidas al grupo aromático) y de corto alcance (electrostáticas), contribuyen a estabilizar su permanencia en la interfase y son las responsables de la diferencia en las isothermas de compresión de ambas NPs.

La topografía de las monocapas de DMPC obtenida a través de las imágenes por microscopía de ángulo de Brewster (BAM) a distintas presiones laterales de DMPC, no mostraron penetración de AgNPs ni cambios en la reflectividad del fosfolípido, lo que señala que la interacción se limita a la interfase AgNPs/DMPC. Por otro lado, experimentos realizados utilizando soluciones de MBA o de citrato, en lugar de la solución de AgNPs para entender su comportamiento con el DMPC, confirmaron que el ensamble de estas moléculas sobre las AgNPs es necesario para deformar la monocapa del

fosfolípido, ya que por sí solas, no generan expansión de la monocapa del fosfolípido.

Finalmente, se propone que la permanencia de las MBA–AgNPs en todo el rango de las presiones superficiales en monocapas de DMPC, podría interpretarse en base a sus altas interacciones electrostáticas con la fracción positiva de amonio del final polar del DMPC y a las interacciones hidrofóbicas mediadas por los grupos aromáticos con las protuberancias de la cola del lípido de los fosfolípidos o a los defectos de la monocapa del lípido, donde la proximidad anillo aromático/cadena hidrocarbonada se favorece.

Los resultados presentados en este trabajo de Tesis Doctoral destacan la importancia de entender, a nivel molecular, las interacciones entre nanomateriales y membranas para evaluar sus potenciales efectos toxicológicos a largo plazo y de esa forma, intentar emplear este tipo de sistemas biomiméticos en el campo de la nanomedicina, en diagnóstico de enfermedades y otras aplicaciones de la nanotecnología.

Apéndice

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de Tesis han sido oportunamente reportados en las siguientes publicaciones:

"Surface Chemistry of 4 - Mercaptobenzoic Acid Self - Assembled on Ag (111) and Ag Nanoparticles". Julie V. Maya Girón, Eugenia Zelaya, Aldo Rubert, Guillermo Benítez, Pilar Carro, Roberto Carlos Salvarezza, María Elena Vela. J. Phys. Chem. C, 2013, 117 (47), pp 24967–24974. DOI: 10.1021/jp409785c.

"Role of the capping agent in the interaction of hydrophilic Ag nanoparticles with DMPC as a model biomembrane". Julie V. Maya Girón, Raquel Vico, Bruno Maggio, Eugenia Zelaya, Aldo Rubert, Guillermo Benítez, Pilar Carro, Roberto Carlos Salvarezza, María Elena Vela. Royal Society of Chemistry. Environmental Science: Nano, 2016, 3, 462–472. DOI: 10.1039/c6en00016a.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer al CONICET por su apoyo económico durante estos 5 años de doctorado, y a la Universidad Nacional de La Plata, por haberme permitido desarrollar mi Doctorado a través de la Facultad de Ciencias Exactas y obtener mi título.

A mi directora, María Elena ya que sin su confianza no hubiera sido posible iniciar mi camino por la Investigación Científica. Además, porque fue un apoyo académico y personal muy importante.

También agradezco al grupo del Laboratorio de Nanoscopías y Físicoquímica de Superficies, a cargo de Roberto Salvarezza, no sólo por haberme recibido si no, por todo el compañerismo y los momentos compartidos a nivel académico, científico y personal. A Roberto por todas sus valiosas enseñanzas y por siempre estar dispuesto a compartir todos sus conocimientos. A Caro V., a Patri, a Fede, a Tati y a Bárbara por su disposición en todo momento. A los chicos que ya no están, Emi, Eva, Conie, Emilia, Mati, Julio, por haber compartido además de sus conocimientos, una linda compañía en las juntadas para celebrar algún cumple o simplemente para pasar un rato agradable. A los chicos de ahora, Anto, Flavia, Doris, Ale R., Ale M., Fiore, Ceci, Mari, Eli, Yamil, Caro D., Diego por hacer parte del día a día en nuestra oficina y laboratorio.

A los chicos del segundo piso, a Mariano, Ángela y Germán, que si bien no compartimos oficina, siempre estuvieron dispuestos a ayudar; en especial, a Guille y Aldo, por las medidas de XPS y todos aquellos conocimientos transmitidos.

A todo el personal humano que hace parte del INIFTA que sin ellos nuestro instituto no sería lo mismo. Especialmente a Barbi, que me brindó su amistad, cariño y apoyo desde siempre. A Alicia, por su cariño. A los chicos del taller y vidriería, que siempre estuvieron dispuestos a ayudar. Al igual que a Dani y a Claudio. También al personal de contaduría, secretaría e informática. Gracias a todos.

A mi codirectora, Raquel. Gracias por todo el trabajo y los conocimientos compartidos, pero en especial, gracias por tu apoyo y cariño durante mis dos estadías en el Instituto de Investigaciones en Físicoquímica de Córdoba (INFIQC-CONICET) y el Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC-CONICET). A Bruno Maggio, que permitió todo mi trabajo en su Laboratorio y por supuesto, por todos sus valiosos conocimientos transmitidos. A todos los que hicieron parte durante ese tiempo vivido en Córdoba y compartieron lindos momentos: Diana Carolina, Jhon, Patricia, Guadalupe, Santi, Cata, Wilber, Virginia, Fabrizio, Cande, Cynthia, Agustín, Laura Fanani, Francesca y a todo el equipo de trabajo de los dos laboratorios en los cuales trabajé y compartí.

A mis Jurados, Verónica Brunetti, Mónica Fernández Lorenzo y Liliana Gassa, por su tiempo para leer y evaluar mi trabajo de Tesis. Muchas Gracias.

A mis "chicas": Mariela, Angelita, Silvina, Juli y a las que ya no están, Yeimi, Mavi y Jackie, gracias por ser mi familia en este país y por todos los lindos momentos vividos y compartidos durante todo este tiempo. A Diego, que desde hace 3 años nos alegra no sólo con sus ocurrencias en nuestra mesa de almuerzo, si no con su deliciosa chocotorta. Y en especial gracias, por ser un gran amigo y brindarme todo su apoyo en el momento justo. A Fiore, Eli y Anahí, que también hacen parte de todos los lindos momentos del almuerzo.

También quiero agradecer especialmente a Pao y a Caro, que en estos últimos meses han sido muy especiales e incondicionales conmigo y porque me han brindado su linda amistad y apoyo, a pesar del poco tiempo compartido. Gracias mis "Chicas BID".

Por otro lado, al grupo de amigos Colombianos, el cual ha ido creciendo durante esta estadía: Ricardo, Efrén, Guille, Juan Pablo, Carlos, Fernando, Caro P., Dafne, Ruth, Joaquín, Andrés, Angélica, Elizabeth, Yacelis, Edeimis, Alejandra y Eduard. Y a los que ya no están, Ángela, Lore, Héctor y Fabio. A Zuly, que desde nuestro pregrado hemos compartido lindos momentos. Gracias. Y por supuesto a los dos miembros más chiquitines, Martín y Nico, por brindarnos su alegría.

También a Jhon, Arles, Azucena, Thiago, Mariela, Sebas, Martín, Fer, y Juan, gracias por los momentos compartidos en este último año, han sido muy especiales.

Además, aprovecho para agradecer a toda mi familia y amigos que a pesar del tiempo y la distancia, siempre estuvieron apoyándome y acompañándome. Especialmente a mis papis, Fabián y Vilma y por supuesto, a mi hermanita, Ana María, por ser mi motor y mi apoyo incondicional en cada instante, todo este esfuerzo y dedicación es para ustedes. LOS AMO!!!!

Y por último, y no menos importante, a Diego. Gracias mi cielo por estos meses de amor, compañerismo, apoyo y sobre todo paciencia, no tendré palabras para expresarte todo mi agradecimiento por todo lo que hiciste y sigues haciendo por mí. TE AMO CON TODO MI CORAZÓN.

