

TESIS DE LA UNIVERSIDAD
DE ZARAGOZA

2023 212

Silvia Ruiz Rincón

Modelos de membranas celulares y su interacción con nanopartículas magnéticas

Director/es

Martínez De La Fuente, Jesús
Cea Minguez, Pilar

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

ISSN 2254-7606



Premsas de la Universidad
Universidad Zaragoza



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

MODELOS DE MEMBRANAS CELULARES Y SU
INTERACCIÓN CON NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS

Autor

Silvia Ruiz Rincón

Director/es

Martínez De La Fuente, Jesús
Cea Mingueza, Pilar

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

2021



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

Modelos de membranas celulares y su interacción
con nanopartículas magnéticas

Autora

Silvia Ruiz Rincón

Directores

Pilar Cea Mingueza
Jesús Martínez de la Fuente

Programa de Doctorado de Química Física
Facultad de Ciencias
2021, Zaragoza



Departamento de
Química Física
Universidad Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza



INSTITUTO DE NANOCIENCIA
Y MATERIALES DE ARAGÓN



Bionanosurf



Universidad de Zaragoza
Departamento de Química Física
Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón
Grupo de investigación Platón
Grupo investigación Bionanosurf

PILAR CEA MINGUEZA, Catedrática del departamento de Química Física de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza y JESÚS MARTÍNEZ DE LA FUENTE, Investigador científico titular del ICMA-CSIC del grupo Biofuncionalización de Nanopartículas y Superficies de la Universidad de Zaragoza.

CERTIFICAN:

Que el trabajo presentado como Tesis Doctoral en esta memoria, para aspirar al grado de Doctora en Química, con el título “Modelo de membranas celulares y su interacción con nanopartículas magnéticas” que presenta Dña Silvia Ruiz Rincón, ha sido realizada en la Universidad de Zaragoza, bajo la dirección de ambos, autorizando la presentación de la misma para su calificación por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expiden el presente documento en Zaragoza, a 15 de mayo de 2021

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

La tesis es un largo camino en donde los apoyos son muy importantes, considero que sin todas estas personas que van a aparecer a continuación esta tesis no habría sido posible.

En primer lugar, me honra haber tenido y les doy mi más profundo y respetuoso agradecimiento a los directores de esta Tesis Doctoral, a la Dra. Pilar Cea, y al Dr. Jesús Martínez de la Fuente por todo el esfuerzo y dedicación que han mostrado hacia mí y a este trabajo, por el aprendizaje llevado a cabo durante estos años y por confiar en mí.

Jesús, quiero agradecerte toda tu ayuda, tus consejos y encontrar siempre la solución a cualquier problema que se plantea, sea cual sea. Pilar, muchas gracias por estar siempre apoyándome y darme la oportunidad de empezar contigo mi Trabajo Fin de Máster, por ayudarme a cualquier hora del día, eres todo un ejemplo a seguir. Muchas gracias.

Agradecer a todos los investigadores que han pasado por el grupo PLATON:

Los que estuvieron y ya se fueron Henry, Marta F., Víctor Antón, Javier Benito entre muchos otros. En especial a Beni por sus “Benitadas” y por la compañía en el INA en los comienzos de mi tesis.

Alejandro, quiero expresar mi gratitud por todo tu esfuerzo y tu trabajo, tú me enseñaste a medir en el AFM, el equipo que me ha dado tantas alegrías y penas. Así que gran parte de esta tesis también te lo debo a ti. Gracias por haberte cruzado en mi camino.

Stefano Chiodini, darte las gracias por todo tu trabajo y el esfuerzo. Me alegro de haberte enseñado a perfeccionar tu español. Gracias por todos los cafés a mitad mañana, que nos daban toda la energía para seguir trabajando y por los quesos y los patés del bar Estudios.

También agradecer a los que siguen al pie del cañón, Ainhoa, Nacho, Santi, Lucía, Miguel, Aitor, Inés, Enrique, Fernando, Carlos, Héctor, Marta H. y a todos los demás. Sin

vosotros esto habría sido imposible. Gracias por todos los momentos, las pausas para el café, mis largos caminos del INA (Ahora INMA) a ciencias por un mini de mates.

Hago extensivo este agradecimiento a todos los TFG y TFM que han pasado por el grupo, Julio, Rosa, Paula...y en especial a Teresa que tantos y grandes ratos hemos pasado en el AFM.

A las nuevas incorporaciones, Laura, mucho ánimo, me alegro de haber coincidido contigo en esta aventura.

A mis colombianas favoritas, Laura y Paula, ha sido un placer haber coincidido con vosotras en esta etapa.

También agradecer a Anabel y al resto de personal de Química Física porque habéis formado parte también de esta tesis.

Todos los investigadores que han pasado por el grupo BIONANOSURF:

Mi más sincero agradecimiento a los compañeros que ya no están en el grupo, pero con los que comencé esta aventura, Inés, con sus fríos, Álvaro, con sus calores Lou, Eva, Marcos... y muchos otros.

Empezaré por los magnéticos, Ralu, vecina, por llevarte el patín de oro al barrio. Vito, ¿y las nanos pa´cuándo? Muchas gracias por todo tu apoyo, cuánto mal te he dado. Edu, Juan Lilianne muchas gracias por toda vuestra ayuda, por todas las cervezas con y sin gluten.

Sonia y Alba, muchas gracias por todas las quedadas y los momentos de risas...nos desestresaban y nos daban nuevas energías para continuar. Siempre podréis venir a Gym Cuéllar 55. Regina, ¿en serio eres mi vecina? No te tengo vista yo por el barrio...jaja pero sí sí, lo he verificado.

Gabi, Héctor, Maria sin acento, Yilian, Zsuzsa, Andrés, Bea T. Bea M. Elena, Francesca, Ilaria, Isa, Rafi ¡MIL GRACIAS CHICOS! Por todas las conversaciones, por todas las colaboraciones por las salidas fugaces a correr, por los días de gimnasio para recargar pilas.

Carlos, Laura, Lucía, Maria M. Rafa M., Scott, Valeria, Vanessa muchas gracias por estar ahí, por todas las conversaciones y por echarme una mano siempre que lo he necesitado.

Las nuevas incorporaciones, Pilar, Natalia, me alegro haber coincidido con vosotras al final de esta etapa.

Carmen G. y a todos los de administración Juan, M^a Jesús, Raúl, sois un pilar imprescindible, mi más sincero agradecimiento por toda vuestra ayuda.

También agradecer a Carmen, por estar en el INMA desde primera hora por la mañana con una sonrisa alegrándome las mañanas.

A todo el personal del LMA, JL, Gala, Rubén, Laura, Isa, Teo, muchas gracias por estar siempre dispuestos a ayudar.

Por último, quiero agradecer a mi familia y a mis amigos el apoyo que me han dado durante estos años de tesis.

A mis amigas de toda la vida, Almu, Bea, Cris, María, Paloma, Viole. Gracias por estar.

A mi amiga Isabel, aunque nos veamos de ciento al viento siempre estás ahí apoyándome y sé que puedo contar contigo en cualquier momento. Mil gracias.

A Rebeca, Alex (junto a mis compis del máster Nanomat), un placer haber coincidido con todos vosotros.

A mis Naranjitas, por todas las carreras, los buenos ratos y los que nos quedan.

Agradecer a mis abuelos, a mis tíos, mis primos por estar ahí. En especial, esta tesis también se la quiero agradecer a mi tío José y mi tía Mento, sé que os habríais alegrado muchísimo por este logro.

A Diego y Juan, mis sobrinos preciosos cuyos abrazos me alegran y me dan energía para todo el día. También agradecer a Álvaro sus buenos consejos.

Dar las gracias a María, Alberto y Javi, ya que me habéis acogido como una más en vuestra familia. Muchas gracias.

Por último, expresar mi sentimiento de gratitud a mi pilar fundamental: A mis padres y mi hermana que siempre han confiado en mí y me han apoyado. MUCHAS GRACIAS. Esta tesis también es vuestra, sé que no habría sido posible sin vuestra ayuda y sin el apoyo incondicional que me habéis dado. Gracias por haber estado a mi lado animándome y guiándome. Por escucharme, apoyarme y darme muy buenos consejos. Y porque en todos los momentos difíciles que nos ha puesto la vida, los hemos ido superando juntos. Os quiero mucho.

A Alberto, has sido quién me respaldado todos estos años y quién ha tenido que aguantar el día a día de mis agobios. Muchísimas gracias de verdad por el apoyo que me has dado, sobretodo en esta última etapa tan difícil que he pasado. Gracias por el ánimo que me has dado para terminar la tesis y por la confianza que has puesto en mí.

Os quiero mucho a todos

¡Muchas gracias!

La senda para que los sueños tengan éxito existe. Ten la visión para encontrarla, el valor para alcanzarla y la perseverancia para seguirla.

Kalpana Chawla

*Pregúntate si lo que estás haciendo hoy te acerca al lugar en el que quieres estar
mañana. Walt Disney*

Introducción

En las últimas décadas se ha producido una auténtica revolución centrada en la nanociencia y las propiedades de los materiales en la escala del nanómetro debido a una amplia variedad de aplicaciones de éstos en diferentes campos de estudio que van desde la física, la ingeniería o la ciencia de los materiales, hasta la medicina, la biología o la química. Como regla general se considera que cuando al menos una de las tres dimensiones en el espacio de un material se encuentra por debajo de los 100 nm hablamos de nanomateriales. Los nanomateriales tienen unas características físicas y químicas que son diferentes al mismo material en escalas más grandes, lo que tiene su origen en la gran relación área/volumen que se da en la nanoescala y en la aparición de los fenómenos cuánticos que rigen su comportamiento.

Mi interés por el campo de la nanociencia y de los materiales me llevó a realizar un máster en la Universidad de Zaragoza sobre este campo, el *Master in Nanostructured Materials for Nanotechnology Applications* donde tuve la oportunidad de trabajar en la simulación de membranas biológicas en el laboratorio a través de un trabajo fin de máster (TFM) multidisciplinar que fue co-dirigido desde dos áreas de conocimiento distintas por los que también han sido los directores de esta tesis doctoral. El interés que despertó en mí esta temática junto a una clara vocación científica me llevaron a plantearme completar aquellos estudios que inicié a través del TFM. Tras cuatro años de trabajo aquí presento mi tesis doctoral. La tesis me ha llevado por una andadura paralela al desarrollo del proyecto europeo MagicCellGene (*Localized MAGnetIC hyperthermia CELL-Based*

*GENE therapy for immune modulation*¹) en el que se enmarcan los distintos capítulos de la tesis, cada uno de los cuales tiene integridad temática propia y por ello la introducción y contextualización científica de cada uno de ellos se presenta al comienzo de cada capítulo. Esta memoria se ha estructurado en siete capítulos más anexos.

Capítulo 1. Se exponen los materiales y métodos utilizados durante la realización de esta memoria.

Capítulo 2. Preparación y caracterización de membranas celulares simuladas.

Capítulo 3. Estudio termodinámico y microscópico de mezclas binarias y ternarias del Dipalmitoilfofostatidilcolina y Colesterol con Glicoesfingolípidos.

Capítulo 4. Efecto de la aplicación de campos magnéticos locales sobre nanopartículas magnéticas depositadas sobre sistemas modelo de membranas celulares

Capítulo 5. Reconocimiento de la Concanavalina A en glicoesfingolípidos incorporados en modelos de membrana celulares e interacción de nanopartículas magnéticas con y sin alquino

Capítulo 6. Influencia de la nanorugosidad del sustrato en las propiedades nanomecánicas y nanotribológicas de bicapas lipídicas soportadas. Estos estudios se llevaron a cabo en Paderborn (Alemania).

¹ Publishable abstract: *The goal of MagicCELLGene is to develop a novel, universal and highly efficient methodology for transfection triggered by magnetic hyperthermia, with potential clinical applications in cell-based gene therapy. Our innovative approach is to induce a controlled and localized heating of the cellular membrane (hotspots) using magnetic nanoparticles covalently immobilized onto cell membranes via bioorthogonal chemistry; the reversible changes of the cell membrane permeability/fluidity will be used to promote the artificial delivery of nucleic acids into cells. Efforts will be especially focused on hard-to-transfect cells (primary cells), thus clearly addressing an unmet need of the transfection market. Expected results going beyond the state-of-the-art in transfection are: i) the development of a universal transfection tool and ii) its application to systems where standard transfection methods have several bottlenecks using as a model immune system modulation.*

Capítulo 7. Influencia del sustrato en la determinación del módulo de Young de películas blandas

El bloque de Anexos donde se recogen las abreviaturas y los artículos publicados durante esta tesis doctoral.

Objetivos

Para esta Tesis Doctoral, de carácter multidisciplinar, nos marcamos los siguientes objetivos científicos generales (en cada capítulo se irán marcando objetivos específicos):

- Fabricación de membranas celulares simuladas de fosfolípidos y colesterol buscando las condiciones para la obtención de películas superficiales muy homogéneas que permitan fácilmente analizar fenómenos superficiales inducidos por la presencia de otros elementos.
- Incorporación de un glicoesfingolípido conteniendo un grupo azida a la membrana celular simulada. El grupo azida permitiría en su caso la realización de química bioortogonal (reacción con un grupo alquino terminal) para la deposición específica de nanopartículas magnéticas convenientemente funcionalizadas.
- Analizar cómo un campo magnético alterno puede alterar la membrana celular cuando se han incorporado nanopartículas magnéticas en su superficie. En concreto la hipótesis de trabajo es que el campo magnético alterno pueda inducir un calentamiento local de la membrana generando poros en la misma.
- Realizar química bioortogonal en las membranas simuladas mediante la incorporación de las nanopartículas magnéticas funcionalizadas con un grupo terminal alquino que interaccionará con grupos azida introducidos en la membrana celular.
- Estudiar el efecto de la rugosidad del sustrato en las membranas celulares simuladas mediante un estudio topográfico de microscopia de fuerza atómica y un estudio nanomecánico mediante curvas de fuerzas.
- Determinar la influencia de la rigidez de un sustrato en la determinación del módulo de Young de una película blanda, como es el caso de la membrana celular, depositada sobre un sustrato.

Además de estos objetivos de naturaleza investigadora el objetivo de cualquier tesis doctoral es profundizar en la formación del doctorando, no sólo consolidando las competencias adquiridas en grado y postgrado sino avanzar hacia nuevas competencias propias de un doctor que incluyen el trabajo en equipo, en mi caso multidisciplinar y con colaboraciones internacionales, autonomía en el laboratorio tanto en el manejo de distintos tipos de técnicas de fabricación (Langmuir-Blodgett y autoensamblaje) y de caracterización (microscopia de fuerza atómica, AFM, y espectroscopia infrarroja) como, sobre todo en las etapas finales, ser capaz de programar mis propios experimentos, analizar resultados, validar o descartar hipótesis, interpretar los datos obtenidos, etc. Fundamental es también contar con competencias sólidas en la comunicación científica, tanto oral (en gran medida conseguidas a través la divulgación y discusión de los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis doctoral mediante asistencia a congresos, conferencias y seminarios), así como escritas (redacción de artículos, informes y de la propia memoria de tesis doctoral).

ÍNDICE

Introducción

Objetivos

Capítulo 1: Técnicas y equipos

1. Materiales, reactivos y sustratos.....	2
2. Técnicas y equipos.....	5
2.1. Para la fabricación de las películas de Langmuir	10
2.2. Para la caracterización de las películas de Langmuir.....	17
2.3. Equipos utilizados en Paderborn (Alemania).....	23
2.4. Código Python de la nanomecánica.....	25
3. Bibliografía.....	27

Capítulo 2: Preparación y caracterización de membranas celulares simuladas

1. Introducción. La importancia de los modelos de membrana celulares	31
2. Caracterización de las películas de Langmuir y Langmuir-Blodgett.....	33
3. Caracterización de la monocapa de DPPC:COL 1:1.....	37
3.1. Caracterización mediante AFM y ángulo de contacto de la monocapa de DPPC:Colesterol 1:1	37
3.2. Caracterización por ATR de la monocapa DPPC:Colesterol 1:1.....	40
4. Estudio de estabilidad de la monocapa de DPPC:COL 1:1 en un medio líquido.....	41
4.1 Análisis del recubrimiento de los dominios de DPPC y COL en las películas DPPC:COL 1:1 LB.....	46
4.2 Estudios de adhesión en películas DPPC:COL 1:1 LB mediante AFM.....	50
4.3 Estudio de reversibilidad de la monocapa DPPC:Colesterol 1:1 después del secado.....	52
4.4 Propiedades nanomecánicas de las películas de DPPC:COL 1:1.....	52
mediante estudios de curvas de Fuerza.....	55
5. Conclusiones.....	60
6. Bibliografía	61

Capítulo 3: Estudio termodinámico y microscópico (AFM) de mezclas binarias y ternarias del DPPC y Colesterol con Glicosfingolípidos.

1. Introducción.....	68
2. Resultados y discusión.....	72
2.1 Caracterización topográfica de las mezclas binarias y ternarias mediante AFM.....	81
3. Conclusiones.....	88
4. Referencias.....	90

Capítulo 4: Efecto de la aplicación de campos magnéticos locales sobre nanopartículas magnéticas depositadas sobre sistemas modelo de membranas celulares

1. Introducción.....	95
1.1 Uso de las MNPs en biotecnología.....	95
1.2 Hipertermia magnética.....	99
2. Resultados y discusión.....	104
2.1 MNPs síntesis y caracterización (TEM, Magnetismo y SAR).....	104
2.2 Preparación de las monocapas LB.....	106
2.3 Monocapas + MNPs.....	108
2.3.1 Caracterización mediante AFM.....	110
3. Aplicación de campo magnético alterno: estudio del incremento de temperatura localizado en las membranas.....	111
3.1 Aplicación de un campo magnético: Estudio post-campo.....	115
4. Conclusiones.....	121
5. Bibliografía.....	122

Capítulo 5: Reconocimiento de la Concanavalina A en glicosfingolípidos incorporados en modelos de membrana celulares e interacción de nanopartículas magnéticas con y sin alquino

1. Introducción.....	128
2. Resultados y discusión.....	134
2.1 Caracterización los diferentes glicosfingolípidos (GSL) por microscopía de ángulo de Brewster (BAM), ATR y RAMAN.....	134

2.2 Estudio interacción GSL-Concanavalina A (ConA) y GSL-PPB (Fosfina-PEG-Biotina).....	139
2.3 Incorporación de las MNPs en las películas DPPC:COL + GSL3 con y sin alquino.....	147
3. Conclusiones.....	151
4. Bibliografía.....	151

Capítulo 6: Influencia de la nanorugosidad del sustrato en las propiedades nanomecánicas y nanotribológicas de bicapas lipídicas soportadas

1. Introducción. Importancia de la curvatura	157
1.1 La microscopia de fuerza atómica (AFM). Propiedades nanomecánicas y nanotribológicas.....	160
2. Resultados y discusión	160
2.1. Caracterización fisicoquímica de películas de DPPC:COL 1:1 sobre sustratos de Si.....	163
2.2. Evolución de la monocapa DPPC:COL 1:1 cuando se expone a un medio líquido	170
2.3. Propiedades nanomecánicas	177
3. Conclusiones.....	181
4. Bibliografía.....	182

Capítulo 7: Influencia del sustrato en la determinación del módulo de Young de películas blandas.

1. Introducción.Mecanobiología.....	188
1.1 La microscopia de fuerza atómica (AFM) y el módulo de Young.....	189
2. Resultados y discusión.....	195
3. Conclusiones.....	210
4. Bilbiografía.....	212

ANEXOS

1. Abreviaturas.....	221
2. Publicaciones científicas.....	223

Capítulo 1.

Materiales y métodos

1. Materiales, reactivos y sustratos

Materiales

En esta tesis doctoral se han utilizado disoluciones Dimetilfosfatidilcolina (DPPC), Colesterol (COL), Glicosfingolípido (GSL); GSL1 ($C_{48}H_{93}NO_8$), GSL2 ($C_{48}H_{91}NO_8$), GSL3 ($C_{48}H_{92}N_4O_7$) y GSL4 ($C_{48}H_{90}N_4O_7$) para la fabricación de los modelos de membranas celulares. Se estableció 10^{-4} M como concentración de las disoluciones ya que se hicieron estudios previos a diferentes concentraciones. Los compuestos inicialmente se encuentran en estado sólido y se mantienen refrigerados, por lo tanto, es necesario atemperarlos antes de preparar la disolución para evitar que la temperatura provoque un cambio de concentración. Se pesa en una balanza la cantidad de compuesto requerida para obtener disoluciones de 100 mL para el DPPC y para el Chol, y 25 mL para los GSL, todos ellos a concentración de concentración 10^{-4} M.

Como disolvente de las soluciones se emplea cloroformo, un disolvente orgánico que no se mezcla con el agua y que al ser volátil permite que se evapore rápidamente de la superficie sobre la que se trabaja. Para limpieza de la cuba se emplea acetona y como subfase de la cuba, agua Milli-Q.

Concanavalina A (ConA), concentración 50 μ g/mL se disolvió en tampón fosfato sódico pH 7,4 mM, conteniendo cloruro sódico 10 mM, cloruro magnésico 10 mM y cloruro cálcico 1 mM (tampón de unión). Hay que añadir el magnesio lo último, gota a gota. En este caso hizo falta filtrar la disolución obtenida con un filtro de PVDF de 0,22 micras de millipore.

Fosfina-PEG-Biotina, es de la casa comercial Thermo Fisher y se utilizó un eppendorf ya preparado de concentración 10 mM

Síntesis de las MNPs (hecha por el grupo Bionanosurf)

Para realizar la síntesis de las MNPs se utilizó el método de descomposición térmica a alta temperatura ya que se obtienen MNPs monodispersas. La síntesis fue llevada a cabo por el grupo Bionanosurf.¹ Para ello hay que añadir 0,71 g de Fe (acac)₃, que actúa como precursor metálico 2,58 g de 1,2-hexadecanodiol, 2 mL de ácido oleico, 2 mL de oleilamina y 20 mL de difenil éter (Teb = 260 ° C) en un matraz de tres bocas. El matraz se calienta a 200 ° C bajo flujo de argón agitándose continuamente. Se mantienen los 200 durante 30 minutos, se observa un cambio de color de naranja a negro, eso es indicativo de que se está formando la NP. Posteriormente, se elevó la temperatura a 260 ° C, ya que es el punto de ebullición del disolvente difenil éter, y se calentó a reflujo a esta temperatura durante 2 horas. Se deja enfriar la muestra a temperatura ambiente.

Después se realiza un lavado de las MNPs con etanol, la mezcla se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos, dejando las partículas precipitadas en el fondo del tubo de ensayo. Se retiró el sobrenadante por decantación. Este proceso se repitió resuspendiendo las MNP en hexano y lavando con etanol hasta que el sobrenadante ya no tiene color. La mezcla de MNP, ácido oleico y oleilamina se resuspendió en hexano y se almacenó en el frigorífico.

Si se quieren obtener MNPs de tamaño mayor, estas MNPs de 6 nm de diámetro se utilizan como semillas para su recrecimiento.

Síntesis del glicosfingolípido, realizado por el grupo de Daniel B.Werz

La estructura del glucoesfingolípido sintético (GSL) utilizado en esta tesis doctoral está formado por un monosacárido, cuya molécula es una β-D glucosa que es una D-glucopiranososa con configuración β en el centro anomérico. Se ha llevado a cabo por el grupo de Daniel B.Werz. Para más información sobre la síntesis de los glicosfingolípidos consultar esta referencia.²

Reactivos y disolventes

Todos los reactivos y disolventes utilizados se han adquirido en, Sigma-Aldrich®, a excepción de los GSL, que han sido sintetizados en el laboratorio de Daniel B.Werz y las MNPs por el grupo Bionanosurf.

Sustratos

Mica

Los sustratos utilizados para la transferencia de las membranas celulares simuladas han sido láminas de mica de la casa comercial *Ted Pella, Inc.*, de calidad V1, con un espesor de 0,15-0,177 mm. Estas láminas se cortan en las dimensiones deseadas, de manera general en esta tesis se utilizaron dimensiones de 1 cm x 1cm, ya que son las medidas adecuadas tanto para las medidas de AFM, hipertermia y el proceso de marcado de la mica. Además, como método de limpieza previa del sustrato se realiza un proceso de exfoliación de la mica con celo.



Figura 1. Sustrato de mica

Silicio y Silicio nanorugoso

Estos sustratos fueron proporcionados por Adrian Keller del grupo de Nanobiomateriales de la Universidad de Paderborn (Alemania). Los sustratos de silicio nanorugoso fueron preparados por bombardeo de iones de baja energía mostrando una

longitud de onda de 24 nm y obteniéndose una diferencia de altura en la ondulación de 2 nm. Para más información consultar esta referencia.³

QCM

Para los experimentos de QCM se tienen que utilizar unos sustratos determinados de la casa comercial *Standford Research Systems*. Son discos finos de α -cuarzo con electrodos de oro circulares en ambas caras. Con una frecuencia de resonancia de 5 MHz y su área efectiva de 0,8 cm²



Figura 2. Sustrato de QCM

2. Técnicas y equipos

2.1 Para la fabricación de las películas de Langmuir.

Langmuir-Blodgett (LB)

La técnica de Langmuir-Blodgett (LB) es un método de nanofabricación de abajo a arriba que permite la preparación de películas ultradelgadas con un alto grado de control a nivel molecular. Además, se pueden fabricar monocapas de una gran variedad de materiales y sustratos, debido a que se puede tener quimisorción o fisorción. A través de esta técnica podemos controlar el número de capas que tenemos.⁴⁻⁶

Todas las monocapas de Langmuir y de Langmuir-Blodgett, a excepción del BAM se han llevado con la KSV NIMA, el equipo y sus componentes se puede ver en la Figura

3. La cuba contiene un recipiente de teflón de dimensiones de 580 x 145 mm² con profundidad de 4 mm, excepto la zona del pocillo de transferencia que tiene una mayor profundidad (ver Figura 3.b) y está situada en la parte central del recipiente de teflón, además posee dos barreras de compresión de teflón y un brazo de transferencia (Figura 3b). La presión superficial es medida mediante una balanza de Wilhelmy; papel de filtro comercial y ya cortado de 10,3 mm de ancho. (Figura 3c). A medida que se comprime la monocapa se pueden ir dando diferentes fases: gas(G), liquido expandido (LE), liquido condensado (LC), sólido (S) en donde la monocapa está ordenada, y finalmente el colapso, tal y como se muestra en la figura 3.d. Hay que destacar que cada molécula o sistema muestra una isoterma π -A característica y en esta Figura se ha mostrado una general donde presenta todas las fases.

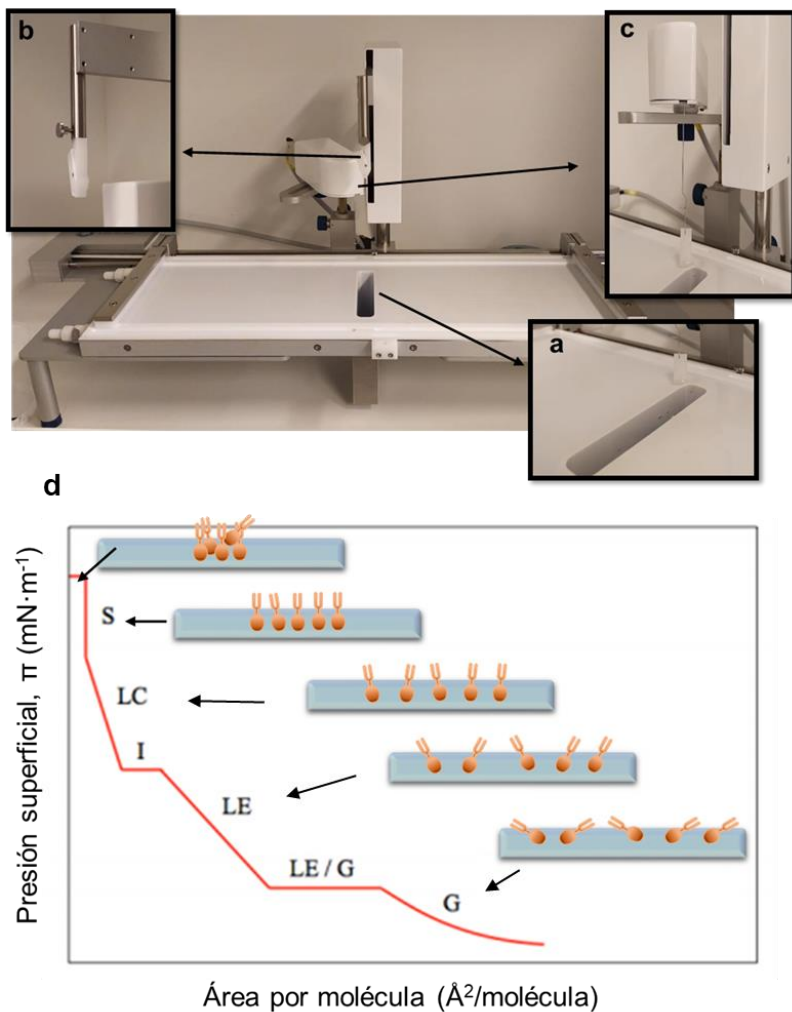


Figura 3. Cuba KSV NIMA con a) Pozo de transferencia; b) Brazo de transferencia que contiene una pinza que sujeta el sustrato sólido. c) Balanza de Wilhelmy para la medida de la presión superficial en la interfase aire-agua; d) Fases de formación de la monocapa en la interfase aire-agua en un gráfico de presión superficial versus área por molécula.

Este tipo de cuba se encuentra dentro de una cabina especialmente diseñada para evitar la contaminación por partículas de polvo en el ambiente y está apoyada sobre una mesa que amortigua las vibraciones. El procedimiento para la preparación de películas de Langmuir-Blodgett se divide en dos partes. Primero, se ensambla una monocapa del material que se desea estudiar sobre una superficie acuosa o subfase mediante el uso de una barrera móvil. La monocapa formada se le conoce como película de Langmuir. El segundo paso sería transferir sobre un sustrato mediante la inmersión o emersión del mismo en la subfase acuosa para formar la película de Langmuir-Blodgett (LB). Dependiendo de cómo se realiza esta transferencia, bien vertical (LB) Figura 4. a y b o si se realiza colocando el sustrato en horizontal y la película de Langmuir se transfiere a la por contacto directo con el sustrato (LS)^{7,8} Figura 4 c y d.

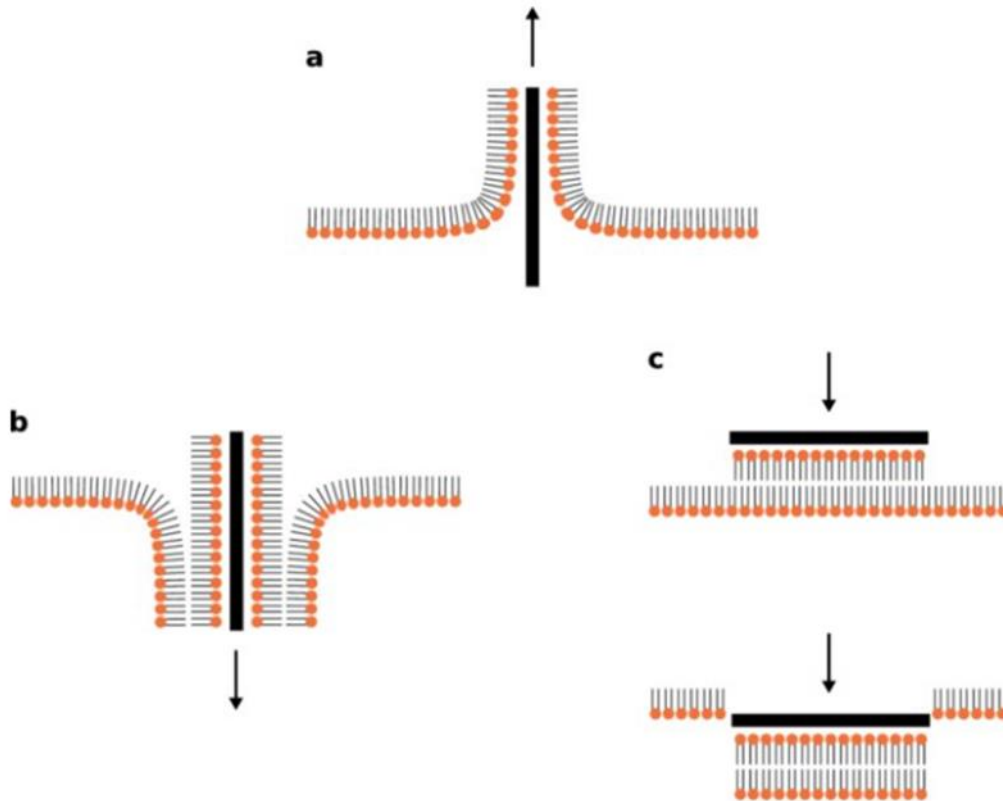


Figura 4. Esquema de las diferentes transferencias al sustrato a) Transferencia vertical (LB) de emersión de la subfase; b) Transferencia vertical (LB) de inmersión a la subfase; c) Transferencia horizontal (LS), dependiendo de la naturaleza del sustrato se pegará al sustrato la parte hidrofóbica o hidrofílica. Imagen adaptada de “Interacting with biological membranes using organic electronic devices”

Método de limpieza en todas las cubas

Para la elaboración de monocapas de Langmuir y películas Langmuir-Blodgett es necesario limpiar previamente la cuba. En este caso se requiere el uso de guantes para minimizar la contaminación debida a la grasa de la piel. La limpieza se debe efectuar por el área del teflón y las barreras. El primer proceso de limpieza es impregnando un papel con acetona ya que esta tiene la capacidad de retirar pequeñas cantidades de agua que hayan quedado en el teflón, se deja reposar 15 minutos para que se evapore la acetona completamente. Posteriormente se limpia con papel impregnado con cloroformo, este al

ser miscible con la acetona permite retirar los restos de esta y al ser un disolvente orgánico apolar proporciona un carácter más hidrófobo al teflón. Se deja evaporar durante 15 minutos. A continuación, se realizan tres lavados con agua Milli-Q, llenando la cuba hasta la altura de los bordes y succionando la superficie del agua con una trompa de vacío para eliminar los contaminantes, terminados los lavados se llena nuevamente la cuba y se verifica el nivel del agua, la cual tiene que estar al mismo nivel formando un menisco con las barreras. Este paso es importante llevarlo a cabo de manera correcta, ya que, si el nivel de agua es demasiado bajo, el surfactante podría deslizarse debajo de la barrera y si el nivel es demasiado alto, el surfactante podría derramarse obteniéndose unos datos finales incorrectos. Para corroborar que la limpieza se haya hecho de manera correcta se registra una curva de presión superficial versus área por molécula para el agua (sin dispersar ningún surfactante), si al comprimir las barreras la presión superficial se mantiene por debajo de $1 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ indica que la cuba está limpia, un cambio mayor muestra la presencia de tensioactivos, ya que en el caso del agua Milli-Q, la presión superficial no cambia cuando se comprimen las barreras. La presión superficial es medida mediante una balanza de Wilhelmy; papel de filtro comercial y ya cortado de 10,3 mm de ancho.

Método de trabajo en todas las cubas

Las disoluciones se dispersan gota a gota sobre la subfase de agua con una micro jeringa de Hamilton, este proceso se tiene que llevar a cabo lentamente. Además, se debe tener la precaución de que la presión superficial no suba de un valor aproximado a $1 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ ya que puede afectar la estructura y formación de las moléculas. Para la medición de la presión superficial se hace uso del método de Wilhelmy el cual consiste en sumergir parcialmente en la subfase un papel de filtro, que mide las fuerzas que actúan sobre él (fuerzas descendentes como la gravedad y la tensión superficial y las fuerzas ascendentes como la flotabilidad debido al desplazamiento del agua) con una electrobalanza sensible

(electro balanza de Wilhelmy).⁹ Después de la dispersión, se tiene que esperar 15 minutos para que el disolvente se evapore. El tiempo de 15 minutos es porque en esta tesis doctoral las disoluciones están hechas en cloroformo, pero en el caso en el que se trabajase con un disolvente menos volátil se tendría que dejar más tiempo evaporar el disolvente. Una vez que se ha dejado evaporar se puede comenzar el experimento para ello se determinan en el ordenador los parámetros de velocidad de las barreras, en el caso de todas las isothermas y transferencias la velocidad de compresión de las barreras es de $6 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$ y velocidad de transferencia de $1 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$.

2.2 Para la caracterización de las películas de Langmuir

Microscopio de ángulo de Brewster (BAM)

Las disoluciones se caracterizan en el microscopio de ángulo Brewster (BAM), Para el estudio de la morfología de la monocapa, el laboratorio del grupo de investigación Platón de la Universidad de Zaragoza cuenta con una KSV NIMA a la que se puede incorporar un microscopio de Ángulo Brewster (BAM) para poder visualizar la morfología de la monocapa. El equipo se compone de un láser rojo con una potencia de 50 mW y una longitud de onda de 659 nm. Cuenta con una cámara CCD controlada por un ordenador con una resolución de 640 x 480 píxeles. Este dispositivo cuenta con un ajuste vertical motorizado de alta precisión y una resolución lateral del sistema óptico en el plano de la superficie acuosa de $12 \mu\text{m}$.

Método de trabajo BAM

Para estudiar la interfaz aire-agua y su homogeneidad y se almacenan en matraces aforados cubiertos de con parafilm para minimizar la evaporación del disolvente y se mantienen refrigerados hasta posterior uso. Las isothermas de presión superficial-área

molecular ($\pi - A$) y las transferencias Langmuir Blodgett se realizaron con una cuba de la marca KSV controlada por computadora (KSV Instruments Ltd., Finlandia)

La cuba KSV NIMA con BAM incorporado (Figura 5) tiene un recipiente de teflón de dimensiones 100 x 720 mm², dos barreras de compresión y a diferencia a la cuba anterior no posee brazo para transferencias. En esta cuba además de obtener la isothermas de compresión se pueden determinar isothermas de potencial superficial y obtener espectros de reflexión UV-Vis de la monocapa durante el proceso de compresión. La medida de la presión superficial se realiza también con el método de la balanza de Wilhelmy, utilizando un papel de filtro de dimensiones 10 x 25 mm². La balanza de Wilhelmy se sitúa en el centro de la cuba. Siendo la misma zona donde se registran los espectros de reflexión UV-vis. El software del equipo ha sido proporcionado por la casa comercial KSV NIMA Biolin Scientific y permite registrar simultáneamente isothermas e imágenes de BAM. Cabe destacar que hay un software adicional, que contiene un programa escrito por miembros del grupo Platón en el que se registra los resultados procedentes de la reflexión UV-Vis de forma automatizada.

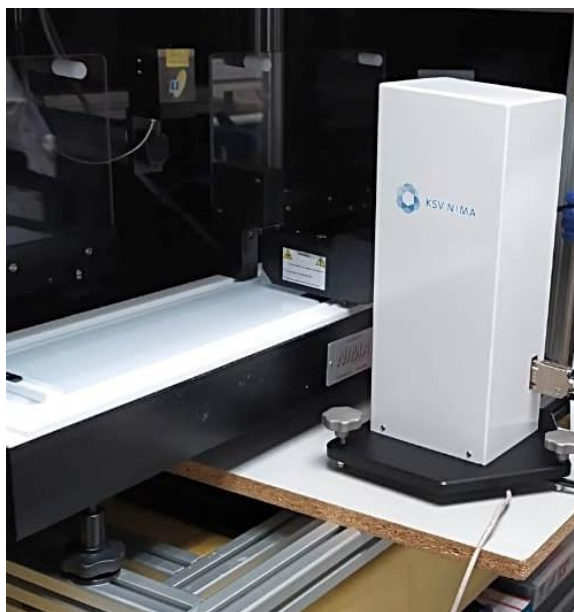


Figura 5. Cuba KSV NIMA con BAM incorporado con Sensor del espectrómetro de reflexión UV—Vis

Método de trabajo estudio termodinámico

Para realizar todos los estudios termodinámicos, se registran isotermas de los compuestos puros para identificar las presiones de colapso del material, además se hacen mezclas binarias de los glicoesfingolípidos con DPPC y Chol en diferentes proporciones ($\chi=0,25$, $\chi =0,5$ y $\chi =0,75$ de DPPC y COL) para examinar las interacciones de cada mezcla. También para estudiar la miscibilidad de los componentes usando la regla de Crips y se establece mediante propiedades como el área de exceso, la energía libre de Gibbs y la energía de Helmholtz.

Fabricación de películas Langmuir-Blodgett

Las mezclas se transfirieren a una presión determinada sobre sustratos de mica hidrófilas recién cortadas de 10 mm x 10 mm x 1 mm previamente exfoliadas con celo para formar así las películas de Langmuir-Blodgett. La deposición de monocapas se DPPC:COL se efectúa elevando verticalmente la placa de mica de la subfase de la cuba de Langmuir una vez se haya alcanzado la presión deseada, $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. En todos los casos la transferencia se realiza a una velocidad constante de $1 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$, a $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Las muestras obtenidas se secan durante 24 horas y posteriormente se guardan en viales hasta su caracterización con microscopia de fuerza atómica. (AFM)

Ángulo de contacto

Los experimentos de ángulo de contacto se realizaron con un tensiómetro óptico comercial (Theta Lite TL 101 de Attention). Para medir el ángulo de contacto, la muestra se tiene que colocar sobre una plataforma plana, justo debajo de una microjeringa Hamilton desde la cual cae una gota de agua Milli-Q sobre la superficie de la película. En ese momento, el software recopila lecturas del ángulo de contacto en diferentes momentos. Este proceso se tiene que repetir varias veces en diferentes lugares de la muestra. Si el ángulo de contacto obtenido es $< 10^\circ$, significa que la superficie es hidrofílica. En cambio, si el ángulo de contacto está próximo a 90° , la superficie de la muestra es hidrofóbica.¹⁰

Microscopio de Fuerzas Atómicas (AFM)

Para la caracterización de las muestras se hace uso de la técnica microscopía de fuerza atómica (AFM), técnica de análisis propuesta en el año 1986 por G. Binnig y C.F.Quate.¹¹ El equipo utilizado para llevar a cabo la caracterización morfológica y nanomecánica de las membranas simuladas sobre sustratos sólidos ha sido un Multimode 8 ambiental de la empresa Veeco-Bruker equipado con una unidad de control Nanoscope V (Bruker), perteneciente al Laboratorio de Microscopías Avanzadas (LMA). Las medidas se han realizado tanto en aire como en medio líquido (agua Milli-Q y buffer HEPES)

La microscopía de fuerza atómica es una microscopia de barrido de sonda, en donde se puede controlar la posición tridimensional de una sonda o punta respecto a la muestra que se quiere caracterizar a través de un sistema de piezoeléctricos.¹²

En el caso del AFM la punta, de un par de micras de largo y menos de 100 \AA de diámetro se coloca en un “cantilever” o palanca, de 100 a 200 micras de largo de la casa comercial Bruker, que dependiendo de la interacción existente entre la punta y la

superficie de la muestra provoca que el cantiléver se doble o flexione. Un láser se dispone sobre la punta; esta luz es reflejada sobre un fotodetector sensible a la posición que proporciona señal de retroalimentación a los escáneres piezoeléctricos que mantienen la punta a una altura o fuerza constante y con ello se obtiene un mapa topográfico. La interacción punta-muestra se basa en la medida de varias fuerzas que contribuyen a la flexión del cantiléver, siendo la más común la fuerza de van der Waals.¹²⁻¹⁵ En la Figura 6, se pueden observar las partes del AFM.

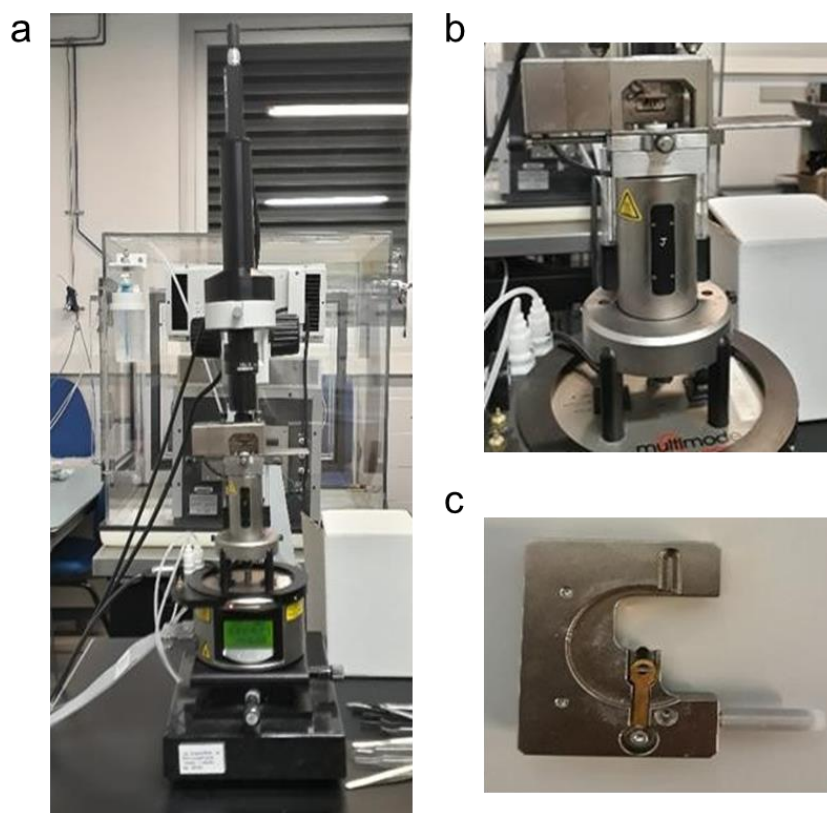


Figura 6. a) Equipo de AFM b) Escáner c) Cantiléver

Por lo tanto, seleccionando de manera correcta la punta a utilizar para cada muestra, es posible obtener mapas de la topografía superficial obteniendo resolución a escala nanométrica, así como también permite caracterizar otras propiedades como la fuerza de interacción entre la muestra y la punta.

Durante este trabajo, las puntas utilizadas son las que se describen a continuación, pertenecientes a la casa comercial Bruker.

ScanAsyst-Air-HR: 130-160 kHz, 0,4-0,6 N·m⁻¹, radio de 2 nm. Material: nitruro de silicio y recubrimiento de aluminio (cantiléver).

ScanAsyst-Fluid+: 100-150 kHz, 0,35-0,7 N·m⁻¹, radio de 2 nm. Material: nitruro de silicio y recubrimiento de aluminio (cantiléver).

RFESPA-150A: 90-210 kHz, 1,5-10 N·m⁻¹, radio de 8 nm. Material: silicio dopado con antimonio y recubrimiento de aluminio (cantiléver).

RTESPA-300: 300-400 kHz, 40-80 N·m⁻¹, radio de 8 nm. Material: silicio dopado con antimonio y recubrimiento de aluminio (cantiléver).

Existen tres modos de trabajo en AFM: el modo de contacto o estático, el modo de no contacto o dinámico y el modo de contacto intermitente o tapping,¹⁵ mostrados en la Figura 7.



Figura 7. Modos de trabajo del AFM.

AFM de contacto

En el modo de contacto, el extremo de la punta está en contacto físico suave con la muestra. 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. La fuerza total que ejerce la punta sobre la muestra es la suma de las fuerzas de capilaridad y del cantiléver, y se debe equilibrar a la fuerza repulsiva de van der Waals. Sobre la muestra

se ejerce una magnitud de fuerza entre 10^{-8} N y $10^{-7} - 10^{-6}$ N.¹² Se puede trabajar en modo de fuerza constante o modo de altura constante. En este modo de contacto se pueden realizar medidas de elasticidad, se pueden utilizar en una amplia gama de muestras duras. Entre los principales inconvenientes que tiene este modo contacto es que al estar la punta en contacto con la superficie puede dañar la punta o modificar la superficie, arrastre de material.

AFM de no- contacto

En este modo no contacto, se excita el cantiléver cerca de su frecuencia de resonancia de la tal manera que vibra cerca de la superficie de la muestra en un rango de 10 a 100 Å. Se ejerce una fuerza muy baja, alrededor de 10-12 N, en este caso se pueden medir distintos gradientes de fuerza (magnética, electrostática) como desventaja es que las resoluciones suelen ser bajas.

AFM de contacto intermitente (Tapping-Mode)

En el caso de esta tesis doctoral, se ha utilizado el modo tapping para las medidas realizadas en aire, ya que es más adecuado para muestras blandas. En este modo la punta está en intermitente contacto con la superficie a la vez que la escanea. Como señal de control utiliza la variación de la amplitud de la oscilación de la punta, debida a la amortiguación sobre la superficie. Con esta técnica se obtienen medidas muy estables con resolución elevada.

Fabricación de las marcas de los sustratos de mica

Para ser capaces de volver al mismo sitio en el AFM antes y después de aplicar AMF, es importante marcar el sustrato.

El marcaje del sustrato consiste en cuatro cuadrados externos de 30 μm de lado, distanciados por 100 μm y cuatro cuadrados internos de 3 μm de lado, distanciados por 30 μm , las marcas tienen 80 nm de altura de los cuales 5 nm son de cromo Cr y 75 nm son de cobre, Cu. Estas marcas en la mica se realizan mediante técnicas físicas de deposición de vapor del metal en cuestión. Las marcas actúan como guía en el proceso de caracterización proceso de marcado de la mica

Las marcas sobre las micas se realizan mediante deposición física de vapor (PVD). La resistencia de tungsteno del Electron Beam Power Supply se calienta cerca a los 1000°C lo que genera extracción y aceleración de electrones del material que se desea depositar. El haz de electrones se redirige por la acción de un campo magnético generado por un par de imanes hacia donde está sujeta la mica a la parte superior con cinta kapton que a su vez mantiene inmobilizadas un par de membranas de Si_3N_4 y Si que previamente han sido perforadas mediante Focused Ion Beam (FIB), Helios nanolab FEI company con el propósito de crear una plantilla con el tamaño de las marcas deseadas. Las marcas se realizan con cromo y cobre, se depositan inicialmente 5 nm de cromo, dada su buena adherencia a la mica este actuará como pegamento del cobre, del cual se depositarán 75 nm de material. Todo el proceso llevado a cabo se puede observar en la Figura 8.

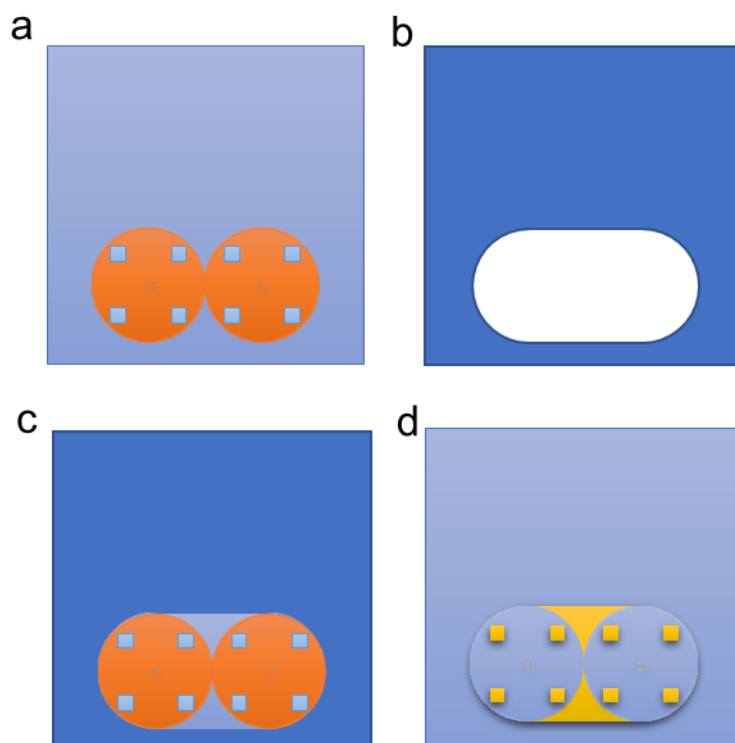


Figura 8. a) membranas ubicadas sobre la mica; b) plástico de protección de la mica; c) mica preparada para PVD; d) Resultado de la mica con las marcas

Incorporación de las nanopartículas magnéticas (MNPs)

MNPs en fase acuosa y funcionalizadas con alquino para la reacción química clic

Sobre las películas LB se busca una deposición específica de nanopartículas magnéticas (MNPs) formadas por magnetita [Fe_3O_4] y maghemita [Fe_2O_3] con diámetro de 12 nm cada una, características hidrofílicas, diseñadas y funcionalizadas con grupo alquino y sin alquino con el propósito de que se produzca una reacción química “clic” biortogonal entre las azidas y alquinos presentes en la membrana celular simulada demostrando así su especificidad.

Las NPs se recubren con polietilenglicol (PEG) y con ciclooctino para disminuir la carga negativa y así conseguir la disminución de los grupos carboxilos [$-\text{COOH}$] libres en la superficie de la NPs.^{16,17}

Método de trabajo de incorporación de las MNPs

La incorporación de las nanopartículas magnéticas (MNPs) en fase orgánica en la monocapa formada se lleva a cabo por el procedimiento de LB. La concentración de partida son 0,04 mg de Fe/mL, se dispersan 1200 μL sobre la subfase de agua milli-Q, hasta que alcanza la presión de $8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, se trasfiere a un sustrato de mica a una velocidad de $1 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$ de abajo a arriba, es decir, el sustrato está previamente en la subfase y una vez que alcanza la presión, emerge de la subfase. Tal y como está indicado en la Figura 9 mostrada a continuación.

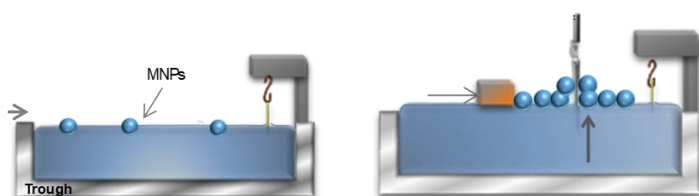


Figura 9. Transferencia de las MNPs sobre el sustrato mediante LB.

La incorporación de las nanopartículas magnéticas (MNPs) en fase acuosa en la monocapa formada se lleva a cabo por el procedimiento de autoensamblaje. La incubación de las MNPs se realiza en un vial al que se le ha hecho una limpieza previa con etanol, agua Milli-Q y secado con nitrógeno. Las MNPs de 0.04 mg de Fe/mL se conservan en la nevera por lo que es necesario dejar atemperar antes de incubarlas. Toda la superficie de la mica queda bien cubierta, se sella el vial para evitar la evaporación y luego se deja incubar el tiempo designado, en este caso 1 hora y 24 horas. Después del periodo de incubación, se retira el material en exceso haciendo 10 lavados con agua Milli-Q y se deja secar a temperatura ambiente.

Posteriormente se realiza un estudio topográfico con el AFM en donde se intentará estudiar que las MNPs funcionalizadas con alquino presentan un anclaje a la membrana formada con el glicosfingolípido que contiene la azida mientras que las MNPs funcionalizadas sin alquino no presentan ningún anclaje, o la incorporación de las MNPs en las membranas será menor.

Aplicación hipertermia magnética

Los experimentos de hipertermia han sido realizados con un equipo DM100 series Applicator for calorimetry (DM1) de nB nanoScale Biomagnetics Company (Figura X), conjunto con el software integrado de nB, MANIAC v1.0, que permite al usuario ejecutar y programar pruebas de calentamiento por inducción, así como monitorear y analizar los resultados de dichas pruebas. Este equipo cuenta con una capacidad máxima de frecuencia de 850 KHz y una intensidad de campo magnético máxima de 350 Gauss, y en rango de temperatura cuenta con funcionamiento normal de 5-40 °C, potencia máxima de 5-30 °C y almacenamiento de -20 - 70°C, maneja una humedad de 20-80% y sus dimensiones 415 x 712 x 285 mm³.

Método de trabajo con el equipo de hipertermia.

Se aplicará un campo magnético alterno (AMF) a las membranas miméticas con MNPs depositadas con el equipo de hipertermia a una frecuencia máxima de 829 Hz y un campo de 252 Gauss, se realiza la exposición de manera continua con tiempos de 90 minutos para las diferentes muestras. La muestra está colocada dentro del adaptador que se puede observar en la Figura10b. a la frecuencia y tiempo indicados.

Posteriormente se calcula el tamaño del poro inducido mediante caracterización del AFM, como no se puede acoplar el equipo de hipertermia al AFM, se utilizan las marcas previamente explicadas para volver a la misma zona. Esta caracterización se hace

justo después de aplicar el AMF. Para tratar las imágenes de AFM se ha utilizado el software Nanoscope y Gwyddion.

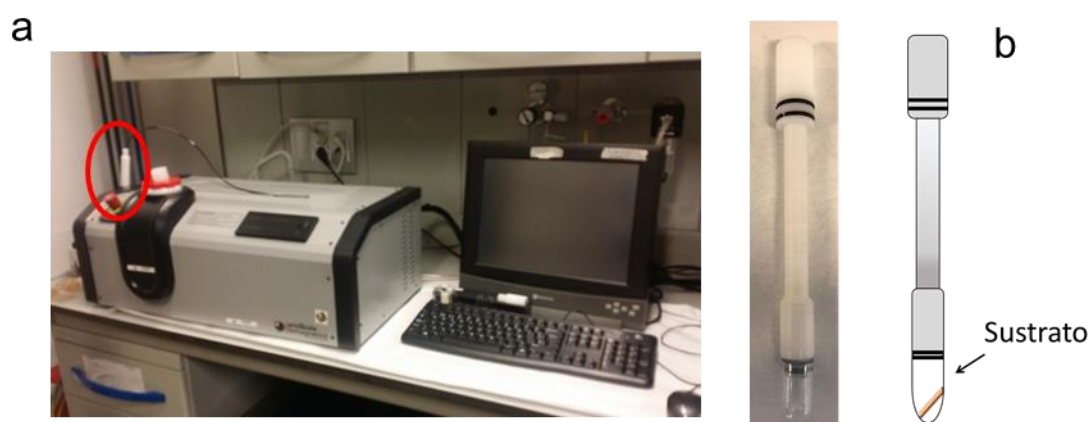


Figura 10. a) Equipo de hipertermia magnética; b) Aplicador donde se incorpora el sustrato para aplicar el AMF.

Reflectancia total atenuada (ATR)

La espectroscopia de infrarrojo es una técnica química analítica que permite obtención de un espectro infrarrojo de absorción o emisión que proporciona un espectro de reflexión, por el cual es posible realizar una identificación del tipo de enlaces y grupos funcionales de los materiales presentes en la muestra. Para la obtención de estos espectros se tienen tres técnicas de medida las cuales son: Transmisión, Reflexión y modo ATR (Attenuated Total Reflection), donde este último es un modo de muestreo en que un haz IR se proyecta en un cristal ATR transmisor, ópticamente denso y con un alto índice de refracción en cierto ángulo, haciendo que el haz se refleje internamente formando una onda evanescente sobre la superficie del mismo y de esta forma penetrar en la muestra. La energía de la onda evanescente es absorbida y la radiación reflejada (con la información química de la muestra) es conducida al detector. Esta onda se extiende a la muestra que se mantiene en contacto íntimo con el cristal, registrándose así el espectro de infrarrojo (ref).

Para los experimentos de espectroscopia de infrarrojo el Instituto de Nanociencia de Aragón cuenta con un Espectrómetro de Infrarrojo por Transformada de Fourier modelo Tensor 27, Bruker, con una fuente MIR y con el accesorio de ATR modelo Platinum ATR, Bruker con cristal de diamante. Con el cual se puede obtener espectros en la región del infrarrojo entre 4000 cm^{-1} y 400 cm^{-1} .

Método de trabajo en el ATR

El modo de ATR que se utiliza es el Avanzado Golden Gate_C2_XPM, con una velocidad de barrido de 4 cm^{-1} y 256 scans en la región de infrarrojo desde 400 a 4000 cm^{-1} , si se ha utilizado una región concreta, se ha indicado en el capítulo concreto de la tesis.

Microbalanza de cuarzo (QCM)

La microbalanza de cuarzo (Quartz Crystal Microbalance, QCM) Figura 11. es un sensor de masa capaz de detectar variaciones de material de hasta 10^{-15} gramos. El principio físico en el que se basa este método de medida es el efecto piezoeléctrico. Este fenómeno ocurre en determinados cristales como, por ejemplo, el cuarzo en el que se basan los cristales de QCM. El sustrato de QCM consta de dos electrodos de oro depositados a ambos lados del cristal. Cuando se aplica una corriente eléctrica alterna de la frecuencia adecuada, el cristal sufre una deformación que se propaga a través del mismo. Este movimiento se produce a una velocidad constante conocida como frecuencia de resonancia (f_0), la cual cambia si se ha depositado material sobre los electrodos. La variación entre la frecuencia de resonancia y la frecuencia con el material, se llama (Δf), y esta se puede relacionar con la masa depositada (Δm) mediante la ecuación de Sauerbrey:¹⁸

$$\Delta f = \frac{2f_0^2 \cdot \Delta m}{A \cdot \rho_q^{1/2} \cdot \mu_q^{1/2}}$$

Ec.1

Donde Δm es la masa depositada sobre el cristal de QCM, A es el área del sensor, ρ_q es la densidad del cuarzo y μ_q es el módulo de rigidez del mismo. Pero como f_0 , A, ρ_q y μ_q son constantes, es posible simplificar la ecuación 1 en la siguiente:

$$\Delta f = -C_f \cdot \Delta m$$

Ec.2

siendo C_f el factor de sensibilidad del cristal.



Figura 11. Equipo de QCM

2.3 Equipos utilizados en Alemania (Paderborn)

High speed-AFM (Microscopio de fuerza atómica de alta velocidad)

En la Figura 12 se puede observar el HS-AFM, JPK Nanowizard de BioAFM Bruker. Nos permite realizar experimentos a tiempo real con resolución atómica y un escaneo más rápido con velocidades de hasta 10 fotogramas por segundo. Además, se pueden registrar medidas de células, bacterias o superficies con alturas de hasta 8 μm .

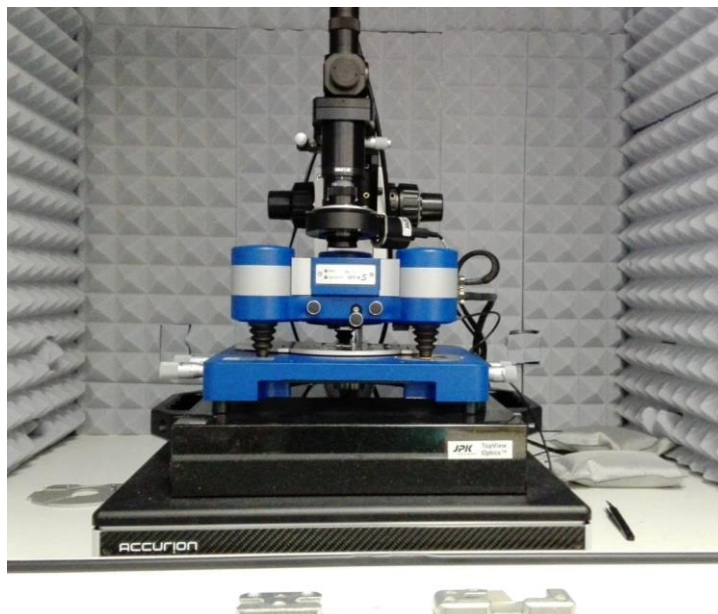


Figura 12. Microscopio de fuerza atómica de alta velocidad.

En la Figura 13 se puede observar el equipo de PM-IRRAS (espectroscopia de polarización por absorción y reflexión con modulación de infrarrojos) de la casa comercial Bruker, Con un ángulo de incidencia variable ($13-83^\circ$) este equipo se utiliza para el análisis de películas delgadas. El espectrofotómetro tiene un modulador fotoelástico, que permite la investigación de monocapas moleculares en superficies metálicas a través del PM-IRRAS. Además, también se puede emplear una celda de reflexión difusa (DRIFT) para la investigación de monocristales. Permite trabajar en medio líquido por lo que se pueden realizar experimentos para conocer la organización de las cadenas alquílicas cuando se ponen en contacto con un medio líquido.

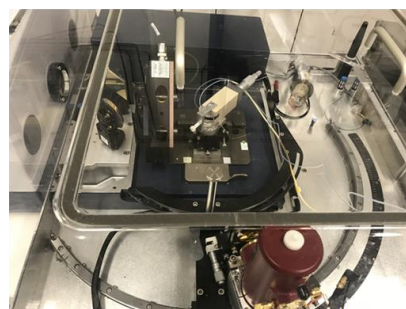
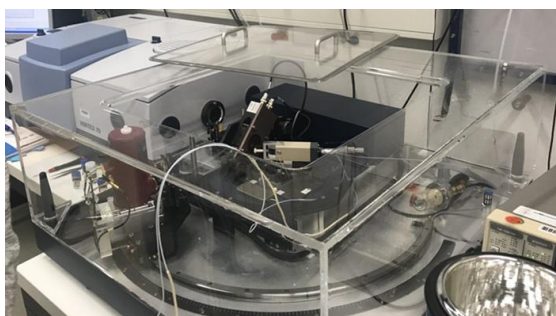


Figura 13. PM-IRRAS

2.4 Código Pynhon de la nanomecánica

Medida del radio de la punta

La medición del radio de la punta R es fundamental para un cálculo correcto del módulo de Young de la muestra.¹⁹ Para realizar esta medida, se escaneó una muestra de referencia con un módulo de Young conocido. Específicamente, una imagen de $1,5 \times 1,5 \mu\text{m}^2$ de una muestra de prueba comercial de poliestireno y elastómero de poliolefina (copolímero de etileno-octeno) PS-LDPE (Bruker), antes y después del experimento, se escaneó en Peak-Force AFM. Se sabe que los valores del módulo elástico de estos dos materiales son de aproximadamente 2 GPa y 100 MPa, respectivamente.

En la Figura 14a, se puede observar la topografía de un dominio circular LDPE incrustado en una matriz de PS, antes de realizar la medida. A partir del canal de rigidez proporcionado por la técnica Peak Force, fue posible extrapolar el módulo de Young efectivo medio de la región central del dominio circular. Estableciendo un radio de punta $R = 15 \text{ nm}$ se puede ajustar este valor medio a aproximadamente 130 MPa, el módulo elástico efectivo adecuado necesario para proporcionar un módulo de Young de muestra de 100 MPa. Nominalmente, el radio de la punta de un SCANASYST FLUID + cantilever (Bruker) debe ser menor de 12 nm, por lo tanto, se considera que $R = 15 \text{ nm}$ sigue siendo aceptable, tal vez mayor debido a las pequeñas contaminaciones que surgen del escaneo de la muestra de prueba. El mismo procedimiento se repitió al final del experimento, lo que resultó en un radio de punta más alto de 19 nm (Figura S14d-ef). Por lo tanto, se seleccionó un radio de punta $R = 17 \text{ nm}$ (valor promedio entre 15 y 19 nm) como valor para el análisis nanomecánico y las simulaciones del método de elementos finitos (FEM).

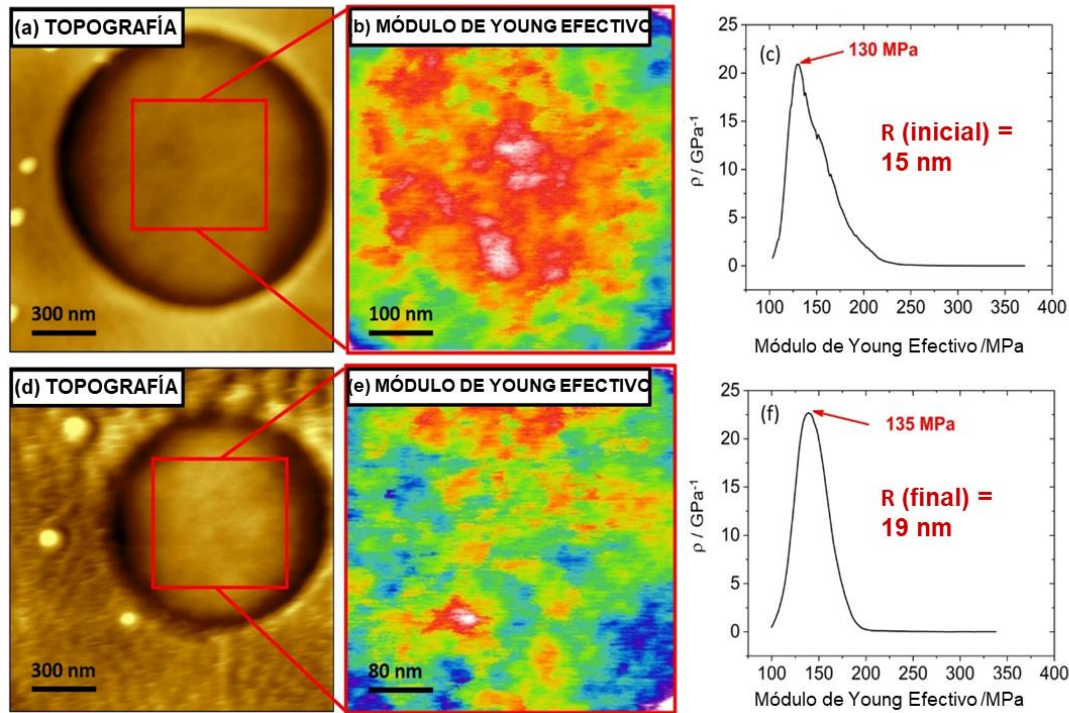


Figura 14. Imágenes de Peak Force (topografía y rigidez efectiva) de una muestra de prueba de PS-LDPE (Bruker), antes (abc) y después (def) del experimento a y d) Imagen topográfica que muestra un dominio circular de LDPE incrustado en una matriz de PS. b) y e) Rigidez efectiva de la parte central de los dominios circulares mostrados en las imágenes de su izquierda (a y d) c) Histograma de rigidez efectiva en relación con la Figura 14b que muestra una distribución de píxeles (ρ) con un valor medio de 130 MPa. f) Histograma de rigidez efectiva en relación con la Figura 14e que muestra una distribución de píxeles (ρ) con un valor medio de 135 MPa.

Simulaciones del método de elementos finitos (FEM)

Las simulaciones numéricas de la indentación se realizaron con software comercial FEM (COMSOL Multiphysics, COMSOL AB, Estocolmo, Suecia). El indentador era una esfera rígida ($R = 17$ nm), y el modelo de material utilizado era un material elástico (lineal, isotrópico y homogéneo, módulo de Young de $E = 170$ GPa). La

muestra también se simuló como un material elástico (lineal, isotrópico y homogéneo con un módulo de Young E de 130 MPa).

El tamaño lateral de la muestra (100 nm) fue lo suficientemente grande para evitar efectos de límite lateral, y se simularon dos espesores diferentes ($h_1 = 7$ nm y $h_2 = 14$ nm). El fondo de la muestra se fijó a un sustrato rígido. La punta se movió perpendicular a la superficie de la muestra, hasta una indentación máxima de 1 nm.

Los parámetros del agujero o malla se perfeccionaron hasta obtener una convergencia en las soluciones. Se clasificó para que fuera más refinada cerca del *indentador* y en los alrededores del punto de contacto de la punta (0,01 nm) y más gruesa en los bordes de la muestra (hasta 0,1 nm). Las simulaciones se realizaron asumiendo un contacto sin fricción entre la punta y la muestra.²⁰

3. Bibliografía

- (1) Moros, M.; Pelaz, B.; López-Larrubia, P.; García-Martin, M. L.; Grazú, V.; de la Fuente, J. M. Engineering Biofunctional Magnetic Nanoparticles for Biotechnological Applications. *Nanoscale* **2010**, 2 (9), 1746–1755.
- (2) Schütte, O. M.; Ries, A.; Orth, A.; Patalag, L. J.; Römer, W.; Steinem, C.; Werz, D. B. Influence of Gb3 Glycosphingolipids Differing in Their Fatty Acid Chain on the Phase Behaviour of Solid Supported Membranes: Chemical Syntheses and Impact of Shiga Toxin Binding. *Chem. Sci.* **2014**, 5 (8), 3104–3114.
- (3) Keller, A.; Facsko, S. Ion-Induced Nanoscale Ripple Patterns on Si Surfaces: Theory and Experiment. *Mater. (Basel, Switzerland)* **2010**, 3 (10), 4811–4841.
- (4) Lee, Y.-L.; Lin, J.-Y.; Chang, C.-H. Thermodynamic Characteristics and Langmuir-Blodgett Deposition Behavior of Mixed DPPA/DPPC Monolayers at

- Air/Liquid Interfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *296* (2), 647–654.
- (5) Castellana, E. T.; Cremer, P. S. Solid Supported Lipid Bilayers: From Biophysical Studies to Sensor Design. *Surf. Sci. Rep.* **2006**, *61* (10), 429–444.
- (6) Dols-Perez, A.; Fumagalli, L.; Simonsen, A. C.; Gomila, G. Ultrathin Spin-Coated Dioleoylphosphatidylcholine Lipid Layers in Dry Conditions: A Combined Atomic Force Microscopy and Nanomechanical Study. *Langmuir* **2011**, *27* (21), 13165–13172.
- (7) Langmuir, I.; Schaefer, V. J. Activities of Urease and Pepsin Monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60* (6), 1351–1360.
- (8) Hussain, S. A.; Dey, B.; Bhattacharjee, D.; Mehta, N. Unique Supramolecular Assembly through Langmuir - Blodgett (LB) Technique. *Heliyon* **2018**, *4* (12)
- (9) Dynarowicz-Latka, P.; Dhanabalan, A.; Oliveira, O. N. J. Modern Physicochemical Research on Langmuir Monolayers. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2001**, *91* (2), 221–293.
- (10) Ruiz-Rincón, S.; González-Orive, A.; De La Fuente, J. M.; Cea, P. Reversible Monolayer-Bilayer Transition in Supported Phospholipid LB Films under the Presence of Water: Morphological and Nanomechanical Behavior. *Langmuir* **2017**, *33* (30), 7538–7547.
- (11) Binnig, G.; Quate, C. F.; Gerber, C. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *56* (9), 930–933.
- (12) Voigtländer, B. *Scanning Probe Microscopy*; Springer; 2016.
- (13) Jalili, N.; Laxminarayana, K. A Review of Atomic Force Microscopy Imaging Systems: Application to Molecular Metrology and Biological Sciences.

- Mechatronics* **2004**, *14* (8), 907–945.
- (14) Carpick, R. W.; Salmeron, M. Scratching the Surface: Fundamental Investigations of Tribology with Atomic Force Microscopy. *Chem. Rev.* **1997**, *97*
- (15) Marrese, M.; Guarino, V.; Ambrosio, L. Atomic Force Microscopy: A Powerful Tool to Address Scaffold Design in Tissue Engineering. *Journal of Functional Biomaterials* . 2017.
- (16) Fratila, R. M.; Navascuez, M.; Idiago-López, J.; Eceiza, M.; Miranda, J. I.; Aizpurua, J. M.; de la Fuente, J. M. Covalent Immobilisation of Magnetic Nanoparticles on Surfaces via Strain-Promoted Azide–Alkyne Click Chemistry. *New J. Chem.* **2017**, *41* (19), 10835–10840.
- (17) Asín, L.; Stepien, G.; Moros, M.; Fratila, R. M.; de la Fuente, J. M. Magnetic Nanoparticles for Cancer Treatment Using Magnetic Hyperthermia. In *Clinical Applications of Magnetic Nanoparticles*; CRC Press: Boca Raton : Taylor & Francis, 2018., **2018**; pp 305–318.
- (18) Sauerbrey, G. Verwendung von Schwingquarzen Zur Wägung Dünner Schichten Und Zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Phys.* **1959**, *155* (2), 206–222.
- (19) Santos, S.; Guang, L.; Souier, T.; Gadelrab, K.; Chiesa, M.; Thomson, N. H. A Method to Provide Rapid in Situ Determination of Tip Radius in Dynamic Atomic Force Microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* **2012**, *83* (4), 43707.
- (20) Al-Rekabi, Z.; Contera, S. Multifrequency AFM Reveals Lipid Membrane Mechanical Properties and the Effect of Cholesterol in Modulating Viscoelasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2018**, *115* (11), 2658 LP – 2663.

Capítulo 2.

Preparación y caracterización de membranas celulares simuladas.

1. Introducción. La importancia de los modelos de membrana celulares

Las membranas celulares son estructuras laminadas formadas principalmente por fosfolípidos, colesterol, glúcidos y proteínas y juegan un papel esencial en los organismos vivos y en muchos de los procesos celulares que tienen lugar, por ejemplo, en la biosíntesis, desintoxicación, metabolismo, señalización, clasificación, interacciones célula-célula, respuesta inflamatoria, etc.¹

Toda la interacción y comunicación celular, tiene lugar a través de esta membrana, es decir, es la encargada de regular tanto la entrada como la liberación de muchas sustancias entre la matriz extracelular y el citoplasma. El estudio exhaustivo de estos procesos se ve dificultado por la elevada complejidad de la membrana.² Por lo tanto, comprender la composición química y la distribución de los componentes de ésta, así como las fuerzas que actúan entre sus componentes, es de vital importancia para comprender los mecanismos involucrados en los procesos mencionados anteriormente. En un intento por obtener una mejor comprensión de su organización estructural, las propiedades mecánicas y las funciones de biomembranas, se han utilizado modelos de membrana celular³⁻⁷ que incluyen liposomas y vesículas,⁸⁻¹⁰ monocapas de Langmuir¹¹⁻¹⁴ y bicapas lipídicas soportadas,^{5,15-18} lo que además ha venido impulsado por la aparición de una multitud de técnicas de caracterización de superficies.¹⁹⁻²² Entre estas técnicas, la microscopía de fuerza atómica (AFM)²³⁻²⁶ es de particular importancia ya que permite el estudio de la topografía y morfología de la muestra, lo que proporciona información sobre las propiedades físicas así como la adhesión o las interacciones biomoleculares. También, es muy relevante en este campo la espectroscopía de fuerza basada en AFM (AFM-FS)^{27,28} que permite estudiar las propiedades locales de los modelos de membrana de forma cuantitativa, con la posibilidad de controlar las condiciones ambientales.

Para fabricar membranas celulares simuladas se ha utilizado en esta tesis doctoral una mezcla de fosfolípido 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (abreviado como DPPC) y colesterol (COL) en una relación molar 1:1. Por un lado, se ha seleccionado DPPC, ya que se trata de un componente fundamental de las membranas celulares, representa el componente principal en los tensioactivos pulmonares y a menudo se usa como el principal fosfolípido para preparar liposomas en una amplia gama de aplicaciones, debido a su carga neutra.²⁹ Por otro lado, se ha utilizado colesterol dado su trascendental papel en la membrana celular,³⁰ ya que es un componente activo en la modulación de la fluidez de la membrana³¹ y de la transición de fase de las bicapas lipídicas;²⁷ el COL también aumenta el orden estructural de las cadenas de fosfolípidos en la fase de fluido,^{32,33} mostrando en cambio un efecto opuesto sobre los fosfolípidos en la fase de gel.³⁴⁻³⁶ Por otra parte, el COL regula el mecanismo que controla la asimetría de fosfolípidos de la membrana.³⁷ En cuanto a la relación entre estos dos componentes que hemos seleccionado para estos estudios, ensayos preliminares realizados en mi Trabajo de Fin de Máster, han mostrado que la proporción 1:1 de ambos componentes resulta en monocapas de Langmuir-Blodgett muy homogéneas, libres de defectos tridimensionales y sin agregación alguna de los componentes, lo que las convierte en candidatas idóneas para estudios en microscopía de fuerza atómica. Por estos motivos en esta tesis doctoral, la mezcla de DPPC:COL 1:1 se ha utilizado para formar una película de Langmuir que posteriormente ha sido transferida sobre un soporte sólido de mica. En este capítulo se van a mostrar tanto los resultados más relevantes obtenidos en mi Trabajo Fin de Máster (TFM) – ya que éste supuso el punto de partida de esta tesis doctoral y ayudará a contextualizar las hipótesis de partida - como resultados propios ya de la tesis que han supuesto una extensión del estudio desarrollado en mi TFM. El objetivo del estudio realizado durante mi tesis doctoral es el de alcanzar una mejor comprensión de

algunos de los fenómenos observados en el TFM, aportando nuevos datos experimentales, lo que hizo posible la publicación de los mismos en la revista científica Langmuir. Este artículo se puede consultar en el anexo II de esta memoria de la tesis doctoral.

2. Caracterización de las películas de Langmuir y de Langmuir-Blodgett

Una vez que se seleccionaron los compuestos que se iban a utilizar para simular la membrana celular se estudió como se comportaban diferentes proporciones del DPPC y COL en la interfase aire-agua, para ello se registraron isothermas de presión superficial, π , frente al área por molécula, A (isoterma π - A) de los compuestos puros y de las mezclas. Los resultados relativos a este objetivo y que se presentan a continuación se obtuvieron durante la realización del Trabajo Fin de Máster

La Figura 1 muestra las isothermas π - A , correspondientes a los compuestos puros DPPC y COL., así como las isothermas correspondientes a las monocapas mixtas incorporando ambos componentes en diferentes proporciones. Todas ellas fueron registradas en un laboratorio a temperatura constante de 20 °C mediante el procedimiento detallado en el capítulo 2 Materiales y métodos.

De forma genérica, a medida que se comprime una película de Langmuir, la monocapa va pasando por distintas fases y transiciones de fase; estas pueden incluir las fases: gas(G), líquido expandido (LE), líquido condensado (LC), y sólido (S) en donde la monocapa está ordenada, y finalmente tiene lugar el colapso de la monocapa.

En nuestro estudio y para todas las isothermas, el área inicial por molécula fue de $1.4 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécula}^{-1}$ y los resultados obtenidos se encuentran en consonancia con la literatura.^{1,2} La isoterma π - A de DPPC consta de una fase gaseosa en la región de $1,40 - 1,05 \text{ nm}^2$ seguida de la fase líquida expandida (LE) en $1,05-0,80 \text{ nm}^2$. Posteriormente, la monocapa presenta una transición de fase del estado líquido expandido (LE) al estado

líquido condensado (LC) (0,80-0,60 nm²). Finalmente, la fase sólida (S) comienza en 0,47 nm² y se observa el colapso de la monocapa a unos 57 mN·m⁻¹. La isoterma correspondiente al colesterol se caracteriza por un despegue a 0,45 nm²·molécula⁻¹, y después hay un aumento constante en la presión superficial a medida que se comprime la película. El colapso de la monocapa de colesterol tiene lugar alrededor de 44 mN·m⁻¹. Las isotermas $\pi - A$ correspondientes a las mezclas del DPPC y COL. a diferentes fracciones molares tienen un comportamiento intermedio entre el de los compuestos puros, tal y como se puede observar en la Figura 1.

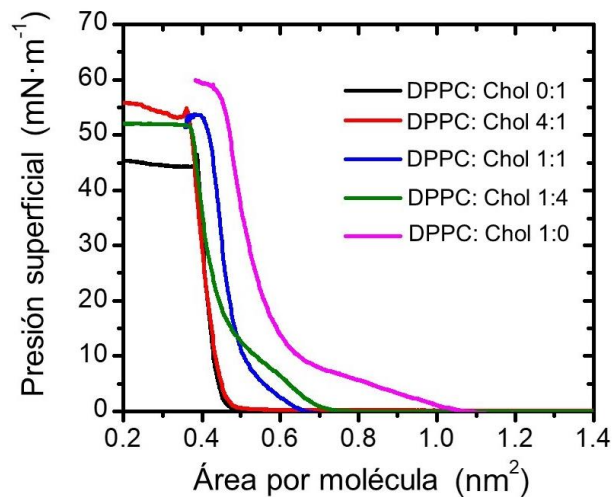


Figura 1. Isotermas de área de presión superficial versus área por molécula para DPPC, COL y monocapas mixtas en las proporciones indicadas.

Para obtener información sobre la miscibilidad de los componentes, DPPC y COL se determinaron las áreas de exceso por molécula en las películas mixtas. El área de exceso correspondiente se puede calcular utilizando la siguiente ecuación:³

$$A^{\text{EXC}} = A_{12} - A_{12}^{\text{id}} = A_{12} - (A_1x_1 + A_2x_2) \quad (1)$$

donde A_1 y A_2 son áreas moleculares de los compuestos puros DPPC y COL., a una presión superficial específica; x_1 y x_2 son las fracciones molares de los compuestos en la

mezcla, y A_{12} es el área por molécula en la película mixta. Para monocapas mixtas completamente inmiscibles o totalmente miscibles (ideales), el área en exceso es cero. Por el contrario, las áreas de exceso positivas o negativas son indicativas de interacciones moleculares entre los dos componentes. Por lo tanto, las desviaciones positivas del área de exceso en un sistema mixto implican algún tipo de interacciones repulsivas. Por el contrario, las desviaciones negativas significan mayores interacciones atractivas entre los compuestos o una reorganización estructural de las moléculas (por ejemplo formación de complejos).³

La Figura 2 muestra el área en exceso por molécula a 20, 30, 35 y 40 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$. El área de exceso por molécula es negativa para todo el rango de fracción molar, lo que parece indicar la existencia de interacciones atractivas entre DPPC y COL. en las películas mixtas. La presencia de dos mínimos en el gráfico de área de exceso frente a fracción molar se ha interpretado previamente en términos de una separación de fases entre los componentes, con una de las fases enriquecida con DPPC y la otra con colesterol.³

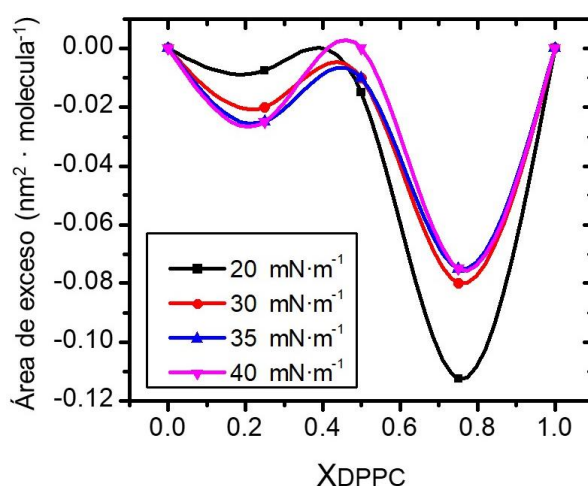


Figura 2. Área de exceso versus fracción molar de DPPC para monocapas mixtas
DPPC:Colesterol a las presiones superficiales indicadas.

Para ampliar este estudio termodinámico, durante la tesis, se calculó el módulo elástico K_s , para la monocapa de DPPC:COL 1:1 de acuerdo a la ecuación:⁴

$$K_S = -A \cdot \left(\frac{\delta\pi}{\delta A} \right)_T \quad (2)$$

La representación de este módulo de Young o módulo elástico, K_s , correspondiente a la monocapa de DPPC:COL 1:1 frente a la presión superficial, Figura 3, nos proporciona información adicional sobre las transiciones de fase que tienen lugar en la monocapa a lo largo del proceso de compresión en la interfase aire-agua.

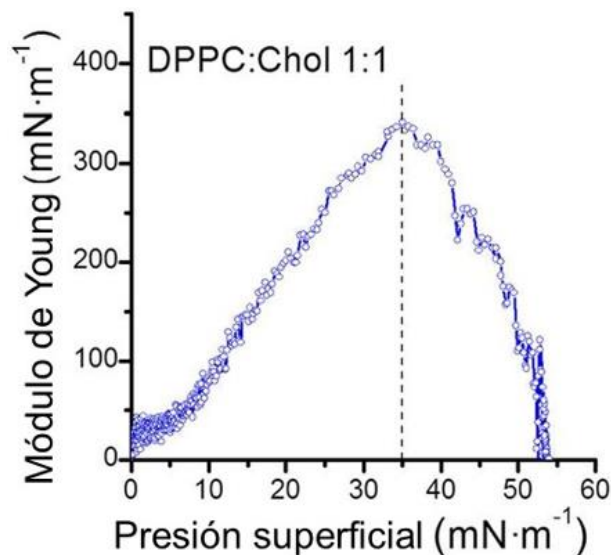


Figura 3. Módulo de Young frente a la presión superficial para un monocapa mixta de DPPC:COL 1:1

El valor del módulo de Young a 35 mN·m⁻¹, obtenido mediante la ecuación 2, junto con la información proporcionada por las Figuras 2 (isoterma π -A) y 3 (representación K_s - π) permiten concluir que la mezcla DPPC:COL 1:1 resulta en una monocapa relativamente compacta que exhibe un área de exceso negativa, A^E , ($A^E = -0.035 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécula}^{-1}$) a 35 mN·m⁻¹. El valor de K_s a 35 mN·m⁻¹ es indicativo de una fase condensada (CC) inducida por el colesterol, descrita por Miyoshi y Kato.⁵ Estos datos

indican que el COL. induce la formación de una fase altamente condensada en monocapas de DPPC tal, lo que está de acuerdo con observaciones previas.⁵ Además, la mezcla de DPPC:COL 1:1, está descrita en la literatura como aquella que contiene la mayor cantidad posible de COL antes que se formen dominios.¹

3. Caracterización de la monocapa de DPPC:COL 1:1

Las películas DPPC: COL 1:1 monocapa LB se transfirieron a $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$; para elegir esta presión de transferencia se tuvieron en cuenta los estudios termodinámicos previos mostrados donde el valor máximo del módulo de Young se obtiene a esta presión. También se tuvo en cuenta que, acorde a los datos publicados en la literatura, es a esta presión superficial a la que se simula mejor la fuerza lateral ejercida en las membranas biológicas.⁶ Las películas fueron transferidas sobre un sustrato de mica sumergido inicialmente en la subfase de agua. Una vez la monocapa ha alcanzado la presión objetivo de transferencia, el sustrato es extraído lentamente,⁷ transfiriéndose una monocapa muy compacta, altamente homogénea, libre de poros o agujeros y de defectos tridimensionales, como se verá a continuación. Todo el proceso está explicado con más detalle en el capítulo 2, materiales y métodos. Los resultados que hemos obtenido están en total consonancia con observaciones previas sobre películas Langmuir y Langmuir – Blodgett de DPPC y COL.¹

3.1 Caracterización mediante AFM y ángulo de contacto de la monocapa de DPPC:Colesterol 1:1

La Figura 4.a1 muestra una imagen topográfica de AFM representativa de una película LB de DPPC:COL 1:1 sobre un sustrato de mica. La imagen muestra una superficie muy homogénea, cuyo espesor se determinó rascando la película (Figura 4.a2) con la punta del AFM aplicando una fuerza de 100 nN.⁸ De acuerdo con los resultados obtenidos, la monocapa tiene una altura de $(2,4 \pm 0,1) \text{ nm}$ (Figura 4.a3), lo que es acorde

a la formación de una película de espesor monomolecular, como se recoge en la bibliografía,⁹ así como con modelos moleculares teóricos si se asume un ángulo de inclinación de las moléculas de DPPC de 30° con respecto a la normal a la superficie (Spartan 08 V1.0.0 indica una longitud de 2.8 nm para DPPC en una disposición vertical).

El valor del ángulo de contacto de una gota de agua (Milli-Q) depositada sobre una superficie depende de la energía superficial (carácter hidrofílico o hidrofóbico de la superficie) y de la rugosidad de dicha superficie. El ángulo de contacto de una gota de agua sobre un sustrato de mica es inferior a 10°, como corresponde a una superficie altamente hidrofílica. En cambio, el ángulo de contacto de una gota de agua sobre una monocapa de DPPC:COL 1:1 depositada sobre un sustrato de mica es de alrededor de 86° (Figura 4.b2, ver procedimiento experimental para la determinación del ángulo de contacto en el capítulo de materiales y métodos-ángulo de contacto). Este resultado es indicativo de una superficie mucho menos hidrofílica, lo que puede explicarse mediante la formación de una monocapa en la cual las partes hidrofílicas del fosfolípido y el colesterol están en contacto con el sustrato de mica y las cadenas hidrofóbicas están orientadas hacia el aire, como se muestra en la Figura 4.b2. En la tabla 1 se pueden observar los diferentes ángulos de contacto de una gota de agua depositada sobre mica, una monocapa de DPPC:COL 1:1 y una bicapa.

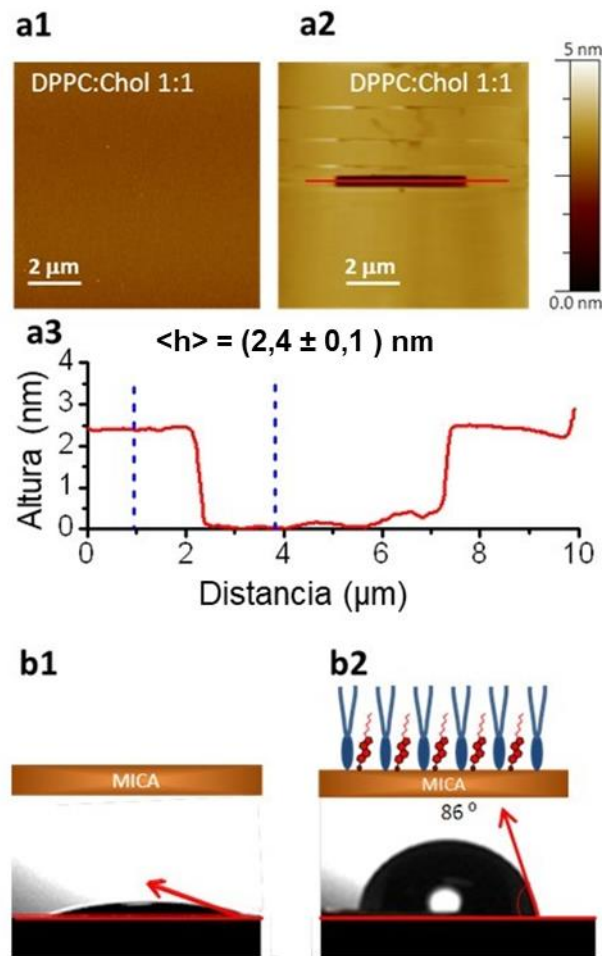


Figura 4. (a1) Imagen AFM de una monocapa LB de DPPC:COL 1:1 transferida sobre un sustrato de mica a una presión superficial de $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. (a2) Imagen AFM en la que la monocapa se rascó con la punta AFM para determinar la altura de la monocapa. La escala de altura a la derecha de a2 también se aplica a a1. (a3) Perfil de sección que muestra un espesor de la monocapa de $(2,4 \pm 0,1) \text{ nm}$. (b1) Ángulo de contacto de una gota de agua sobre un sustrato de mica desnuda y (b2) ángulo de contacto de una gota de agua sobre una monocapa LB de DPPC:COL 1:1; el esquema muestra la orientación de los grupos polares de DPPC (azul) y COL (rojo) hacia la superficie de la mica y las cadenas de alquilo hacia el aire.

Tabla 1. Medidas de ángulo de contacto en diferentes muestras.

Muestra	Carácter	Ángulo de contacto (θ)	Esquema
SUSTRATO MICA	Hidrofílico	$< 10^\circ$	
MONOCAPA DPPC:Chol 1:1	Hidrofóbico	86°	
BICAPA DPPC:Chol 1:1	Hidrofílico	$<10^\circ$	

Toda esta caracterización de la muestra mediante AFM y ángulo de contacto fue llevada a cabo durante mi trabajo fin de máster, pero como ya he indicado se recopila aquí para contextualizar las investigaciones mostradas a lo largo del capítulo y que ya forman parte de mi tesis doctoral.

3.2 Caracterización por ATR de la monocapa DPPC:Coolesterol 1:1

Las monocapas de DPPC:COL 1:1 transferidas a una presión superficial de $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ se estudiaron mediante espectroscopia infrarroja con la finalidad de analizar el grado de orden de las cadenas hidrocarbonadas de las películas. (Para más información de esta técnica ver el capítulo de materiales y métodos-ATR). Estas medidas fueron llevadas a cabo durante esta tesis doctoral. El experimento se realizó con una resolución espectral de 2 cm^{-1} y se acumularon 252 barridos en la región comprendida entre los números de onda 2800 y 3000 cm^{-1} . La posición de las bandas de vibración de tensión simétrica y asimétrica, $\nu_s(\text{CH}_2)$ y $\nu_a(\text{CH}_2)$ permite conocer el estado de empaquetamiento de las moléculas en la monocapa.¹⁰⁻¹³ Cuando las cadenas alquílicas están altamente ordenadas (conformación trans-zigzag), las bandas aparecen cerca de los números de

onda 2918 y 2848 cm^{-1} , respectivamente. Sin embargo, si las cadenas alquílicas están desordenadas, los modos de vibración de tensión se desplazan a números de onda de 2927 y 2856 cm^{-1} , dependiendo de la proporción de la conformación *gauche*. Las cadenas hidrocarbonadas en las monocapas DPPC:COL 1:1 transferidas a 35 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ presentan bandas a 2918 y 2848 cm^{-1} , tal y como se observa en la Figura 5, lo que indica un alto grado de orden en las cadenas alquílicas que, acorde a estos resultados, exhiben una conformación trans-zigzag.

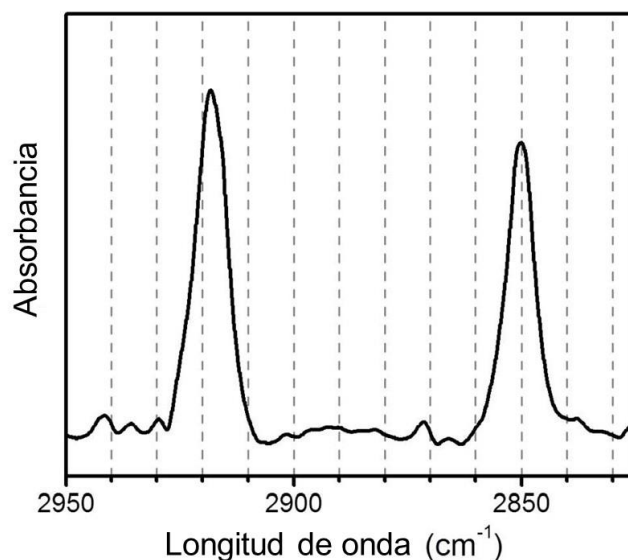


Figura 5. Espectro ATR de una monocapa DPPC: COL 1:1 transferida a una presión superficial de 35 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

4. Estudio de estabilidad de la monocapa de DPPC:COL 1:1 en un medio líquido.

Durante el Trabajo Fin de Máster, se estudió la estabilidad e integridad de la monocapa LB DPPC:COL 1:1 cuando se puso en contacto con un medio líquido. El estudio se realizó tanto en agua Milli-Q como en una disolución tampón de HEPES (pH

7.4, 10 mM de HEPES). Estas condiciones de baja fuerza iónica imitan las condiciones fisiológicas en una membrana celular. En ambos casos se observó que las moléculas en la monocapa se reordenan espontáneamente convirtiéndose en una bicapa. Los resultados que se muestran a continuación son los obtenidos cuando la muestra estaba inmersa en una disolución tampón de HEPES, ya que se aproxima más a las condiciones fisiológicas que se dan en una membrana celular biológica, aunque los resultados obtenidos tras la inmersión de las películas en agua Milli-Q son análogos.

La secuencia temporal de imágenes AFM registradas a medida que aumenta el tiempo de inmersión de la monocapa DPPC:COL 1:1 en una disolución tampón HEPES muestra cambios estructurales indicativos de la formación de una bicapa (Figura 6.a); dicha transformación de monocapa a bicapa puede apreciarse más claramente en los perfiles de la sección transversal de la muestra (Figura 6.b). Así, las diferentes alturas de los dominios visibles en las imágenes de AFM (Figura 6) son compatibles con una transición desde una monocapa inicial, a la formación de una bicapa parcial, y finalmente una bicapa completa, como se muestra en el esquema inferior de la Figura 6. De hecho, el perfil de sección transversal para un tiempo de inmersión de 60 minutos muestra como los dominios de bicapa bien definidos, con una tonalidad amarilla en las imágenes, se corresponden con una altura de bicapa y el resto corresponden a regiones de mica sin cubrir, tal y como se ilustra en el esquema de la Figura 6.c.

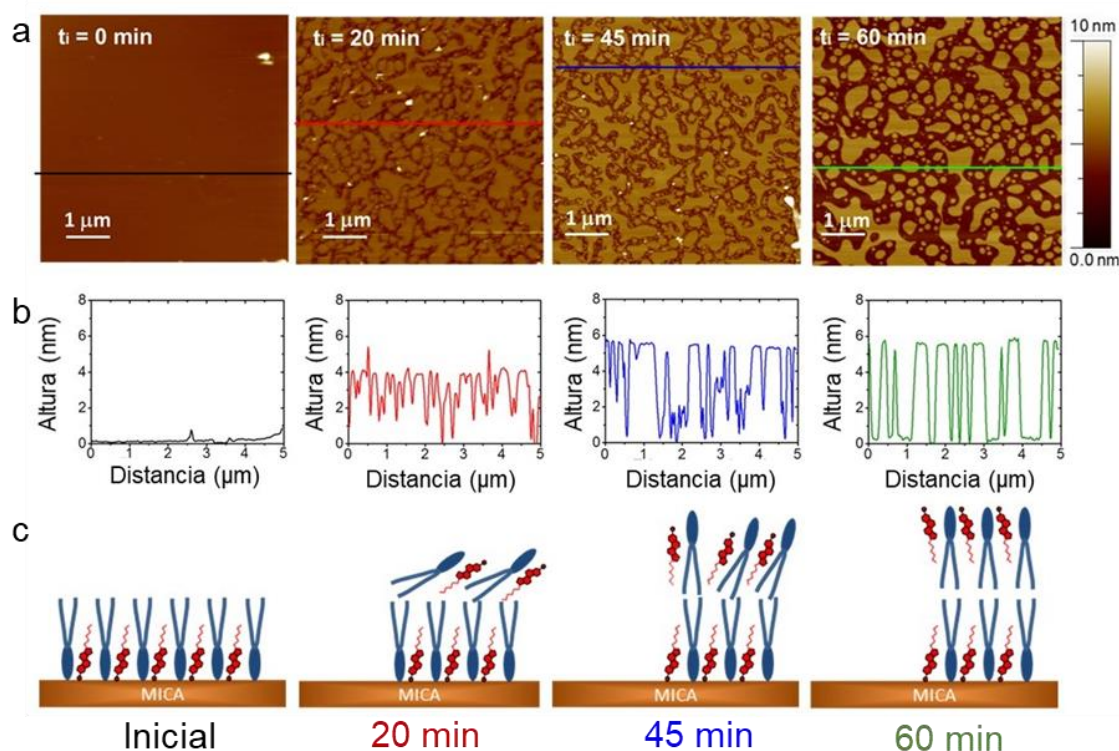


Figura 6. Fila a: imágenes de AFM de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$. Fila b: análisis representativo de la sección transversal correspondiente a una película DPPC:COL 1:1 sumergida en una disolución $50 \mu\text{L}$ de HEPES 10 mM ($\text{pH } 7,4$) que muestra la transición de una monocapa a una bicapa a los tiempos de inmersión indicados. Fila c: esquema ilustrativo de la reorganización de la película desde, una monocapa a una bicapa incluyendo los pasos intermedios en los que la capa superior muestra una configuración con las moléculas inclinadas a bajos tiempos de inmersión (por ejemplo, $t_i = 20 \text{ min}$) seguida de una ordenación gradual de las moléculas en la capa superior al aumentar los tiempos de inmersión ($t_i = 45 \text{ min}$) hasta que se obtiene un ordenamiento vertical de las moléculas a tiempos de inmersión altos ($t_i = 60 \text{ min}$).

Estos resultados pueden interpretarse de la siguiente manera: en la monocapa DPPC:COL 1:1, las cadenas hidrocarbonadas quedan dispuestas hacia arriba en contacto con el aire, mientras que la cabeza polar del DPCC y del COL están orientados hacia la superficie de mica, muy hidrófila, tal y como se ha mostrado antes en la Figura 4.b2. Cuando esta monocapa se pone en contacto con un medio líquido, las cadenas

hidrocarbonadas tenderán a evitar el contacto con el medio acuoso para lo que las moléculas se reorganizan formando una bicapa, creando así un núcleo hidrofóbico interno. Schwarz et al.¹⁴ observaron un comportamiento similar al exponer una monocapa de DPPC puro depositada sobre mica a un medio líquido (agua Milli-Q), apreciando la formación de una bicapa de fosfolípido. Curiosamente, este fenómeno no se observó cuando la monocapa se sumergió en n-decano, un compuesto no polar.

En la Figura 7 se muestran los histogramas correspondientes a la sección transversal de películas LB de DPPC:COL 1:1 sobre mica a diferentes tiempos de inmersión. Estos histogramas facilitan la visualización de las diferencias de altura observadas durante la transición espontánea de monocapa a bicapa. Al comienzo del experimento (línea negra en el histograma) no se observan cambios significativos en la morfología y la altura de la película. Por lo tanto, la distribución del valor de altura para tiempos de inmersión muy cortos refleja principalmente la rugosidad de la superficie de la monocapa. Por el contrario, el histograma de profundidad para el tiempo de inmersión de 20 min (gráfico rojo en la Figura 7) exhibe una gran dispersión de datos en la altura. Esto puede explicarse debido a la concurrencia simultánea de (i) áreas de mica desnuda; (ii) regiones de monocapa; (iii) regiones de bicapa que muestran una configuración inclinada; (iv) e incluso los primeros pasos hacia una ordenación de las moléculas de la segunda capa ya dispuestas en posición vertical. Además, las moléculas ubicadas en el borde de los dominios de bicapa más grandes, y especialmente las que forman parte de las regiones de bicapa más pequeñas, muestran un número de coordinación promedio por molécula distinto en comparación con los presentes en el núcleo de la región de bicapa y también muestran características geométricas más redondeadas con el objetivo de exponer los grupos polares a la disolución acuosa.¹⁵ La combinación de estos distintos

escenarios da como resultado una gran dispersión de los valores de profundidad como se observa en la Figura 7.

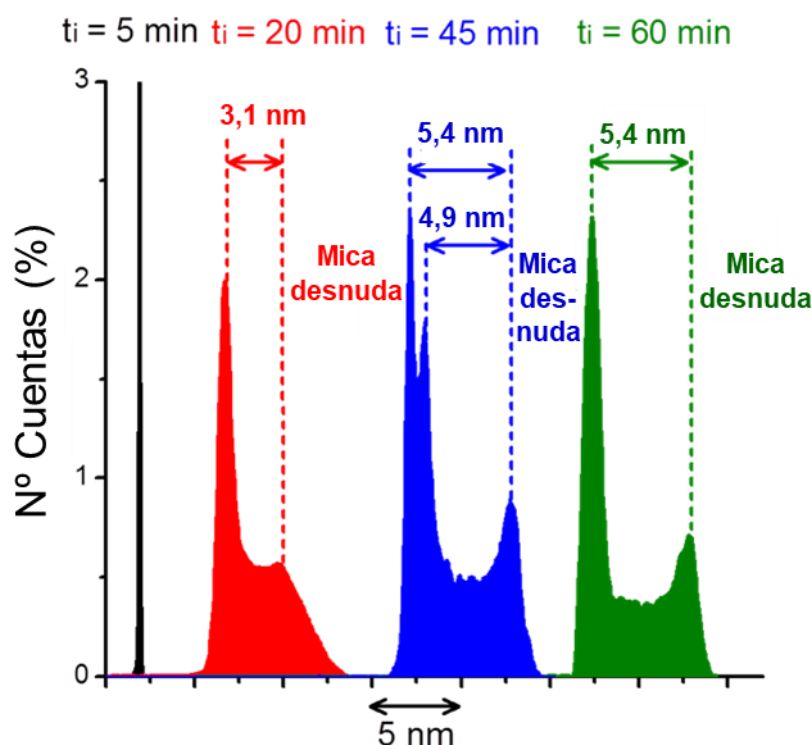


Figura 7. Histogramas de profundidad que muestran la distribución de los valores de altura en una monocapa DPPC:COL 1:1 en una disolución tampón de HEPES 10 mM para los tiempos de incubación indicados. Estos histogramas se obtuvieron a partir de las imágenes AFM de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ representadas en la Figura 6 (los histogramas de profundidad se han desplazado en el eje x para poder clarificar lo que sucede). Las alturas promedio para cada caso, $\langle h \rangle$, están referidas al valor de profundidad correspondiente a la mica desnuda, marcada con líneas discontinuas y también está indicada con las etiquetas insertadas dentro del gráfico.

Aunque se ha comentado antes que los resultados obtenidos tras la inmersión de las películas en agua Milli-Q son análogos a los obtenidos en HEPES, cabe destacar que la altura promedio registrada para los dominios de bicapa en agua Milli-Q aumenta a 6 nm frente a los 5,4 nm obtenidos por inmersión en una solución HEPES 10 mM, (Figuras 6 y 7), es decir, se obtiene una altura ligeramente más alta cuando está inmerso en agua Milli-Q. Este efecto ya ha sido observado por Garcia-Manyes y colaboradores^{16,17} para

bicapas lipídicas puras y también estudiado por simulaciones de Monte Carlo.¹⁸ Estos estudios experimentales y teóricos concluyeron que la presencia de sales y también un aumento en la fuerza iónica resultan en interacciones electrostáticas repulsivas inferiores (y puentes catiónicos) entre las cabezas polares zwitteriónicas del fosfolípido, así como interacciones más fuertes de van der Waals entre las cadenas hidrofóbicas. Como consecuencia, estos dos efectos dan como resultado un empaquetamiento más compacto de las moléculas de fosfolípido que también pueden estar relacionados con una menor altura de la bicapa.¹⁹

4.1 Análisis del recubrimiento de los dominios de DPPC y COL en las películas DPPC:COL 1:1 LB

Para determinar el recubrimiento de la monocapa o de la bicapa en función del tiempo de inmersión a partir de las imágenes topográficas de AFM se ha utilizado una herramienta del software del programa Nanoscope conocida como *bearing analysis* que permite obtener el porcentaje del área proyectada ocupada por regiones que muestran valores de profundidad menores o iguales a un valor determinado o umbral. Para poder determinar el porcentaje del área recubierta por zonas de bicapa, se tienen que reducir las imágenes de AFM a dos alturas fijando un valor umbral, que en nuestro caso corresponde a la altura de la capa. Por lo tanto, se divide la imagen de AFM en dos zonas, la primera zona correspondiente a la altura de bicapa que equivale al valor de umbral, y la zona del sustrato, con un valor más bajo al umbral. Hay que seleccionar un área, que el caso de la Figura 8, panel izquierdo, correspondería al recuadro en línea discontinua sombreado en azul, y se obtiene una gráfica (Figura 8, panel derecho), con una curva en color rojo que representa el área relativa recubierta proyectada para cada valor de profundidad. El análisis estadístico de los datos correspondientes a imágenes de AFM de áreas 5 x 5, 10 x 10 o 20 x 20 μm^2 condujo a resultados de recubrimiento superficial del DPPC y COL

del 54% para $t_i = 20$ min. (Figura 8), 49% para $t_i = 45$ min. (Figura 9), y 47% para $t_i = 60$ min. (Figura 10). Parte de estos valores se obtuvieron durante la realización del Trabajo Fin de Máster, pero se ampliaron durante la tesis para poder tener una mayor estadística de los datos.

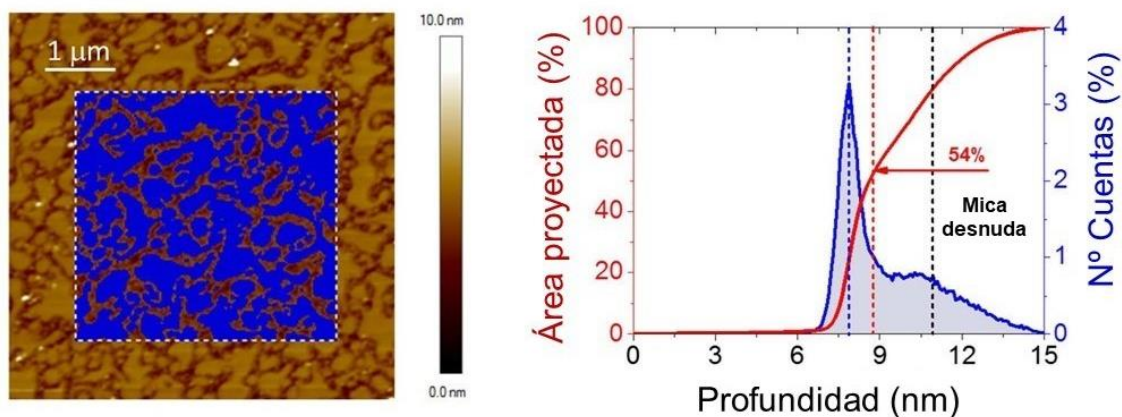


Figura 8. Izquierda: imagen AFM de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ de una monocapa LB de DPPC: COL 1:1 después de la inmersión durante 20 minutos en una solución HEPES 10 mM con la máscara en azul que revela las áreas de mica libres de moléculas. Derecha: histograma de profundidad que muestra la distribución de datos de altura a diferentes profundidades referidas a un punto de referencia, es decir, el píxel más alto. La línea roja indica el área proyectada relativa cubierta en cada valor de profundidad representado como una máscara azul en la imagen topográfica correspondiente al área encuadrada de trazos blancos. El pico pequeño que se observa en el histograma marcado con una línea vertical discontinua negra se atribuye al sustrato descubierto de mica, mientras que la flecha roja representa el umbral de altura seleccionado correspondiente a la altura promedio de los dominios de bicapa medidos.

Curiosamente, y a diferencia de lo que sucede para $t_i = 20$ min. y 60 min, el histograma de profundidad registrado para $t_i = 45$ min, representado en la Figura 9, muestra dos máximos, marcados con líneas verticales discontinuas azules, que corresponden a espesores de 4,9 y 5,4 nm para los dominios de bicapa obtenidos. Estos valores se han atribuido a un grado diferente de empaquetamiento de las moléculas, donde

dicho grado de empaquetamiento y orientación de las moléculas depende del tiempo de inmersión. Sin embargo, esta ligera diferencia de altura también podría estar relacionada con la aparición de moléculas de fosfolípidos menos coordinadas ubicadas en los límites de las islas de bicapa más pequeñas que se incorporan progresivamente a dominios más grandes. En cualquier caso, el análisis de recubrimiento llevado a cabo a los valores de umbral de altura mencionados anteriormente, es decir, 4,9 y 5,4 nm, conduce a valores de recubrimiento superficial de un 24 y 25%, respectivamente.

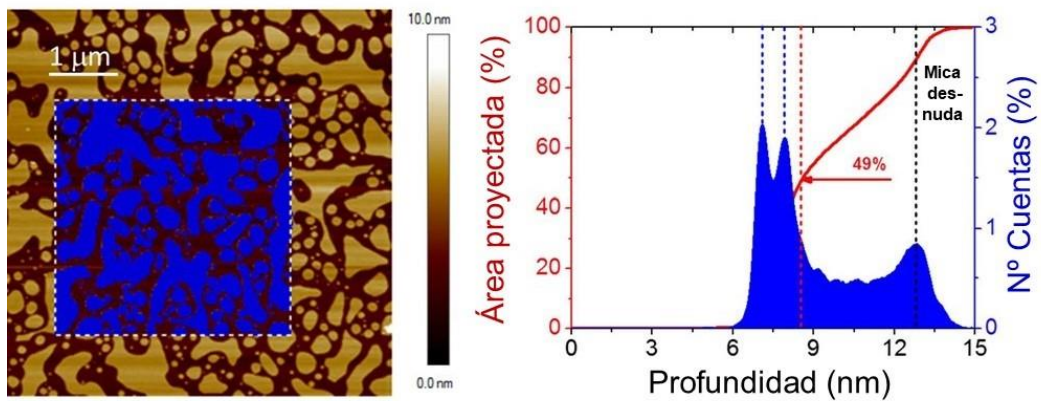


Figura 9. Izquierda: imagen AFM de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ de una monocapa LB de DPPC:COL 1:1 después de la inmersión durante 45 minutos en una disolución HEPES 10 mM con la máscara en azul que revela áreas de mica libres de moléculas. Derecha: histograma de profundidad que muestra la distribución de datos de altura a diferentes profundidades referidas a un punto de referencia, es decir, el píxel más alto. La línea roja, es decir, el bearing análisis o área proyectada, indica el área proyectada relativa cubierta en cada valor de profundidad representado como una máscara azul en la imagen topográfica correspondiente al área encuadrada en línea discontinua blanca. El pico pequeño en el histograma marcado con una línea vertical discontinua negra se atribuye al sustrato descubierto de mica, mientras que la flecha roja representa el umbral de altura seleccionado correspondiente a la altura promedio de los dominios de bicapa medidos.

A medida que el tiempo de inmersión de la muestra en la solución HEPES se acerca a 60 minutos, se observa la altura de una bicapa completa, con un máximo en el histograma de profundidad a 5,4 nm (Figura 7). Así, el recubrimiento de esta bicapa para la película LB de DPPC:COL 1:1 es aproximadamente del 47% para un tiempo de incubación de 60 min, después del cual no se observan más cambios, Figura 10.

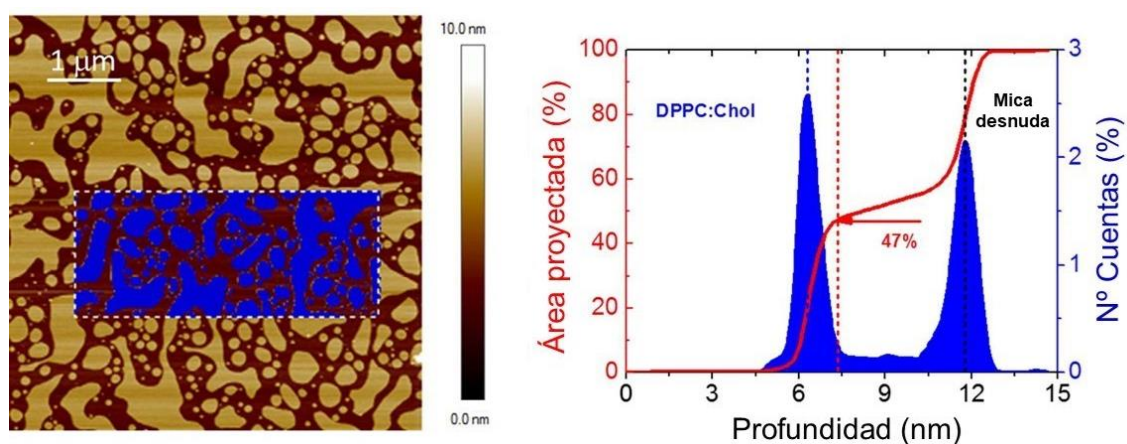


Figura 10. Izquierda: imagen AFM de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ de una película LB monocapa de DPPC:COL 1:1 después de un tiempo de inmersión de 60 minutos en una disolución HEPES 10 mM con la máscara en áreas azules de mica sin cubrir (una vez que el umbral de profundidad correspondiente a la altura de la bicapa lipídica seleccionada, todos los eventos/píxeles en la imagen con alturas inferiores a la seleccionada, es decir, mica desnuda, no están cubiertos con la máscara en azul). Derecha: histograma de profundidad que muestra la distribución de datos de altura a diferentes profundidades referidas a un punto de referencia, es decir, el píxel más alto. La línea roja (bearing analysis) indica el área proyectada relativa cubierta en cada valor de profundidad representado como una máscara azul en la imagen topográfica correspondiente al área encuadrada de trazos blancos en la imagen AFM. El pico en el histograma marcado con una línea vertical discontinua negra se atribuye al sustrato descubierto de mica, mientras que la flecha roja representa el umbral de altura seleccionado que corresponde a la altura promedio de los dominios de bicapa medidos.

Estos resultados indican que a medida que aumenta el tiempo de inmersión, la cantidad de moléculas DPPC:COL que se incorporan a la capa de arriba va continuamente aumentando hasta que se forma una bicapa, maximizando las interacciones de van der Waals de las cadenas alquílicas. Durante este proceso de formación de la bicapa las moléculas evolucionan progresivamente desde un ángulo de inclinación más alto referido a la normal al sustrato, y por tanto espesores más bajos, hasta una disposición vertical muy compacta con ángulos de inclinación respecto a la normal más bajos y, por lo tanto, alturas más altas. La transición de monocapa a bicapa está esquematizada en la Figura 6.c.

Estos procesos de reorganización, en el que se maximizan interacciones de cadenas hidrocarbonadas entre las moléculas vecinas, también ocurre por ejemplo en monocapas autoensambladas de tioles,²⁰ y en otros tipos de biomateriales como los integrados por nanofibras de lipopéptidos o por monocapas de Dipalmitoil fosfatidiletanolamina (PE),^{21,22} aunque estos tienden a formar agregados en forma de fibras en vez de dominios. Este mecanismo de reorganización de estructuras monocapa a bicapa, se ha estudiado previamente en diferentes combinaciones de lípidos y sustratos.²³⁻
²⁷ En general, este fenómeno se ha atribuido principalmente a la inestabilidad mostrada por las bicapas de fosfolípidos expuestas al aire, ya que aire es más hidrófobo que las soluciones acuosas, desestabilizando la bicapa.²⁴ De hecho, es bastante difícil obtener bicapas de fosfolípidos en aire, salvo que se tenga una humedad muy elevada en el ambiente.

4.2 Estudios de adhesión en películas DPPC:COL 1:1 LB mediante AFM

Durante el Trabajo Fin de Máster, se determinó la fuerza de adhesión entre la punta del AFM y las películas de DPPC:COL. con la finalidad de obtener información adicional sobre las características hidrofílicas o hidrofóbicas de la capa lipídica que está

expuesta a la interfase.^{28,29} En el caso de monocapas LB de DPPC:COL 1:1, se espera que la punta del AFM interactúe directamente con las cadenas hidrofóbicas del DPPC y del colesterol. Por el contrario, en el caso de una bicapa, la hipótesis de partida es que la punta interactuará con la parte hidrofílica del DPPC y COL. Por lo tanto, cabe esperar que la interacción punta-muestra tenga una magnitud diferente dependiendo de si la punta está en contacto con una monocapa, con una monocapa que incorpora sobre ella una capa superior incompleta o con una bicapa. Se han registrado mapas de adhesión asociados con la imagen topográfica en cada uno de estos casos, admitiendo, como se ha visto antes que a medida que aumenta el tiempo de inmersión de la monocapa en un medio líquido se va produciendo esa transición de monocapa a bicapa. Los resultados se ilustran en los histogramas mostrados en la Figura 11, donde se puede observar la distribución de los valores de adhesión correspondientes.^{29,30} El histograma azul, obtenido para un tiempo de inmersión de la película en un medio acuoso durante 20 minutos, es compatible con una situación intermedia entre la monocapa y una disposición incompleta de fosfolípidos inclinados que se encuentran formando una segunda capa. Este histograma muestra una distribución gaussiana con un valor máximo a 122 pN. Al avanzar el tiempo de exposición al medio líquido - histograma rojo, obtenido tras un tiempo de inmersión de 45 minutos, se aprecia claramente una distribución bimodal con dos máximos ubicados en 122 y 166 pN, que corresponden a las contribuciones de zonas de monocapa/capa superior incompleta (curva discontinua) y las regiones de bicapa (curva de puntos), respectivamente.

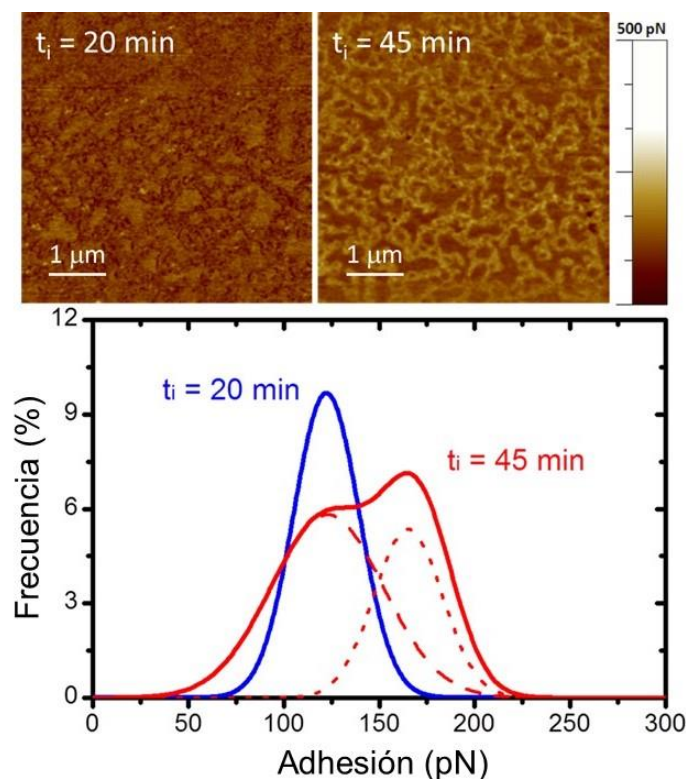


Figura 11. Imágenes de AFM en estudios de adhesión correspondientes a un escaneado de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ de DPPC:COL 1:1 en $50 \mu\text{L}$ de solución HEPES 10 mM (pH 7,4) para los tiempos de inmersión indicados: $t_i = 20 \text{ min}$ y $t_i = 45 \text{ min}$. Los histogramas de adhesión muestran una distribución gaussiana que corresponde principalmente a la monocapa (línea azul) y una distribución bimodal en el caso de la bicapa (línea roja). Esta última puede deconvolucionarse en dos contribuciones diferentes en 122 (línea discontinua) y 166 pN (línea punteada).

4.3 Estudio de reversibilidad de la monocapa DPPC:Colesterol 1:1 después del secado

Para estudiar qué es lo que ocurre una vez que se seca la muestra, se realizaron dos estudios idénticos, uno en disolución tampón HEPES 10 mM y otro en agua Milli-Q, obteniéndose resultados similares. Para ello se registraron imágenes de AFM, y tal como se puede observar en las Figuras 12 y 13, una vez se ha evaporado el medio líquido. La Figura 12, corresponde a la regeneración de una monocapa tras exponerla a HEPES con la consiguiente formación de la bicapa. La imagen muestra la presencia de cristales en la superficie procedentes de las sales que constituyen el tampón.

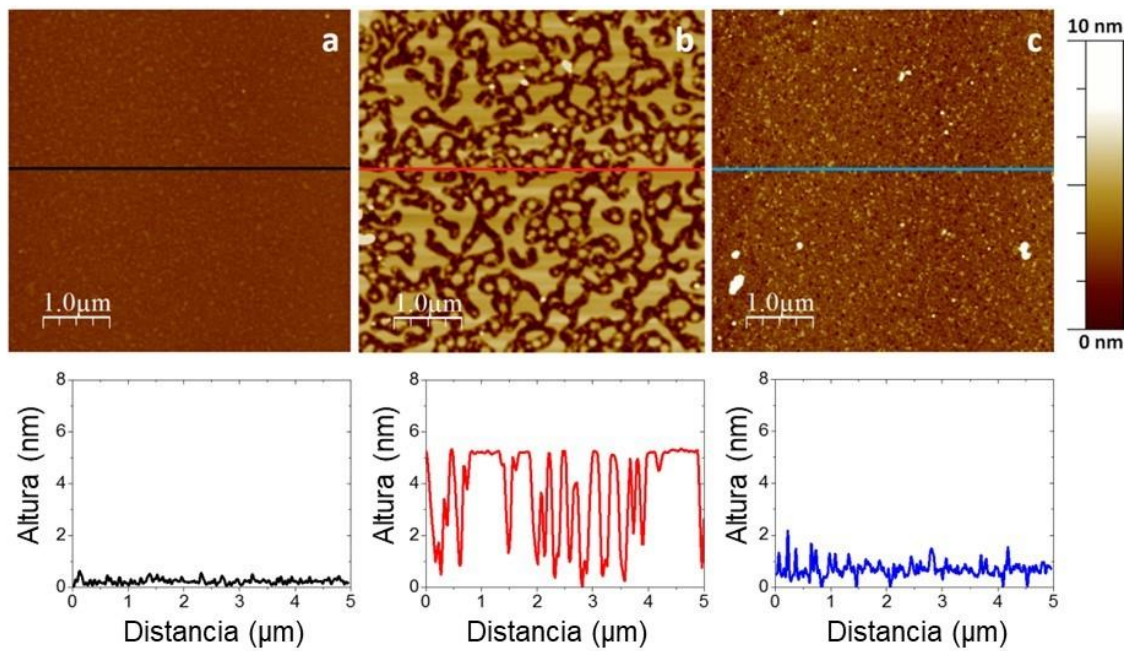


Figura 12. Imágenes topográficas de AFM correspondientes a: monocapa LB de DPPC:COL 1:1 inicial (a); bicapa formada después de 60 minutos de inmersión de la monocapa en una solución HEPES 10 mM (b); y la regeneración de una monocapa después de que el agua se evaporó de la bicapa (c). Además, se incluyen los perfiles de sección transversal correspondientes.

Para más claridad, en la Figura 13 se muestra la imagen AFM de una monocapa medida después de la evaporación del agua Milli-Q a temperatura ambiente y se compara con la de la monocapa inicial de DPPC:COL 1:1, observándose claramente que el proceso es reversible.

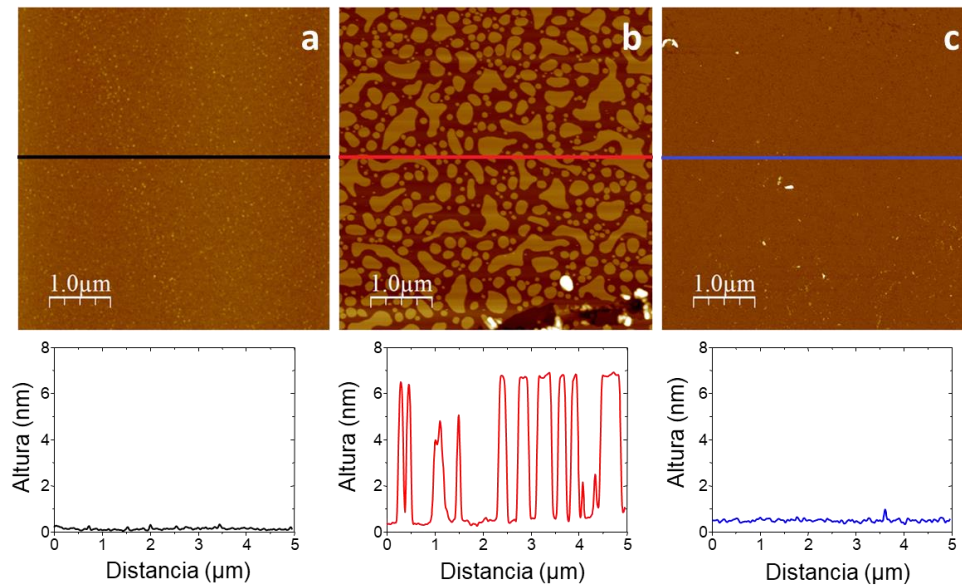


Figura 13. Imágenes topográficas de AFM correspondientes a una monocapa de DPPC:COL 1:1 inicial (a); la bicapa se formó después de 60 minutos de inmersión de la monocapa en agua pura (b); y regeneración de una monocapa una vez que el agua se ha evaporado(c). Además, se incluye la sección transversal para cada una de las imágenes de AFM.

Después del proceso de secado de la bicapa cabe destacar que se consigue restaurar las características topográficas iniciales correspondientes a la monocapa, obteniéndose películas de DPPC y COL, libres de defectos que cubren todo el sustrato de mica mostrando la misma densidad superficial que la monocapa inicial.

Además, si se analiza el valor de la raíz cuadrática media (RMS, acrónimo del inglés *root mean square*) de la rugosidad para la monocapa inicial ($0,07 \pm 0,01$ nm) y el valor de la RMS de la rugosidad para la monocapa reconstruida a partir la bicapa formada en agua Milli-Q ($0,12 \pm 0,02$ nm) se obtienen valores muy similares, observándose únicamente un pequeño aumento en la rugosidad de la película después de la reconstrucción de la monocapa.

En cambio, y como ya hemos mencionado, la monocapa obtenida después de la inmersión en HEPES 10 mM muestra cristales de sal que quedan después del proceso de evaporación del HEPES observándose algunos defectos como se puede ver en la Figura 12. La RMS de la rugosidad de las monocapas reconstruidas en HEPES es mayor ($0,21 \pm 0,04$ nm, teniendo en cuenta, además, que para obtener este dato de rugosidad se han excluido los cristales de sal más grandes) que los datos observados en monocapas restauradas a partir de agua pura Milli-Q.

4.4 Propiedades nanomecánicas de las películas de DPPC:COL 1:1 mediante estudios de curvas de Fuerza.

Se han determinado las propiedades nanomecánicas de las monocapas y bicapas de DPPC:COL 1:1 descritas anteriormente. Todo el estudio estadístico se llevó a cabo durante la realización de esta tesis doctoral, los resultados obtenidos en este capítulo difieren un poco de los resultados preliminares obtenidos en el Trabajo Fin de Máster debido a un incremento en el número de medidas realizadas y por lo tanto un mayor número de datos incluidos en la estadística. Para determinar las propiedades nanomecánicas de las películas, se ha utilizado la espectroscopia de fuerzas (AFM-FS) que permite cuantificar las propiedades elásticas de las membranas simuladas de fosfolípidos.^{31,32} Para más información del AFM consultar materiales y métodos-AFM. A través de las curvas AFM de distancia-fuerza registradas para las bicapas,^{17,33} es posible determinar la fuerza de ruptura de las películas^{17,31,34} por compresión mecánica con la punta del AFM. Esta fuerza de ruptura, en inglés *breakthrough force*, F_b , representa la máxima fuerza que estas membranas son capaces de soportar antes de que la punta del AFM las rompa. Por lo tanto, los valores obtenidos de F_b están relacionados por una parte con la fuerza de interacción lateral existente entre las moléculas vecinas, es decir, las

interacciones de van der Waals entre las cadenas alquílicas, y por otra parte con las interacciones atractivas entre los grupos polares.

Los valores de F_b dependen notablemente del pH, la temperatura, la fuerza iónica, la naturaleza del ión y la composición de la membrana. En particular, se ha descrito que un aumento en la proporción de colesterol en membranas fabricadas con fosfolípidos se traduce en valores de F_b más altos, tanto en la fase de líquido condensado como en las fases de líquido expandido.^{35,36}

En la Figura 14 se muestran las curvas de fuerza frente al desplazamiento del piezoeléctrico obtenidas para las películas LB de DPPC:COL 1:1. Estas medidas se realizaron a diferentes tiempos de inmersión, a los 5 minutos de poner la monocapa de DPPC:COL en contacto con el medio líquido, a los 20 minutos, cuando la bicapa está parcialmente formada y a los 60 minutos, cuando la bicapa de fosfolípidos está totalmente formada.

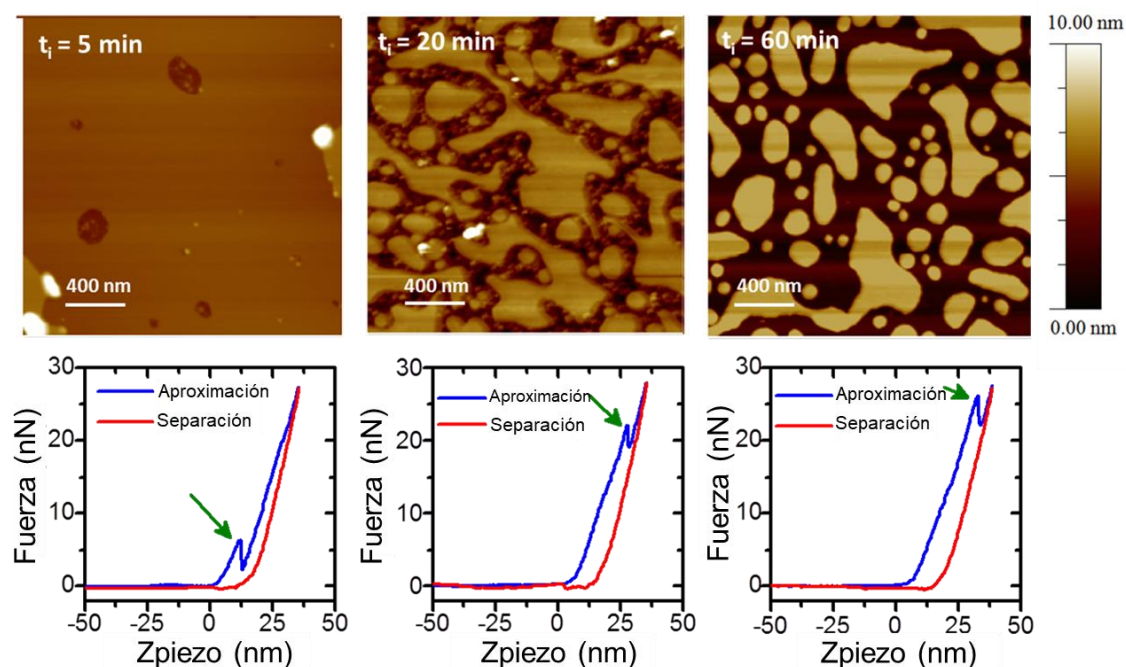


Figura 14. Arriba: imágenes de AFM $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ correspondientes a una película LB de DPPC:COL 1:1 en $50 \mu\text{L}$ de HEPES 10 mM (pH 7.4) para los tiempos de inmersión indicados.

Abajo: la fuerza frente al desplazamiento del piezoeléctrico. Las flechas verdes indican la F_b obtenida para cada caso.

Estas curvas se obtienen acercando a la muestra (línea azul) y retirando de ella (línea roja) la punta de AFM. Más información del AFM en materiales y métodos. La punta de AFM comienza a aproximarse a la película de DPPC:COL 1:1, correspondiente con la línea azul de la Figura 14, produciéndose un aumento en la fuerza registrada. La punta de AFM deforma elásticamente las capas lipídicas hasta que rompe dicha capa y esto se traduce en un salto brusco en la pendiente de la curva,³¹ este valor está marcado con una flecha verde en las gráficas y corresponde al valor de F_b . Además, la distancia de este salto que se observa en las curvas de fuerza, corresponde al espesor de la capa.^{16,37,38}

Para tiempos de inmersión por debajo de 5 min, el salto (marcado con la flecha verde en la Figura 14) observado en el gráfico de curva de fuerza ilustra la indentación a través de la monocapa mixta. Por el contrario, para tiempos de inmersión superiores a 5 min, las curvas de fuerza resultantes muestran el salto brusco en la pendiente de la curva a fuerzas más altas, lo que puede atribuirse a la ruptura sucesiva de la capa superior y la monocapa subyacente. Los valores de F_b dan como resultado cifras más altas a medida que aumenta el tiempo de inmersión como consecuencia del autoensamblaje progresivo de las moléculas de fosfolípidos y colesterol en una disposición más densa y compacta en la capa superior. En consecuencia, el aumento observado en los valores de F_b es la consecuencia de las mayores fuerzas laterales existentes entre las moléculas adyacentes. Este hecho es inequívocamente resultado de la incorporación gradual de una cantidad creciente de moléculas DPPC y COL a la segunda capa, por consiguiente, los dominios de bicapa se vuelven más densos y compactos a medida que aumenta el tiempo de inmersión. Por ello, la fuerza requerida para *indentar* las regiones de bicapa es mayor para tiempos de inmersión más grandes hasta el límite correspondiente a la transición

completa de monocapa a bicapa. Las curvas de fuerza-desplazamiento del piezoeléctrico para diferentes tiempos de inmersión se representan en la Figura 15. Hemos de matizar aquí que el término *indentar* no está admitido todavía por la Real Academia Española (RAE) pero es un anglicismo frecuentemente utilizado en español, equivalente a términos castellanos como hendidura o incisión.

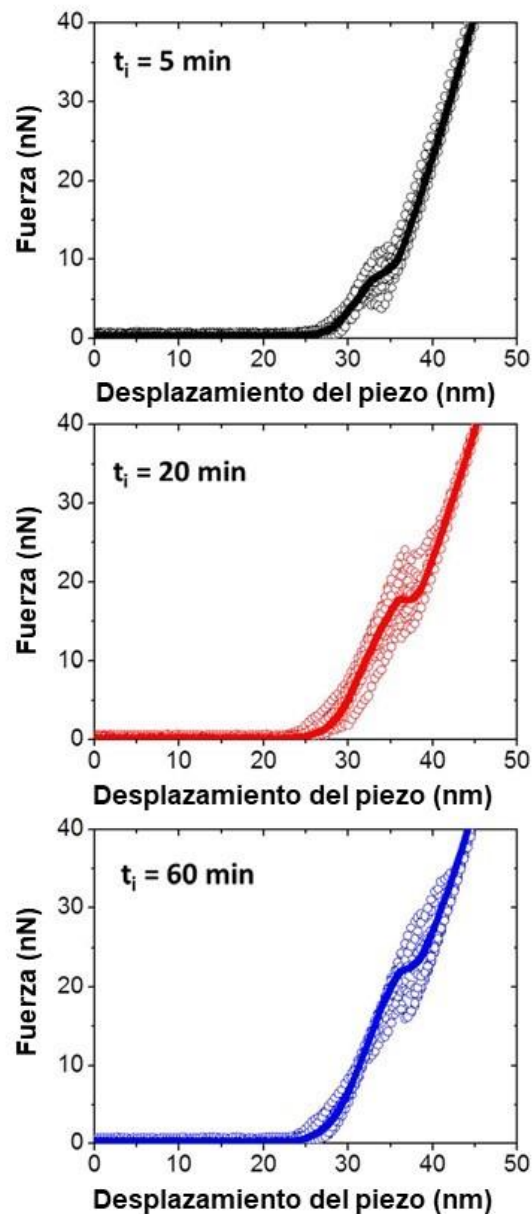


Figura 15. Representación de la fuerza frente al desplazamiento piezoeléctrico que muestra la distribución de valor de fuerza de indentación para los tiempos de inmersión

indicados en una disolución de HEPES 10 mM. Las curvas promedio obtenidas se representan en línea continua.

Al objeto de identificar las posibles diferencias en el comportamiento elástico atribuibles a diferentes niveles de densidad de empaquetamiento de la molécula, se realizó un estudio estadístico de los resultados obtenidos, tal y como se muestra en la Figura 16 y en la Tabla II. Cabe destacar que estos datos están en concordancia con los publicados previamente por Sanz y Asakawa^{35,36}, lo que indica que una bicapa de DPPC:COL formada a partir de una monocapa en contacto con una disolución de tampón HEPES 10 mM (pH 7,4) muestra propiedades nanomecánicas análogas a las bicapas de DPPC:COL obtenidas por otras técnicas de fabricación como fusión de vesículas, liposomas, *spin-coating*.^{31,32,36,39}

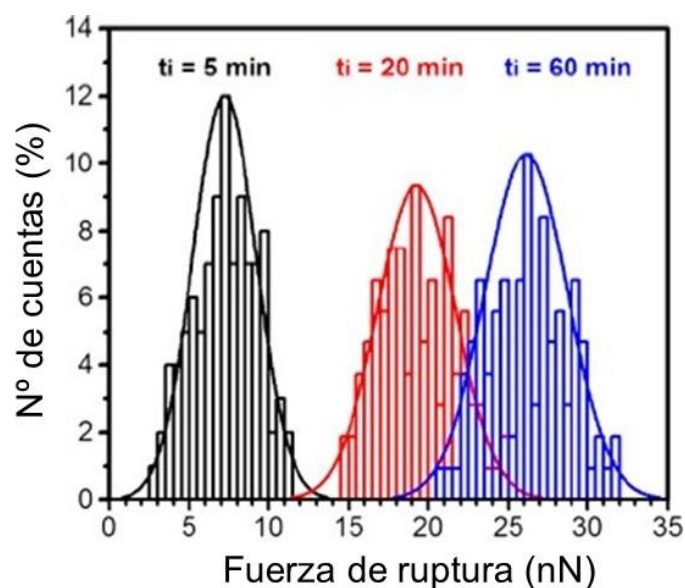


Figura 16. Histogramas que muestran la distribución del valor de la fuerza de ruptura (F_b) para $t_i = 5$ min (línea negra), $t_i = 20$ min (rojo) y $t_i = 60$ min (azul). Los ajustes gaussianos de los datos proporcionan un valor F_b promedio de $7,2 \pm 1,9$ nN para $t_i = 5$ min, $19,3 \pm 2,4$ nN para $t_i = 20$ min, y $26,1 \pm 2,6$ nN para $t_i = 60$ min.

Tabla II. Valores medios de la fuerza de ruptura F_b para una película LB de DPPC:COL 1:1 sobre mica para los tiempos de inmersión indicados en una disolución de tampón HEPES.

Tiempo de inmersión de la película LB DPPC:COL 1:1 en la disolución HEPES	Fuerza de ruptura (nN)
$t_i = 5 \text{ min}$	$7,2 \pm 1,9$
$t_i = 20 \text{ min}$	$19,3 \pm 2,4$
$t_i = 60 \text{ min}$	$26,1 \pm 2,6$

5. Conclusiones

Las conclusiones más relevantes que se pueden extraer de este capítulo sobre la fabricación y caracterización de modelos de membrana son:

La mezcla DPPC:COL 1:1 da lugar a monocapas de Langmuir-Blodgett soportadas sobre sustratos de mica muy homogéneas, que cubren completamente la superficie del sustrato (recubrimiento del 100%), y que tienen una rugosidad superficial muy baja (RMS de la rugosidad = $0,07 \pm 0,01 \text{ nm}$)

Cuando estas monocapas LB de DPPC:COL 1:1 se exponen a un medio líquido, tiene lugar la reorganización espontánea de las monocapa para generar una bicapa (recubrimiento superficial próximo al 50%).

La transición de una monocapa LB de DPPC:COL a bicapa es completamente reversible, es decir, una vez la bicapa se seca y se expone al aire se regenera la monocapa.

Este comportamiento abre el camino hacia la utilización de estas películas de DPPC:COL para su uso en modelos de membrana. Por un lado, la baja rugosidad de las mismas permite estudios de AFM muy detallados (obtención de imágenes de alta

resolución, estudios de interacciones con medicamentos, nanopartículas, etc.) Por otro lado, la reversibilidad del proceso de formación de monocapa a bicapa solo exponiendo la película al aire o a un medio acuoso permite utilizar este método para fabricar bicapas bien ordenadas, libres de defectos tridimensionales, que imitan la membrana celular de una manera sencilla.

6. Bibliografía

- (1) Jurak, M. Thermodynamic Aspects of Cholesterol Effect on Properties of Phospholipid Monolayers: Langmuir and Langmuir-Blodgett Monolayer Study. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117* (13), 3496–3502.
- (2) Wydro, P.; Knapczyk, S.; Łapczyńska, M. Variations in the Condensing Effect of Cholesterol on Saturated versus Unsaturated Phosphatidylcholines at Low and High Sterol Concentration. *Langmuir* **2011**, *27* (9), 5433–5444.
- (3) Haro, M.; Giner, B.; Lafuente, C.; López, M. C.; Royo, F. M.; Cea, P. Proton Sponge and Fatty Acid Interactions at the Air-Water Interface. Thermodynamic, Spectroscopic, and Microscopic Study. *Langmuir* **2005**, *21* (7), 2796–2803.
- (4) Schirmer, W. Physical Chemistry of Surfaces. *Zeitschrift für Phys. Chemie* **1999**, *210* (Part_1), 134–135.
- (5) Miyoshi, T.; Kato, S. Detailed Analysis of the Surface Area and Elasticity in the Saturated 1,2-Diacylphosphatidylcholine/Cholesterol Binary Monolayer System. *Langmuir* **2015**, *31* (33), 9086–9096.
- (6) Marsh, D. Lateral Pressure in Membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **1996**, *1286* (3), 183–223.
- (7) Ruiz-Rincón, S.; González-Orive, A.; De La Fuente, J. M.; Cea, P. Reversible

- Monolayer-Bilayer Transition in Supported Phospholipid LB Films under the Presence of Water: Morphological and Nanomechanical Behavior. *Langmuir* **2017**, *33* (30), 7538–7547.
- (8) Anariba, F.; DuVall, S. H.; McCreery, R. L. Mono- and Multilayer Formation by Diazonium Reduction on Carbon Surfaces Monitored with Atomic Force Microscopy “Scratching.” *Anal. Chem.* **2003**, *75* (15), 3837–3844.
- (9) Hane, F.; Moores, B.; Amrein, M.; Leonenko, Z. Effect of SP-C on Surface Potential Distribution in Pulmonary Surfactant: Atomic Force Microscopy and Kelvin Probe Force Microscopy Study. *Ultramicroscopy* **2009**, *109* (8), 968–973.
- (10) Tasumi, M.; Shimanouchi, T. Crystal Vibrations and Intermolecular Forces of Polymethylene Crystals. *J. Chem. Phys.* **1965**, *43* (4), 1245–1258.
- (11) McKean, D. C.; Biedermann, S.; Bürger, H. CH Bond Lengths and Strengths, Unperturbed CH Stretching Frequencies, from Partial Deuteration Infrared Studies: T-Butyl Compounds and Propane. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* **1974**, *30* (3), 845–857.
- (12) Goyena, R., Climate Change 2013 – The Physical Science Basis Working Group I Contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. *J. Chem. Inf. Model.* **2019**, *53* (9), 1689–1699.
- (13) Gericke, A.; Hühnerfuss, H. The Conformational Order and Headgroup Structure of Long-Chain Alkanoic Acid Ester Monolayers at the Air/Water Interface. *Berichte der Bunsengesellschaft für Phys. Chemie* **1995**, *99* (4), 641–650.
- (14) Ebeling, D.; Hölscher, H.; Fuchs, H.; Anczykowski, B.; Schwarz, U. D. Imaging of Biomaterials in Liquids: A Comparison between Conventional and Q-Controlled Amplitude Modulation (‘Tapping Mode’) Atomic Force Microscopy.

- Nanotechnology* **2006**, *17* (7), S221–S226.
- (15) Melzak, K. A.; Lázaro, G. R.; Hernández-Machado, A.; Pagonabarraga, I.; Cárdenas Díaz De Espada, J. M.; Toca-Herrera, J. L. AFM Measurements and Lipid Rearrangements: Evidence from Red Blood Cell Shape Changes. *Soft Matter* **2012**, *8* (29), 7716–7726.
- (16) 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. *Electrochim. Acta* **2006**, *51* (24), 5029–5036.
- (17) Garcia-Manyes, S.; Sanz, F. Nanomechanics of Lipid Bilayers by Force Spectroscopy with AFM: A Perspective. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2010**, *1798* (4), 741–749.
- (18) Kotulska, M.; Kubica, K. Structural and Energetic Model of the Mechanisms for Reduced Self-Diffusion in a Lipid Bilayer with Increasing Ionic Strength. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* **2005**, *72* (6), 1–6.
- (19) Aroti, A.; Leontidis, E.; Dubois, M.; Zemby, T. Effects of Monovalent Anions of the Hofmeister Series on DPPC Lipid Bilayers Part I: Swelling and in-Plane Equations of State. *Biophys. J.* **2007**, *93* (5), 1580–1590.
- (20) Xu, S.; Cruchon-Dupeyrat, S. J. N.; Garno, J. C.; Liu, G. Y.; Jennings, G. K.; Yong, T. H.; Laibinis, P. E. In Situ Studies of Thiol Self-Assembly on Gold from Solution Using Atomic Force Microscopy. *J. Chem. Phys.* **1998**, *108* (12), 5002–5012.
- (21) Weroński, K. J.; Cea, P.; Diez-Peréz, I.; Busquets, M. A.; Prat, J.; Girona, V. Time-Lapse Atomic Force Microscopy Observations of the Morphology, Growth Rate, and Spontaneous Alignment of Nanofibers Containing a Peptide-Amphiphile from the Hepatitis G Virus (NS3 Protein). *J. Phys. Chem. B* **2010**,

- 114 (1), 620–625.
- (22) Ivanov, G. R.; Polevska, Z. First Observation of 3D Aggregates in a Single-Component Langmuir Film below the Equilibrium Spreading Pressure. *MATEC Web Conf.* **2017**, 98, 8–11.
- (23) Czolkos, I.; Jesorka, A.; Orwar, O. Molecular Phospholipid Films on Solid Supports. *Soft Matter* **2011**, 7, 4562–4576.
- (24) Oberts, B. P.; Blanchard, G. J. Formation of Air-Stable Supported Lipid Monolayers and Bilayers. *Langmuir* **2009**, 25 (5), 2962–2970.
- (25) Kunze, A.; Sjövall, P.; Kasemo, B.; Svedhem, S. In Situ Preparation and Modification of Supported Lipid Layers by Lipid Transfer from Vesicles Studied by QCM-D and TOF-SIMS. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131 (7), 2450–2451.
- (26) Ryu, Y. S.; Wittenberg, N. J.; Suh, J. H.; Lee, S. W.; Sohn, Y.; Oh, S. H.; Parikh, A. N.; Lee, S. D. Continuity of Monolayer-Bilayer Junctions for Localization of Lipid Raft Microdomains in Model Membranes. *Sci. Rep.* **2016**, 6 (January), 1–11.
- (27) Dols-Perez, A.; Fumagalli, L.; Gomila, G. Structural and Nanomechanical Effects of Cholesterol in Binary and Ternary Spin-Coated Single Lipid Bilayers in Dry Conditions. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2014**, 116, 295–302.
- (28) Dufrêne, Y. F.; Martínez-Martín, D.; Medalsy, I.; Alsteens, D.; Müller, D. J. Multiparametric Imaging of Biological Systems by Force-Distance Curve-Based AFM. *Nat. Methods* **2013**, 10 (9), 847–854.
- (29) Berger, C. E. H.; van der Werf, K. O.; Kooyman, R. P. H.; de Grooth, B. G.; Greve, J. Functional Group Imaging by Adhesion AFM Applied to Lipid Monolayers. *Langmuir* **1995**, 11 (11), 4188–4192.
- (30) F. Dufrêne, Y.; Boland, T.; W. Schneider, J.; R. Barger, W.; U. Lee, G.

- Characterization of the Physical Properties of Model Biomembranes at the Nanometer Scale with the Atomic Force Microscope. *Faraday Discuss.* **1999**, *111* (0), 79–94.
- (31) 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. *Biophys. J.* **2005**, *89* (3), 1812–1826.
- (32) Asakawa, H.; Fukuma, T. The Molecular-Scale Arrangement and Mechanical Strength of Phospholipid/Cholesterol Mixed Bilayers Investigated by Frequency Modulation Atomic Force Microscopy in Liquid. *Nanotechnology* **2009**, *20* (26), 264008.
- (33) Redondo-Morata, L.; Oncins, G.; Sanz, F. Force Spectroscopy Reveals the Effect of Different Ions in the Nanomechanical Behavior of Phospholipid Model Membranes: The Case of Potassium Cation. *Biophys. J.* **2012**, *102* (1), 66–74.
- (34) Dols-Perez, A.; Fumagalli, L.; Simonsen, A. C.; Gomila, G. Ultrathin Spin-Coated Dioleoylphosphatidylcholine Lipid Layers in Dry Conditions: A Combined Atomic Force Microscopy and Nanomechanical Study. *Langmuir* **2011**, *27* (21), 13165–13172.
- (35) Redondo-Morata, L.; Giannotti, M. I.; Sanz, F. Influence of Cholesterol on the Phase Transition of Lipid Bilayers: A Temperature-Controlled Force Spectroscopy Study. *Langmuir* **2012**, *28* (35), 12851–12860.
- (36) Garcia-Manyes, S.; Redondo-Morata, L.; Oncins, G.; Sanz, F. Nanomechanics of Lipid Bilayers: Heads or Tails? *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (37), 12874–12886.
- (37) Schneider, J.; Dufrêne, Y. F.; Barger, W. R.; Lee, G. U. Atomic Force Microscope Image Contrast Mechanisms on Supported Lipid Bilayers. *Biophys. J.* **2000**, *79* (2), 1107–1118.

- (38) Matyszewska, D.; Bilewicz, R.; Su, Z.; Abbasi, F.; Leitch, J. J.; Lipkowski, J. PM-IRRAS Studies of DMPC Bilayers Supported on Au(111) Electrodes Modified with Hydrophilic Monolayers of Thioglucose. *Langmuir* **2016**, *32* (7), 1791–1798.
- (39) Verma, A.; Stellacci, F. Effect of Surface Properties on Nanoparticle-Cell Interactions. *Small* **2010**, *6* (1), 12–21.

Capítulo 3.

**Estudio termodinámico y microscópico
(AFM) de mezclas binarias y ternarias
del DPPC y Colesterol con
Glicosfingolípidos.**

1. Introducción

Las membranas celulares están conformadas por una variedad de lípidos, colesterol, proteínas etc. Estas mezclas multicomponentes resultan en zonas que se manifiestan por una separación de fases con formación de microdominios, también llamados balsas lipídicas; estos dominios pueden tener un tamaño de entre 4 y 700 nm.¹⁻⁴ Por esa razón es relevante desde el punto de vista científico realizar un estudio termodinámico de las mezclas de compuestos constituyentes de las membranas para así alcanzar una mejor comprensión de la estructura, morfología y distribución de los componentes que presentan las membranas lipídicas.

La preparación de membranas celulares simuladas integradas por fosfolípidos y colesterol en este capítulo se ha llevado a cabo por medio de la técnica de Langmuir-Blodgett (LB) que, como ya hemos indicado previamente, consiste en la transferencia de monocapas organizadas (películas de Langmuir) de moléculas anfifílicas (moléculas que constan de una parte hidrófila e hidrófoba) desde la interfase aire-agua a un sustrato sólido.⁵

La técnica más usada para la caracterización de la monocapa de Langmuir es la isoterma de presión superficial frente al área por molécula. La obtención de la isoterma se realiza comprimiendo de manera lenta y continua la monocapa mientras se registra la presión superficial. Este estudio proporciona información sobre las diferentes fases de la monocapa, transiciones de fase, formación de colapsos locales, colapso de la monocapa, así como la existencia de interacciones entre las especies presentes en la subfase con el material constituyente de la monocapa. (Explicación de cada una de las fases en el capítulo materiales y métodos-Langmuir-Blodgett). Además, estas isotermas proporcionan información sobre la estabilidad de la monocapa o de su comportamiento

dinámico en la interfase aire-agua, entre otras,⁶ mediante el registro de variaciones de presión a área constante, o variaciones en el área por molécula a presión constante etc.

A lo largo de este capítulo se van a estudiar monocapas mixtas, es decir, que están integradas por más de un componente. Para discernir la miscibilidad de estos componentes se va a estudiar las presiones termodinámicas de exceso de las distintas mezclas. Por lo tanto, como la presión de colapso es característica de cada material. Defay y Crisp⁷ aplicaron la regla de las fases al colapso de la monocapa para establecer un criterio que permita establecer la miscibilidad o inmiscibilidad de los componentes en una película mixta. En concreto, la regla de las fases aplicada a un sistema multicomponente en superficie indica que el número de grados de libertad, f , para el sistema (monocapa) viene dado por la expresión:

$$f = C^B + C^S - P^B - P^S + 1 \quad (\text{Ec. 1})$$

donde C_B es el número de componentes en el sistema (“bulk”), C_S es el número de componentes en la superficie, P_B es el número de fases en equilibrio, y P_S es el número de fases superficiales presentes en el equilibrio. A temperatura y presión atmosférica constantes, y en ausencia de potenciales eléctricos externos, esto quiere decir que si los compuestos son miscibles hay un grado de libertad en el sistema, $f=1$, y se espera un colapso intermedio en relación con los componentes puros; al contrario, si son inmiscibles se dará un primer colapso, coincidente con la presión de colapso más baja de los componentes en la mezcla.⁸

Por otra parte, la naturaleza de las interacciones moleculares y la miscibilidad de los dos componentes pueden examinarse mediante un análisis cuantitativo del área de exceso (A^E) de la monocapa mixta en la interfase aire-agua.⁸⁻¹⁰ El área de exceso puede obtenerse a partir del área promedio por molécula (A_{12}) de una monocapa mixta que

consta de los componentes 1 y 2 y el área por molécula correspondiente a una monocapa mixta ideal (A_{ideal}):¹¹

$$A^{ideal} = \sum_i X_i \cdot A_i \quad (Ec.2)$$

$$A^E = A_m - A^{ideal} \quad (Ec.3)$$

donde X_i es la fracción del componente i en la mezcla, A_i es el área del componente i en una monocapa pura del componente i y A_m representa el área por molécula promedio en la monocapa mixta. En el caso de monocapas mixtas integradas por componentes completamente inmiscibles, el área de exceso será cero. También será cero el área de exceso de una monocapa mixta con componentes totalmente miscibles. Valores de áreas de exceso distintas de cero son indicativas de una mezcla no ideal donde se dan interacciones repulsivas (áreas de exceso positivas) o atractivas (áreas de exceso negativas).^{12,13} Además, cualquier desviación sea positiva o negativa, de la idealidad, implica una energía libre de exceso superficial de la mezcla, ΔG_m^E , que representa la energía asociada al proceso de mezcla de los componentes en la monocapa.^{8,11} Esta energía libre de exceso del proceso de mezcla, a una temperatura T y una presión superficial π , viene dada por:

$$\Delta G_m^E = \int_0^\pi (A_m - \sum_i X_i \cdot A_i) d\pi \quad (Ec.4)$$

Además, teniendo en cuenta la definición de la energía libre de mezcla ideal:

$$\Delta G_m^{ideal} = RT \left(\sum_i X_i \cdot \ln X_i \right) \quad (Ec.5)$$

Puede determinarse la energía libre de mezcla, ΔG_m , que proporciona información sobre las interacciones de los componentes en la mezcla y la estabilidad de las películas mixtas. Así la energía libre de mezcla se define como:

$$\Delta G_m = \Delta G_m^E + \Delta G_m^{ideal} \quad (\text{Ec.6})$$

Valores negativos de energía libre de mezcla indican la presencia de interacciones intermoleculares atractivas. Cuando se representa la gráfica del valor de energía libre de mezcla frente a la fracción molar del compuesto, la existencia de un mínimo indica que en este punto de la composición de la mezcla será más estable termodinámicamente en comparación a los componentes puros.¹²

En el caso de sistemas más sensibles a la presión superficial que al área se suele llevar a cabo un análisis de la energía Helmholtz de exceso de mezcla:^{8,13}

$$\Delta A_m^E = \int_A^{A_0} \pi_{12} dA - \sum_i X_i \cdot \int_A^{A_0} \pi_i dA \quad (\text{Ec.7})$$

$$\Delta A_m^{ideal} = RT \left(\sum_i X_i \cdot \ln X_i \right) \quad (\text{Ec.8})$$

$$\Delta A_m = \Delta A_m^E + \Delta A_m^{ideal} \quad (\text{Ec.9})$$

donde A_0 es el área donde la presión superficial empieza a aumentar en la isoterma (el conocido como “*take-off*”) y A es el área molecular para la que se va a determinar la energía de Helmholtz.

La ventaja de utilizar la técnica LB en vez de otras técnicas como autoensamblaje entre otras¹⁴ es la posibilidad de controlar los parámetros adecuados para reproducir las condiciones biológicas necesarias.⁵ La naturaleza anfifílica de los compuestos usados en la síntesis de la membrana permiten la organización y unión de los fosfolípidos con el colesterol. Los estudios de monocapas mixtas formadas por la mezcla fosfolípidos y colesterol en la interfase aire-agua indican que el colesterol tiene un pronunciado efecto de condensación,¹⁵ reduce el número de defectos, aumenta la densidad de

empaquetamiento de la monocapa^{16,17} y modula la fluidez de la membrana celular y aumenta el orden estructural de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos.¹⁶

Las membranas celulares simuladas tienen la ventaja de permitir un estudio detallado, dado que existe control de cada uno de los componentes que forman la membrana, se puede garantizar una reproducibilidad de la misma y es posible su inmovilización sobre soportes sólidos uniformes y poco rugosos como la mica y poder caracterizarlo de una manera más sencilla a través de la microscopía de fuerza atómica (AFM), tal y como se ha utilizado en capítulos anteriores, ya que proporciona imágenes de alta resolución de superficies mostrando en este caso las nanoestructuras de las monocapas formadas.¹⁷

2. Resultados y discusión

Se han preparado mezclas de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC) y Colesterol (COL) con dos glicosfingolípidos, que se van a abreviar como GSL, el monosacárido del GSL es una β -D-glucosa, que o bien contiene un grupo OH o un grupo azida en el carbono 6 del anillo de la glucosa; en adelante, al que tiene el grupo OH, se va a llamar GSL2 y al que tiene el grupo azida N_3 , GSL4. En la Figura 1 se pueden observar sus estructuras.

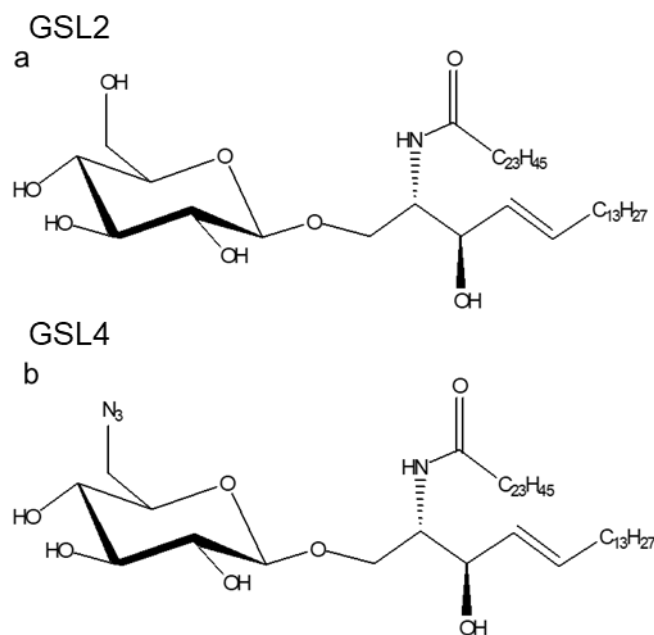


Figura 1. Estructura de los glicosfingolípidos (GSLs) estudiados en este capítulo. La diferencia entre ambos es que el GSL2 (a) tiene un grupo OH en el C-6 del carbohidrato, en cambio el GSL4 (b) tiene un grupo azida N₃.

Se registraron las isotermas presión superficial (π) - área por molécula (A) para los componentes puros y las mezclas. Además, las monocapas se caracterizaron por Microscopia de Ángulo de Brewster (BAM) que aporta información complementaria al estudio de las monocapas en la interfase aire-agua a medida que la película se va comprimiendo. El BAM va mostrando un análisis morfológico de la monocapa, en función de la reflexión de un haz de luz p-polarizada. Para poder interpretar estas imágenes hay que tener en cuenta que cuando no hay material, la imagen se ve completamente oscura (se hace incidir luz p-polarizada con un ángulo de 54°, para el que no se da la reflexión de la luz), y al formarse la película sobre el agua, se modifica el valor del índice de refracción de la superficie acuosa de modo que, al no modificar el ángulo de incidencia, la condición de ángulo Brewster deja de cumplirse). Entonces, se produce la reflexión de la luz y pueden registrarse imágenes de la monocapa que se tornan más claras y compactas a medida que se comprimen las barreras.¹⁸

Como se puede apreciar, en la Figura 2 y 3, se muestra la isoterma presión superficial frente al área por molécula de los componentes puros GSL2 y GSL4, respectivamente, y donde se muestran también las imágenes del BAM a las presiones superficiales indicadas. Para visualizar el conjunto de imágenes obtenidas se puede ver un vídeo escaneando el código QR que aparece en la parte inferior de las Figuras 2 y 3.

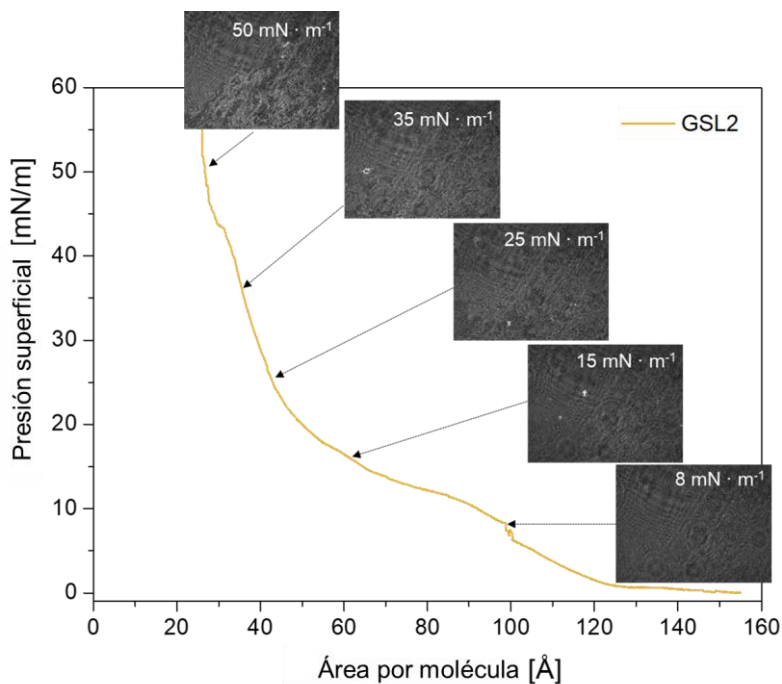


Figura 2. Isotherma presión superficial versus área por molécula e imágenes de microscopía de ángulo de Brewster (BAM) de la película GSL2 en agua a 20 °C. Las imágenes BAM corresponden a presiones superficiales de 8, 15, 25, 35 y 50 mN · m⁻¹. En la parte inferior se muestra el código QR donde se puede observar todas las imágenes del BAM desde el inicio de la isoterma hasta su presión de colapso.

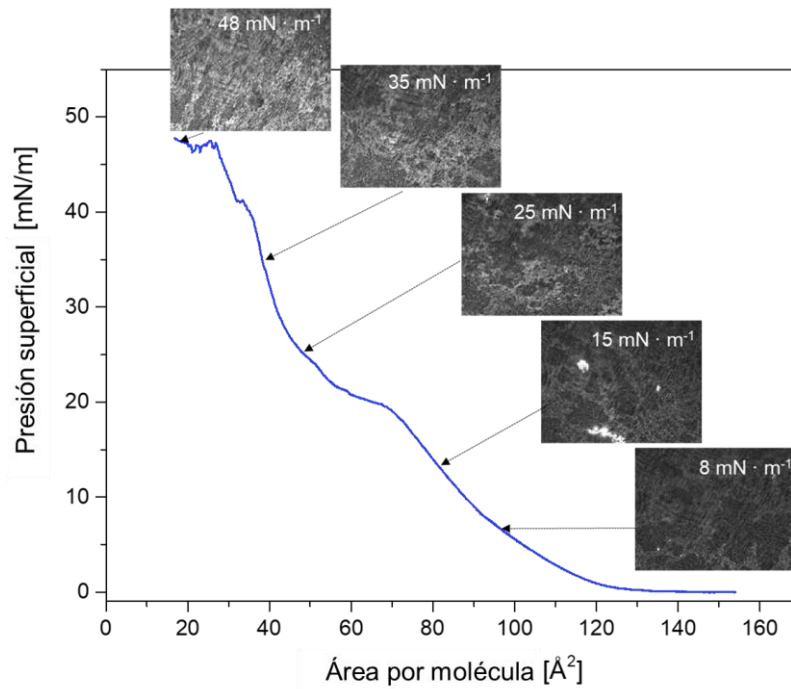


Figura 3. Isotherma presión superficial versus área por molécula e imágenes de microscopía de ángulo de Brewster (BAM) de la película GSL4 en agua a 20 °C. Las imágenes BAM corresponden a presiones superficiales de 8, 15, 25, 35 y 50 mN · m⁻¹. En la parte inferior se muestra el código QR donde se puede observar todas las imágenes del BAM desde el inicio de la isoterma hasta su presión de colapso.

Respecto a las isothermas mostradas en las Figura 2 y 3, se evidencia una reducción del área por molécula a medida que la presión aumenta hasta alcanzarse el colapso, tanto para el GSL2 como para el GSL4. Por encima de esta presión de colapso se formarán multicapas.

Cabe destacar que el estudio de la mezcla binaria DPPC-COL ha sido presentado en el Capítulo 3 (Preparación y caracterización de membranas celulares simuladas).

A continuación, en la Figura 4. se muestran las isothermas π -A de las mezclas DPPC-GSL2, DPPC-GSL4 y COL-GSL2, COL-GSL4 a las fracciones molares del glicosfingolípidos correspondientes a $\chi = 0,2$, $\chi = 0,4$, $\chi = 0,6$, y $\chi = 0,8$ así como las correspondientes a los compuestos puros.

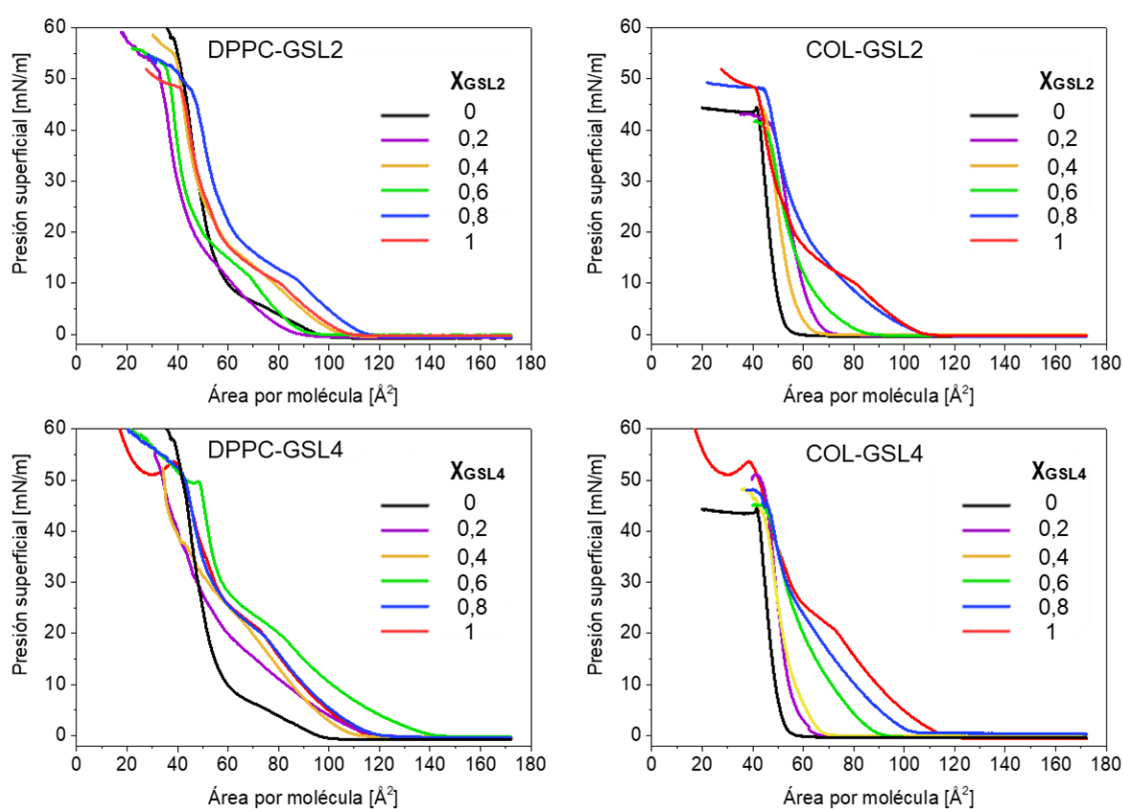


Figura 4. Isothermas de presión superficial-área por molécula (π -A) para mezclas binarias de *GSL2-DPPC*; *GSL2-COL*; *GSL4-DPPC*; *GSL4-COL*

La Figura 5 muestra los valores experimentales del área de exceso en función de la fracción molar a las presiones superficiales indicadas. Como se ha indicado antes, para monocapas mixtas totalmente inmiscibles o totalmente miscibles, el área en exceso es cero, mientras que las desviaciones positivas indican algún tipo de interacción repulsiva

entre los compuestos y las desviaciones negativas sugieren una interacción de atracción de los componentes que a su vez conduce a una disminución del área molecular media en las películas mixtas en comparación con las películas de los componentes puros.¹¹

Se evidencia que en el sistema GSL2-DPPC las áreas de exceso muestran una forma sigmoïdal con dos mínimos y un máximo. Esta forma es claramente indicativa de desviaciones de la idealidad y de la formación de dos fases diferentes; una rica de las fases es rica en DPPC (llamémosle fase α , que abarca desde fracciones molares $\chi_{\text{GLS2}} = 0$ hasta fracciones molares $\chi_{\text{GLS2}} \approx 0,4$) y la otra rica en GLS2 (llamémosle fase β , que abarca desde $\chi_{\text{GLS2}} \approx 0,4$ hasta fracciones molares $\chi_{\text{GLS2}}=1$). A presiones superficiales bajas las áreas de exceso alcanzan valores positivos con valores ligeramente negativos en las zonas próximas a los mínimos ($\chi_{\text{GLS2}} \approx 0,2$ y $\chi_{\text{GLS2}} \approx 0,8$). A medida que aumenta la presión superficial, las áreas de exceso toman valores menos positivos o incluso negativos, indicativo de interacciones atractivas entre los componentes. Así, las curvas correspondientes a las presiones de $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ y $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ se diferencian poco entre sí y el área de exceso a estas presiones para cualquier fracción molar es negativa.

Para las mezclas GSL4-DPPC a presiones relativamente bajas (por debajo de los $15 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ las curvas presentan dos máximos y un mínimo. Estas curvas vuelven a ser características de la formación de dos fases, cada una de ellas rica en uno de los componentes y los valores positivos denotan interacciones repulsivas entre los componentes. En cambio, a presiones más altas, aparece sólo un máximo y las áreas de exceso disminuyen en valor absoluto e incluso se hacen negativas a presiones altas ($30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ y $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$).

Si bien en las dos mezclas fosfolípido-glicoesfingolípido las áreas de exceso son positivas (interacciones repulsivas entre los componentes) a presiones bajas y se van

haciendo gradualmente menos positivas e incluso negativas (interacciones atractivas) a presiones altas, en los sistemas binarios de colesterol-glicosfingolípido, el efecto observado es el contrario, es decir, áreas de exceso negativas a presiones bajas (interacciones atractivas) y áreas de exceso menos negativas o ligeramente positivas a presiones más altas. La forma sigmoidal de las áreas de exceso, en particular en el sistema GSL2-COL vuelve a ser indicativa de separación de fases.

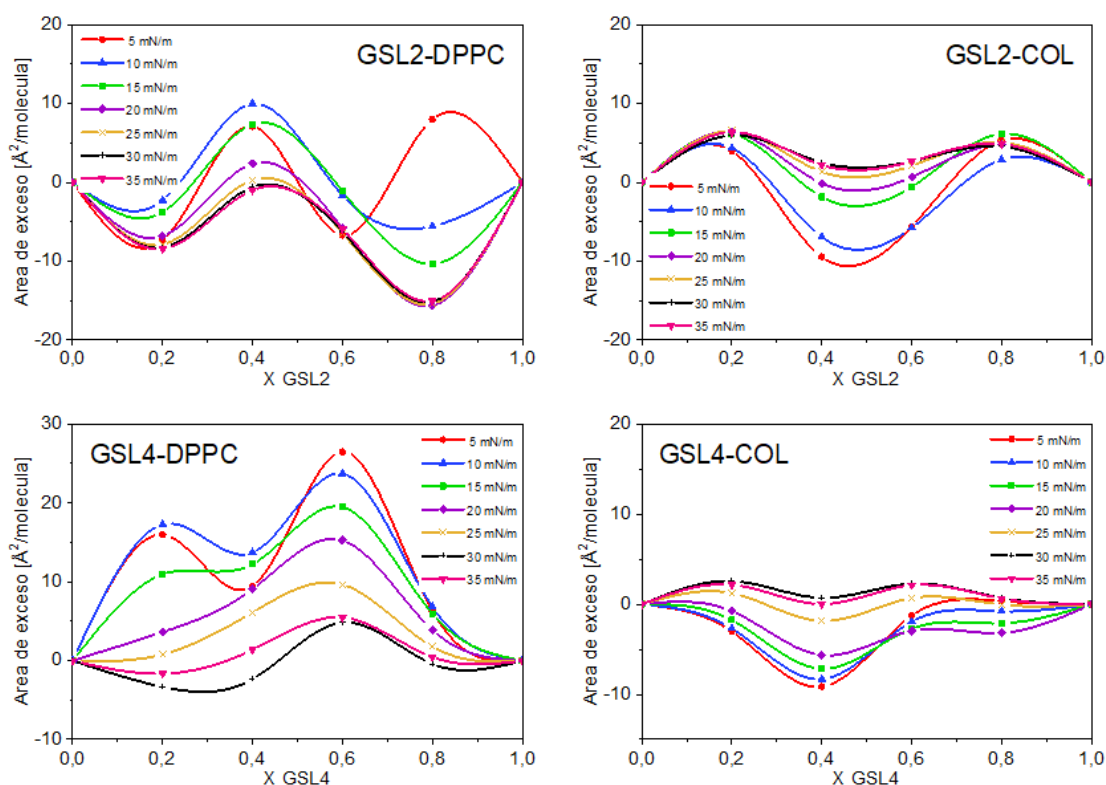


Figura 5. Área de exceso versus fracción molar para películas mixtas de GSL2-DPPC; GSL2-COL; GSL4-DPPC; GSL4-COL a las presiones superficiales indicadas.

Para aportar más información sobre la miscibilidad de las mezclas estudiadas, se calculó la energía libre de Gibbs de exceso de la mezcla (ΔG_m^E). En la Figura 6 se muestran los valores de la energía libre de Gibbs de exceso de los sistemas binarios frente

a la fracción molar a diferentes presiones superficiales: 5 mN·m⁻¹, 10 mN·m⁻¹, 15 mN·m⁻¹, 20 mN·m⁻¹, 25 mN·m⁻¹, 30 mN·m⁻¹, 35 mN·m⁻¹.

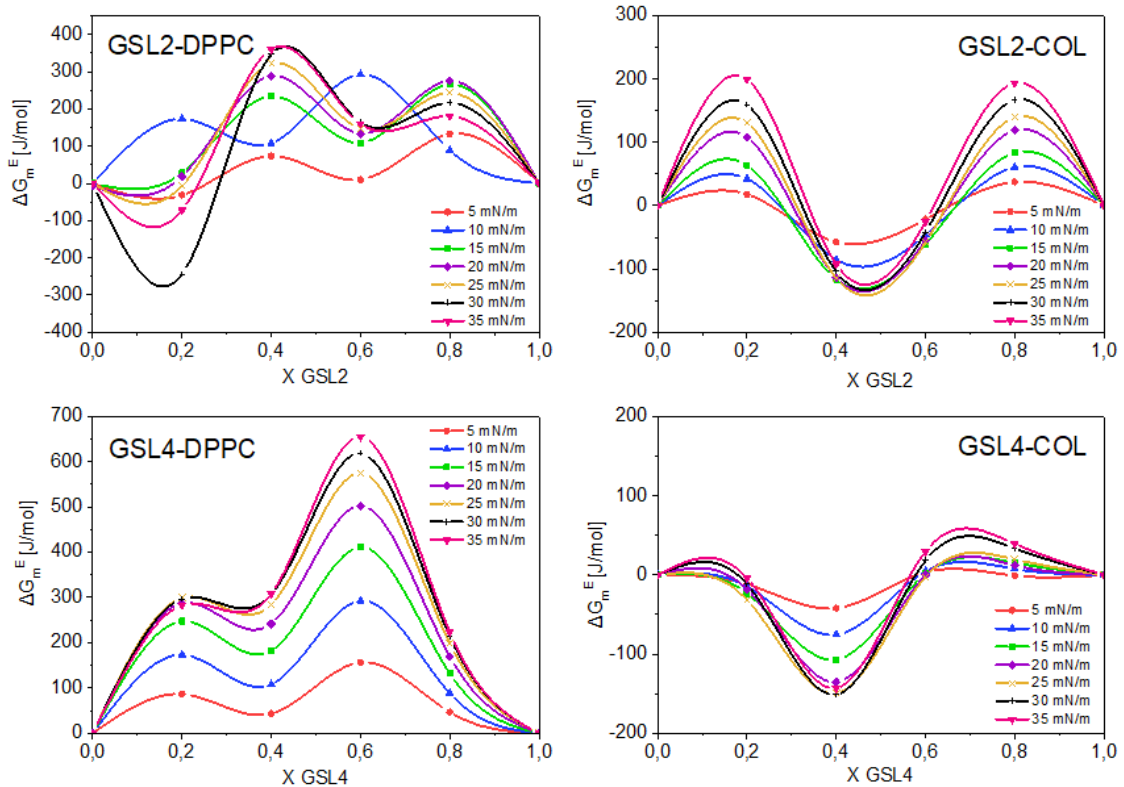


Figura 6. Energía libre de Gibbs de exceso de mezcla versus fracción molar para películas mixtas de GSL2-DPPC; GSL2-COL; GSL4- DPPC; GSL4-COL

El valor de ΔG_m^E más negativo se obtuvo para el sistema GSL2-DPPC correspondiente a una fracción molar de 0,2 para el GSL2 ($\chi_{GSL2} = 0,2$) y presión superficial de 30 mN·m⁻¹, siendo esta la interacción atractiva más fuerte. En general, para el sistema GSL2-DPPC los valores de ΔG_m^E más bajos se obtienen en esa fracción molar, indicando que es, desde el punto de vista termodinámico la más estable. Para la mezcla de GSL2-COL los puntos más negativos se dan en cercanías a $\chi_{GSL2} = 0,45$ y tiende a ser más positivos cuando se aumenta la presión. Los valores de ΔG_m^E de las mezclas binarias de GSL4-DPPC son positivos para todas las fracciones molares y en todas las presiones

lo que indica formación de películas inestables y disposición poco favorable. Para las monocapas de GSL4-COL se tienen valores negativos a $\chi_{\text{GSL4}} = 0,4$ para todas las presiones, evidenciando más estabilidad en toda su composición respecto a las monocapas GSL2-COL. Se concluye que las interacciones atractivas de los GSL con el DPPC son más débiles que las de los GSL con el COL.

La energía de Helmholtz resulta ser una magnitud más adecuada para la obtener información sobre interacciones moleculares y estabilidad de las películas en aquellos sistemas más sensibles a las variaciones de la presión que a las variaciones del área.^{8,19} En la Figura 7 se muestra la variación de ΔA_m^E frente a las diferentes fracciones molares $\chi=0,2$, $\chi=0,4$, $\chi=0,6$, $\chi=0,8$, a las áreas por molécula indicadas de $40 \text{ \AA}^2 \cdot \text{molécula}^{-1}$, $50 \text{ \AA}^2 \cdot \text{molécula}^{-1}$, $60 \text{ \AA}^2 \cdot \text{molécula}^{-1}$, $70 \text{ \AA}^2 \cdot \text{molécula}^{-1}$, $80 \text{ \AA}^2 \cdot \text{molécula}^{-1}$, y $90 \text{ \AA}^2 \cdot \text{molécula}^{-1}$. Estas gráficas muestran valores negativos para las películas GSL2-DPPC para la fracción molar correspondiente a $\chi_{\text{GSL2}} = 0,2$ y $\chi_{\text{GSL2}} = 0,6$. Se observa como los valores se vuelven más negativos a áreas moleculares más pequeñas lo que sugiere que la estabilidad de las películas mixtas aumenta a medida que las monocapas se condensan más. Para la mezcla de GSL2-COL solo se obtienen valores de energía de Helmholtz negativos para fracciones molares cercanas a $\chi_{\text{GSL2}} = 0,2$ y $60 \text{ \AA}^2 \cdot \text{molécula}^{-1}$ y en la mezcla de GSL4-DPPC para fracciones menores a $\chi_{\text{GSL4}} = 0,1$ y $90 \text{ \AA}^2 \cdot \text{molécula}^{-1}$. Finalmente, los valores negativos de la película de GSL4-COL se muestran para áreas moleculares mayores de $50 \text{ \AA}^2 \cdot \text{molécula}^{-1}$ en toda su composición.

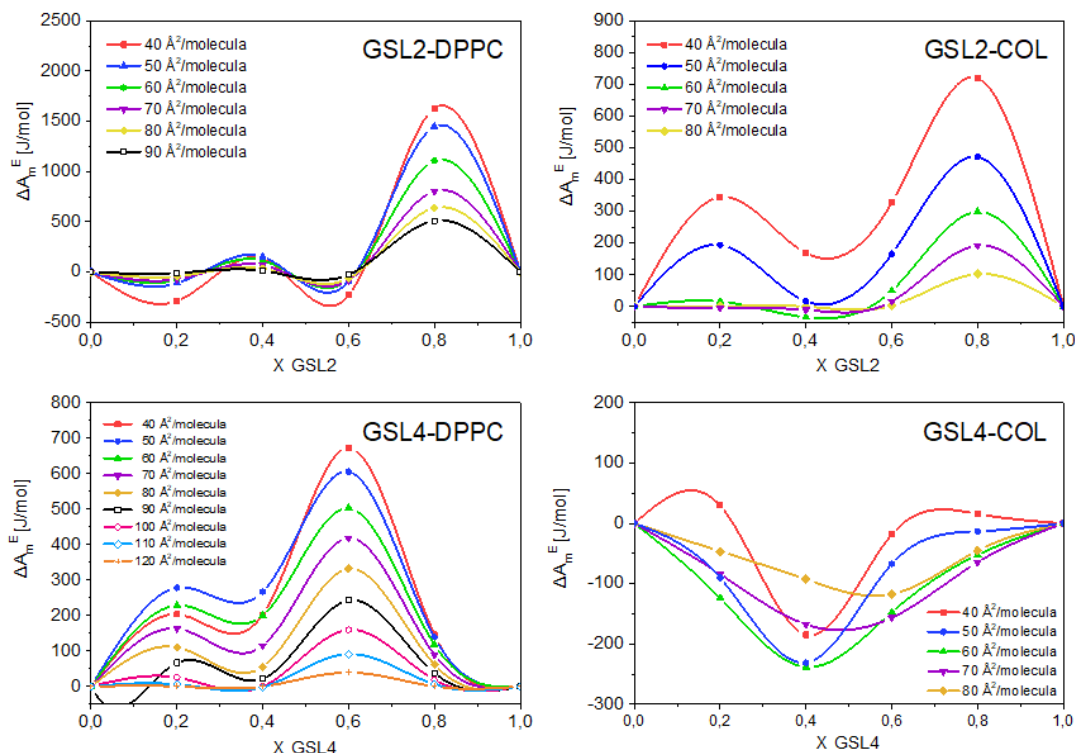


Figura 7. Energía de Helmholtz versus fracción molar para monocapas mixtas de GSL2-DPPC; GSL2-COL; GSL4-DPPC; GSL4-COL

Todas las propiedades anteriores se han calculado a partir de los datos obtenidos de las isothermas presión superficial frente área por molécula (π -A). Dado que es posible la inmovilización de estas mezclas sobre soportes sólidos como la mica, estos sistemas se pueden caracterizar mediante la microscopia de fuerza atómica (AFM) y proporcionar información adicional del comportamiento de estas películas mixtas.

2.1 Caracterización topográfica de las mezclas binarias y ternarias mediante AFM.

Se realizó la transferencia de los GSL puros, de las mezclas binarias GSL-DPPC y GSL-COL a diferentes fracciones molares, y de las mezclas ternarias GSL-DPPC-COL, tanto del GSL2 como del GSL4. Debe indicarse que la situación de las películas de Langmuir en la interfase aire-agua y la de las películas transferidas no tiene que ser

necesariamente la misma, en el sentido de que al transferir ponemos en juego la interacción de las moléculas con el sustrato y en función de la presión de transferencia es posible la formación de colapsos, agregados locales o un comportamiento termodinámico de mezcla distinto al de las monocapas en la superficie del agua. En la Figura 8 se muestran las imágenes topográficas de AFM del GSL2 puro a las presiones indicadas de $8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ y $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Se observa como a presiones de transferencia bajas ($8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) se obtiene una película homogénea. Al aumentar la presión hasta los $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ se observan dominios con una altura de unos 4 nm respecto a la película homogénea que se aprecia en el fondo de la imagen. Esta altura sería compatible con la formación de una monocapa del glicosfíngolípido sobre la monocapa inicial, es decir, la formación de dominios integrados por bicapas debido a colapsos locales y controlados de la película. A presiones de $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ se forman agregados tridimensionales de forma redondeada que, por su altura (de hasta 40 nm), parecen ser multicapas (aunque no podemos descartar completamente la formación de vesículas).

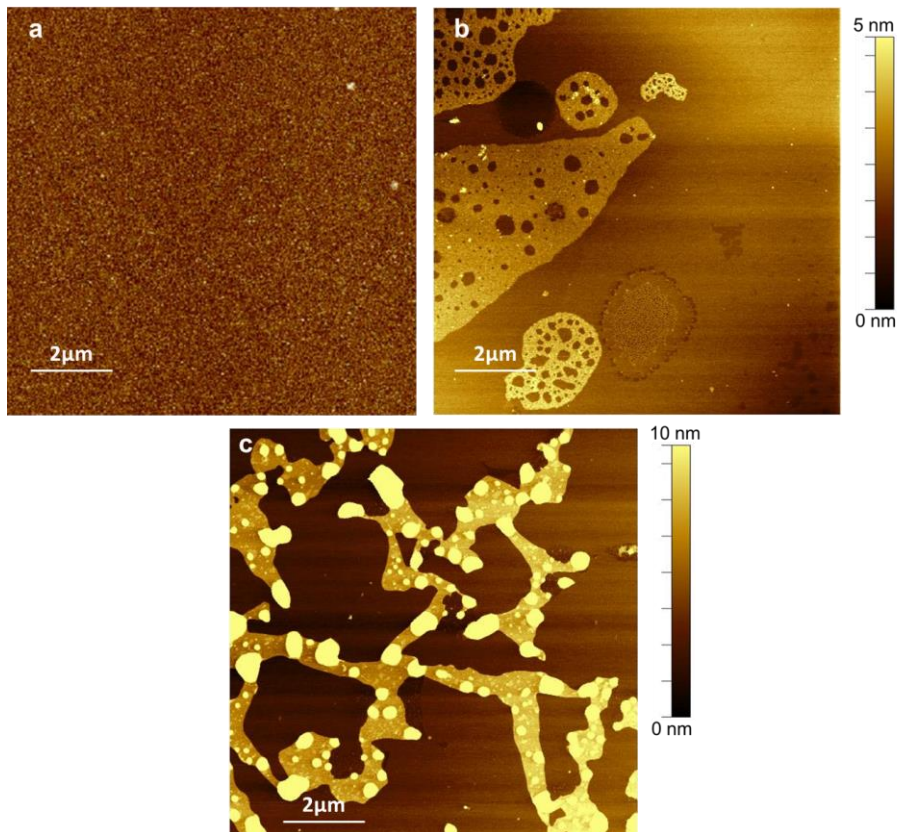


Figura 8. Película de GSL2 puro transferido a presiones de (a) $8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (b) $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (c) $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$

Las imágenes topográficas de AFM del GSL4 puro a las mismas presiones de $8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ y $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, mostradas en la Figura 9 se observa un comportamiento relativamente similar al GSL2, con la formación de películas bastante homogéneas a presiones bajas ($8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$), aunque a esta presión para el GLS4 se ven zonas de menor altura que indican que la monocapa homogénea se obtendría a presiones de transferencia ligeramente superiores. A presiones de transferencia más altas también se aprecia la formación de multicapas.

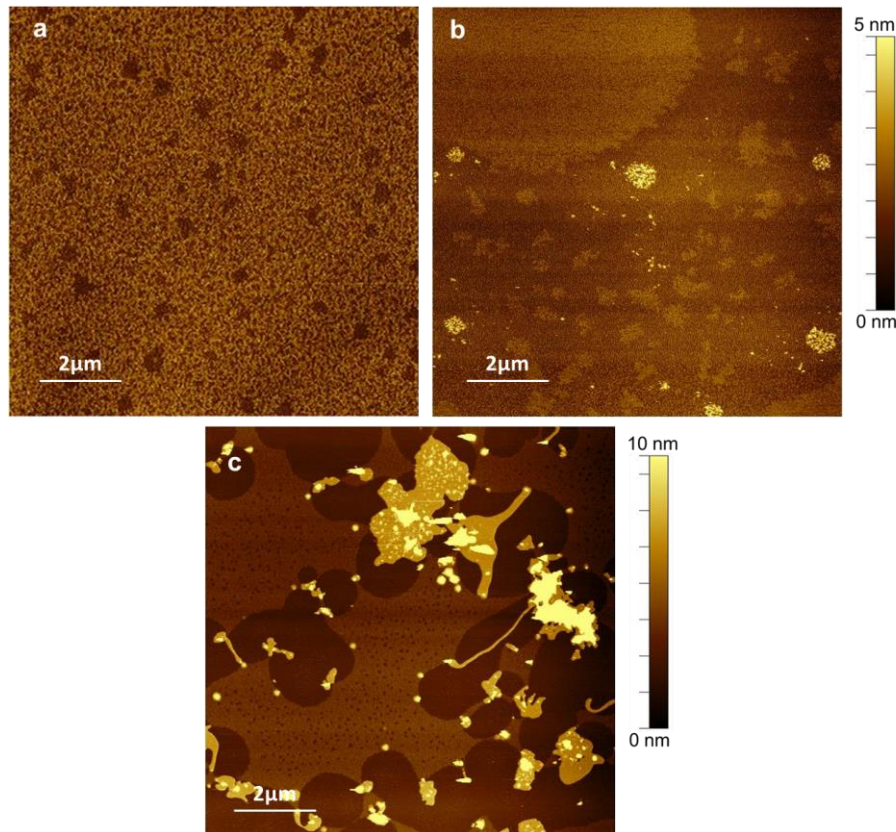


Figura 9. Película de GSL4 puro transferido a presiones de (a) $8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (b) $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (c) $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$

La presión de transferencia que se ha elegido en este trabajo de tesis doctoral para la transferencia de las películas de DPPC:COL fue de $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, ya que conduce a monocapas muy homogéneas sobre sustratos de mica (ver capítulo 2-Preparación y caracterización de membranas celulares simuladas). Pero, en este caso particular, al obtener una gran cantidad de agregados a esa presión, se descartó trabajar a presiones tan altas y se realizaron las transferencias de las películas mixtas a una presión inferior de $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. En la Figura 10 se muestran las imágenes topográficas de AFM para la mezcla binaria GSL2-DPPC. No obstante, incluso a esta presión pueden apreciarse regiones en forma de isla con agregados tridimensionales. Esta topografía se observa para todas las fracciones molares estudiadas: $\chi_{\text{GSL2}} = 0,2$; $\chi_{\text{GSL2}} = 0,45$; $\chi_{\text{GSL2}} = 0,8$. Si excluimos estas regiones de multicapas, en el resto de las imágenes se aprecian zonas con tres alturas

distintas. En la Figura 10.d se observa la sección transversal correspondiente a la $\chi_{GSL2} = 0,2$ con un dominio de isla de aproximadamente 4,8 nm y agregados que van desde 3 a 10 nm. En el caso de la Figura 10.e, se observa las distintas capas que presenta la $\chi_{GSL2} = 0,45$, dominios más grandes de 4 nm dentro de los cuales hay capas de 1 nm de altura.

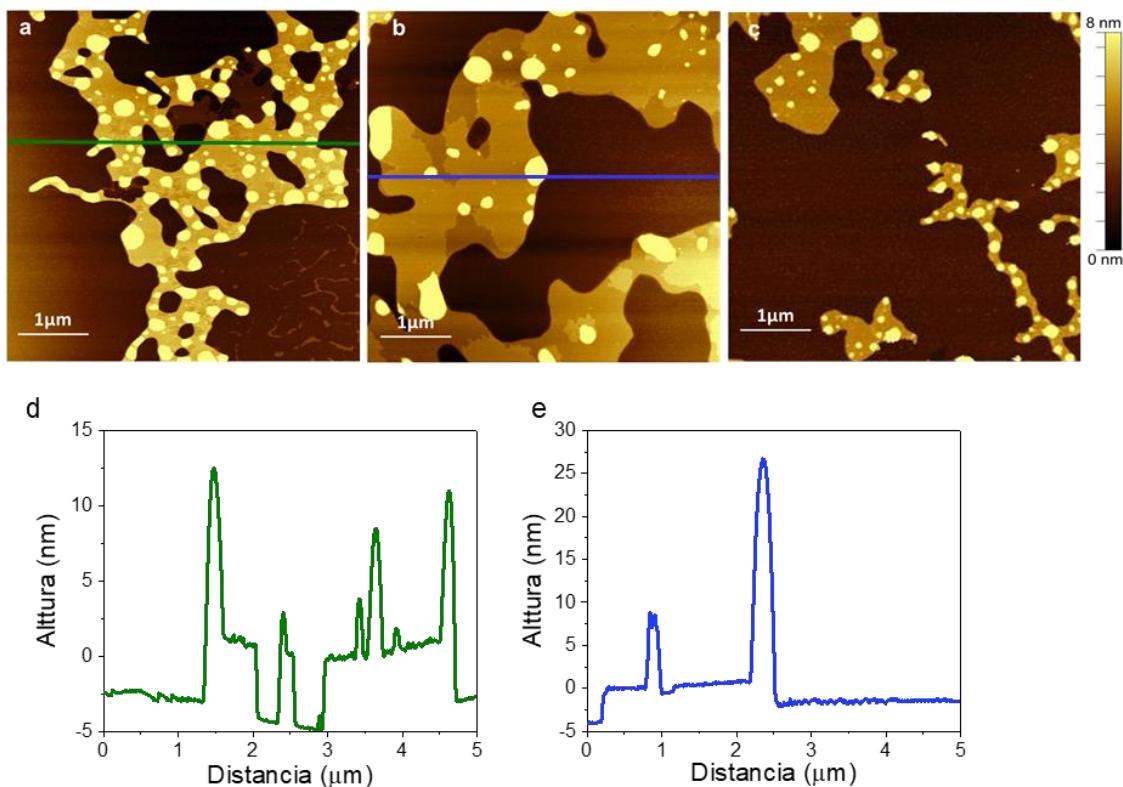


Figura 10. Mezclas binarias de GSL2-DPPC transferidas a $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ con fracciones molares de a) $\chi_{GSL2} = 0,2$; b) $\chi_{GSL2} = 0,45$; c) $\chi_{GSL2} = 0,8$; d) Sección transversal correspondiente a $\chi_{GSL2} = 0,2$; e) Sección transversal correspondiente a $\chi_{GSL2} = 0,45$.

Para la mezcla de GSL2-COL, también se transfirieron películas a $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ para las distintas fracciones molares. En la Figura 11 se muestran las imágenes topográficas donde no se aprecia la formación de multicapas ni agregados tridimensionales, pero sí de diferentes tipos de dominios. La diferencia de alturas entre estos dominios se sitúa entre 1 y 1,5 nm, apreciándose mayor densidad de los dominios de mayor altura a medida que aumenta la concentración de colesterol. Estos resultados están en concordancia con los

obtenidos en el estudio termodinámico con el análisis de las isothermas π -A donde se concluyó que las interacciones del GSL con el COL son, en general más favorables, aunque se aprecia la formación de dos fases distintas (una más rica en GLS2 y otra más rica en COL) que es la que parece generar esos dos tipos de dominios en la película.

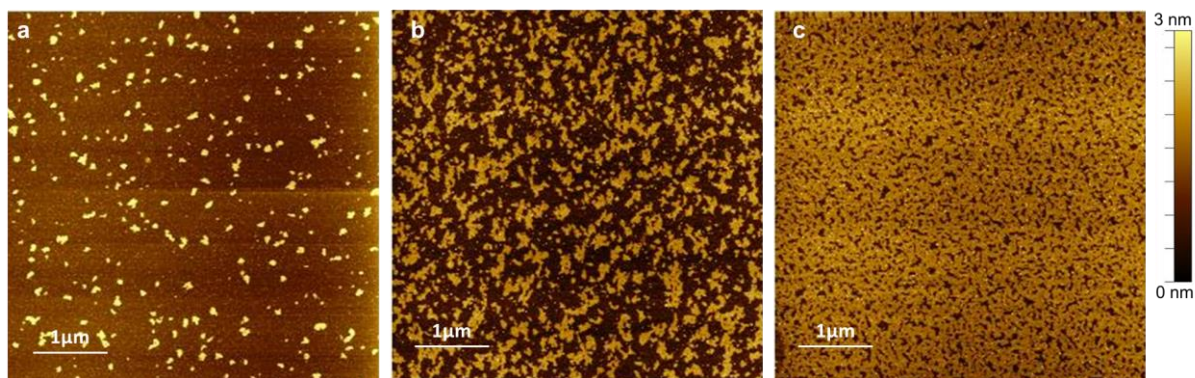


Figura 11. Mezclas binarias de GSL2-COL transferidas a $25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ con fracciones molares de a) $\chi_{\text{GSL2}} = 0,2$ b) $\chi_{\text{GSL2}} = 0,45$; c) $\chi_{\text{GSL2}} = 0,8$

Se realizó el mismo estudio de AFM, pero ahora con el GSL4. Las imágenes topográficas de AFM del GSL4-DPPC mostradas en la Figura 12 muestran transferencia de material a lo largo de la muestra y algunas pequeñas zonas de multicapa sobre todo a fracción molar de GLS4 igual a 0,4.

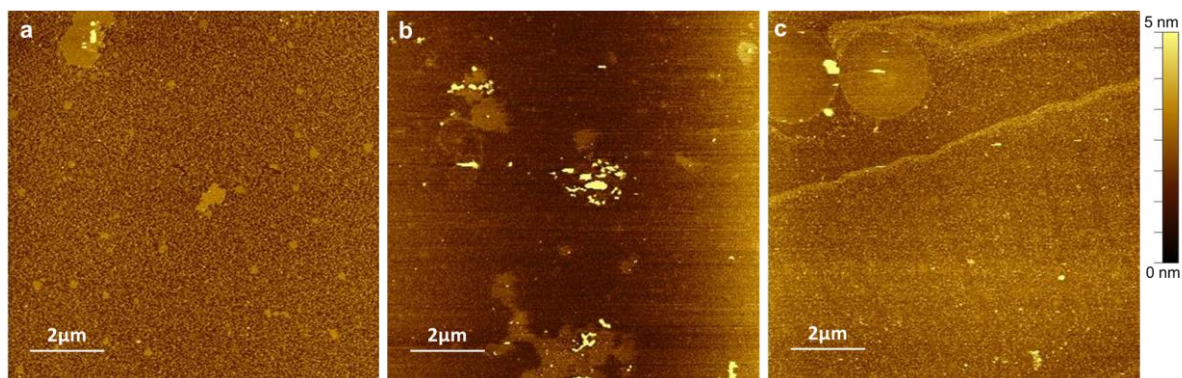


Figura 12. Mezclas binarias de GSL4-DPPC transferidas a $25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ con fracciones molares de a) $\chi_{\text{GSL4}} = 0,2$ b) $\chi_{\text{GSL4}} = 0,4$; c) $\chi_{\text{GSL4}} = 0,6$

La Figura 13 muestra las imágenes topográficas de la mezcla binaria GSL4-COL. Aquí, se aprecia también muy claramente la formación de dominios de distinta altura, siendo escasas las regiones en que se han formado multicapas.

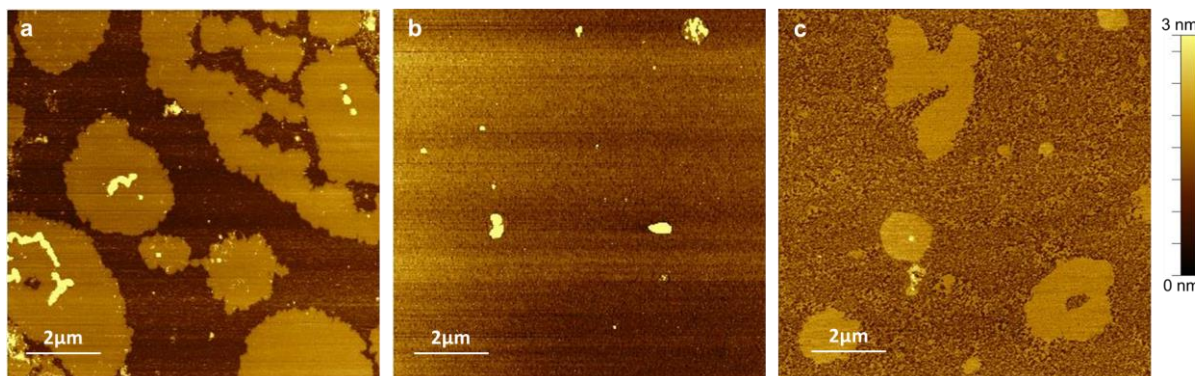


Figura 13. Mezclas binarias de GSL4-COL transferidas a $25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ con fracciones molares de a) $\chi_{\text{GSL4}} = 0,2$ b) $\chi_{\text{GSL4}} = 0,4$; c) $\chi_{\text{GSL4}} = 0,7$. Estas diferencias de altura de la a) miden $1,5 \text{ nm}$. En la imagen topográfica c) la diferencia de altura es de $0,6 \text{ nm}$. Aunque la diferencia de altura de las moléculas del GSL4 y el COL es de $1,7 \text{ nm}$ aprox.

Para tratar de comprender mejor las películas integradas por tres componentes, se transfirió la película de GSL-DPPC-COL usando una proporción de 1:1:1 a presiones de $25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ y $35 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$. Los resultados se muestran en las Figuras 14 y 15. Se ha mantenido fija la proporción 1:1 ya que sabemos que con este ratio las películas de DPPC y COL son muy homogéneas. Cambios en dicha homogeneidad serán atribuibles a la presencia del glicosfingolípido. Estos cambios en la morfología son muy notables, con la aparición de zonas de mayor altura formando bicapas y zonas de mucha mayor altura, multicapas (o quizá vesículas). Este efecto es mucho más acusado en el GLS2 que en el GLS4, posiblemente debido a la mayor capacidad del grupo $-\text{OH}$ vs. el grupo $-\text{N3}$ de interactuar positiva o negativamente con el DPPC y el COL. Vemos por tanto como la inclusión de un glicosfingolípido afecta notablemente a las características de las

películas, su homogeneidad y resulta en la formación de multicapas, en algunos casos de gran altura, que tentativamente identificamos con las llamadas balsas lipídicas.

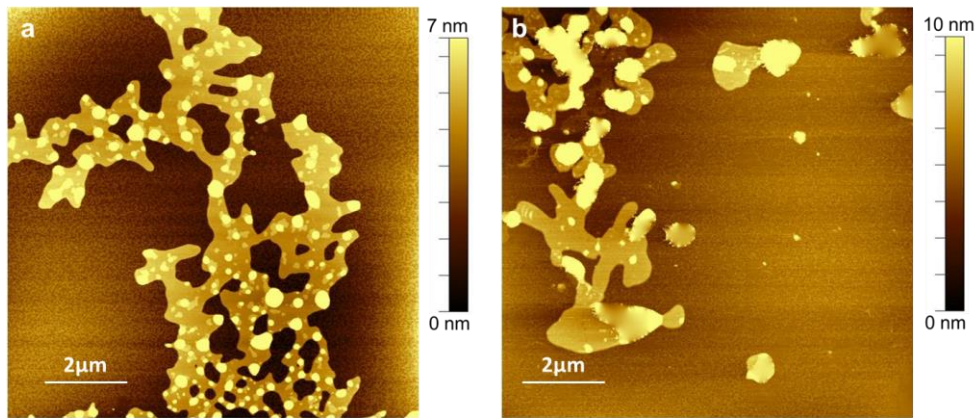


Figura 14. Película de *GSL2-DPPC-COL* transferida a presiones de (a) $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$; (b) $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$

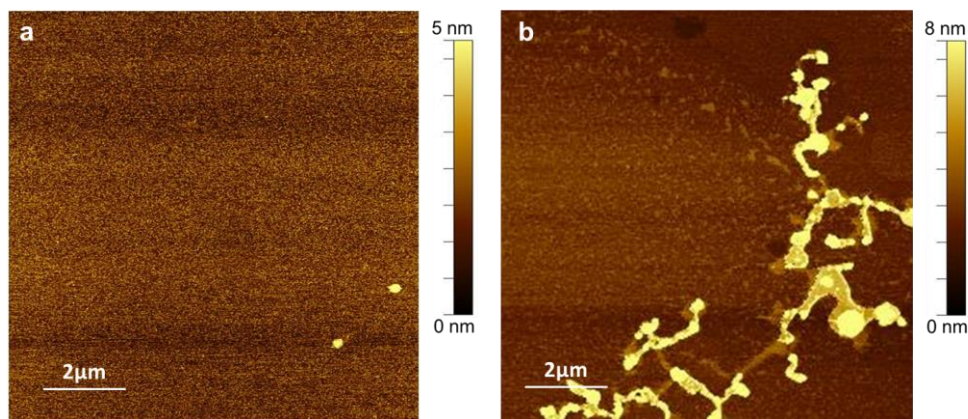


Figura 15. Película de *GSL4-DPPC-COL* transferida a presiones de (a) $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$; (b) $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$

3. Conclusiones

El estudio en la interfase aire-agua y de las películas transferidas incorporando DPPC, COL y los dos glicosfingolípidos con los que hemos trabajado indican:

Una miscibilidad parcial del glicosfingolípido con el DDPC, donde predominan interacciones repulsivas entre los componentes de la mezcla, denotada por áreas de exceso positivas (con forma sigmoideal, que indica separación de fases) y energías de Gibbs (y Helmholtz) de mezcla de exceso positivas.

La miscibilidad del glicosfingolípido con el colesterol es algo mayor que con el DPPC, pero se siguen apreciando áreas de exceso positivas (con forma sigmoideal) y energías de Gibbs y Helmholtz de mezcla de exceso positivas.

Los valores de energía libre de Gibbs de exceso de la mezcla muestran unas interacciones atractivas más fuertes entre el GSL con el COL, siendo más débiles las obtenidas en la mezcla binaria de GSL y DPPC. En el caso del GSL4-DPPC se obtienen valores positivos para todas las fracciones molares lo que indica inestabilidad entre ambos componentes.

Respecto a los valores obtenidos del área de exceso las mezclas binarias del GSL con COL resultan en interacciones más atractivas a medida que la presión disminuye. Por el contrario, las mezclas binarias del GSL con DPPC conducen a interacciones más atractivas a medida que aumenta la presión.

A lo anterior se suman las observaciones mediante AFM de las películas transferidas que indican la formación de bicapas y en algunos casos de multicapas que es indicativa de que la presencia del glicosfingolípido resulta en una perturbación de las películas homogéneas de DPPC-COL formándose nuevas fases e incluso hemos apuntado a la posible formación de balsas lipídicas inducidas por la presencia del glicosfingolípido.

4. Bibliografía

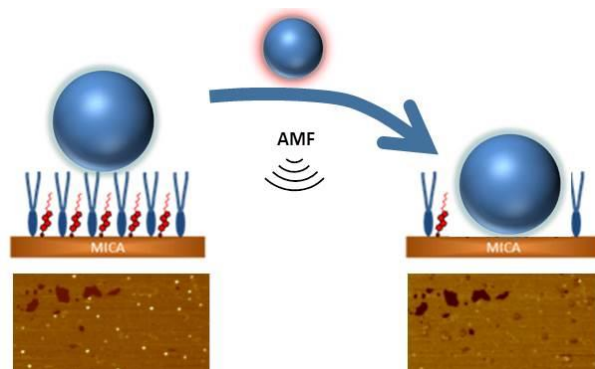
- (1) Simons, K.; Ikonen, E. Functional Rafts in Cell Membranes. *Nature* **1997**, 387 (6633), 569–572.
- (2) Zacharias, D. A.; Violin, J. D.; Newton, A. C.; Tsien, R. Y. Partitioning of Lipid-Modified Monomeric GFPs into Membrane Microdomains of Live Cells. *Science* **2002**, 296 (5569), 913–916.
- (3) Pike, L. J. Rafts Defined: A Report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J. Lipid Res.* **2006**, 47 (7), 1597–1598.
- (4) Allen, J. A.; Halverson-Tamboli, R. A.; Rasenick, M. M. Lipid Raft Microdomains and Neurotransmitter Signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, 8 (2), 128–140.
- (5) Zasadzinski, J. A.; Viswanathan, R.; Madsen, L.; Garnæs, J.; Schwartz, D. K. Langmuir-Blodgett Films. *Science* (80-.). **1994**, 263 (5154), 1726 LP – 1733.
- (6) Dynarowicz-Latka, P.; Dhanabalan, A.; Oliveira, O. N. J. Modern Physicochemical Research on Langmuir Monolayers. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2001**, 91 (2), 221–293.
- (7) Fogg, G. E.; Southward, A. J. Dennis John Crisp. 29 April 1916-18 January 1990. *Biogr. Mem. Fellows R. Soc.* **1992**, 38, 113–129.
- (8) Zhao, L.; Feng, S.-S.; Go, M. L. Investigation of Molecular Interactions between Paclitaxel and DPPC by Langmuir Film Balance and Differential Scanning Calorimetry. *J. Pharm. Sci.* **2004**, 93 (1), 86–98.
- (9) Raymond Defay; I Prigogine; New York, W. *Surface Tension and Adsorption*;

- 1996.
- (10) Pagano, R. E.; Gershfeld, N. L. Physical Chemistry of Lipid Films at the Air-Water Interface. II. Binary Lipid Mixtures. Principles Governing Miscibility of Lipids in Surfaces. *J. Phys. Chem.* **1972**, *76* (9), 1238–1243.
 - (11) Villares, A.; Martín, S.; Giner, I.; Díaz, J.; Lydon, D. P.; Low, P. J.; Cea, P. The Use of Scanning Polarization Force Microscopy to Study the Miscibility of a Molecular Wire Candidate and an Insulating Fatty Acid in Mixed LB Films. *Soft Matter* **2008**, *4* (7), 1508–1514.
 - (12) Gong, K.; Feng, S.-S.; Go, M. L.; Soew, P. H. Effects of PH on the Stability and Compressibility of DPPC/Cholesterol Monolayers at the Air–Water Interface. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2002**, *207* (1), 113–125.
 - (13) Fernández-Botello, A.; Comelles, F.; Asunción Alsina, M.; Cea, P.; Reig, F. A Monolayer Study on Interactions of Docetaxel with Model Lipid Membranes. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (44), 13834–13841.
 - (14) Xu, S.; Cruchon-Dupeyrat, S. J. N.; Garno, J. C.; Liu, G. Y.; Jennings, G. K.; Yong, T. H.; Laibinis, P. E. In Situ Studies of Thiol Self-Assembly on Gold from Solution Using Atomic Force Microscopy. *J. Chem. Phys.* **1998**, *108* (12), 5002–5012.
 - (15) Melzak, K. A.; Lázaro, G. R.; Hernández-Machado, A.; Pagonabarraga, I.; Cárdenas Díaz De Espada, J. M.; Toca-Herrera, J. L. AFM Measurements and Lipid Rearrangements: Evidence from Red Blood Cell Shape Changes. *Soft Matter* **2012**, *8* (29), 7716–7726.
 - (16) Kim, K.; Kim, C.; Byun, Y. Preparation of a

- Dipalmitoylphosphatidylcholine/Cholesterol Langmuir-Blodgett Monolayer That Suppresses Protein Adsorption. *Langmuir* **2001**, *17* (16), 5066–5070.
- (17) Shan, Y.; Wang, H. The Structure and Function of Cell Membranes Examined by Atomic Force Microscopy and Single-Molecule Force Spectroscopy. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (11), 3617–3638.
- (18) Petty, M. C. *Langmuir-Blodgett Films: An Introduction*; Cambridge University Press: Cambridge, 1996.
- (19) Jurak, M. Thermodynamic Aspects of Cholesterol Effect on Properties of Phospholipid Monolayers: Langmuir and Langmuir-Blodgett Monolayer Study. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117* (13), 3496–3502.

Capítulo 4. Efecto de la aplicación de
campos magnéticos locales sobre
nanopartículas magnéticas depositadas
sobre sistemas modelo de membranas
celulares.

A lo largo de este capítulo se mostrará la metodología utilizada para la inmovilización de nanopartículas magnéticas (MNPs) sobre membranas simuladas preparadas mediante la técnica de Langmuir-Blodgett (LB). La aplicación de un campo magnético alterno al sistema (monocapa LB + MNPs) ha resultado en un incremento de temperatura local seguido por un cambio en la fluidez de la membrana que ha promovido la inclusión de las nanopartículas en estas membranas.



1. Introducción.

1.1 Uso de MNPs en biotecnología

Entre los diferentes tipos de nanomateriales, las nanopartículas magnéticas (MNPs) son una de las más utilizadas en diversos campos de la investigación, en particular en el campo de la Biotecnología.^{1,2} Estas partículas se pueden sintetizar controlando su tamaño gracias a la gran variedad de métodos sintéticos existentes. La singularidad de sus propiedades físicas proviene de su tamaño nanométrico. Las MNPs pueden sintetizarse a partir de diferentes materiales magnéticos, siendo de las más utilizadas, las de óxidos de hierro, tales como la magnetita (Fe_3O_4) y maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Además, estos materiales son altamente biocompatibles lo que les convierte en buenos candidatos para su utilización en biomedicina, tanto en aplicaciones destinadas a la terapia como al diagnóstico.³⁻⁶ Algunas de las aplicaciones más relevantes investigadas hasta la fecha incluyen: i) transporte selectivo de principios activos (*drug delivery*), ii) separación magnética de células, iii) nuevas terapias tales como la hipertermia magnética o iv) agentes de contraste en resonancia magnética de imagen.³⁻⁶

El comportamiento magnético de las MNPs viene determinado fundamentalmente por su composición y tamaño. Sus propiedades magnéticas específicas dependen de cómo se comportan cuando en presencia o ausencia de un campo magnético. Un material es intrínsecamente magnético debido a su momento magnético de espín. Un electrón tiene una magnetización asociada a su momento angular intrínseco o espín, y a su movimiento orbital alrededor del núcleo, tal y como se muestra en la Figura 1.



Figura 1. Los diferentes movimientos del electrón, alrededor del núcleo (izquierda) y espín (derecha).

La magnetización (M) es la respuesta del material cuando se aplica un campo magnético (H). La relación entre ambas magnitudes se define como susceptibilidad magnética $\chi = M/H$. Dependiendo de la interacción entre los momentos magnéticos individuales y de su respuesta al campo, los materiales se pueden clasificar como: paramagnéticos, ferromagnéticos, diamagnéticos, antiferromagnéticos y ferrimagnéticos:

- Los materiales **diamagnéticos** no tienen electrones desapareados, por lo que los momentos magnéticos de los átomos están compensados. En ausencia de campo, su imanación es cero, y cuando se aplica campo, los momentos magnéticos se alinean en dirección contraria al campo, presentando susceptibilidad magnética negativa. En los materiales **paramagnéticos**, cada átomo, en ausencia del campo magnético aplicado, posee un momento magnético permanente. La orientación de los momentos magnéticos atómicos está distribuida al azar y tienen libertad para orientarse. Al aplicar campo, los momentos se orientan con el campo, resultando en una susceptibilidad magnética positiva. En los materiales diamagnéticos y paramagnéticos la magnetización vuelve a ser cero cuando se deja de aplicar el campo magnético.
- En el caso de los materiales **ferromagnéticos**, los momentos magnéticos están alineados en presencia o ausencia de campo y presentan magnetización elevada.

Estos materiales se componen de dominios magnéticos, que son pequeñas regiones dentro de las cuales todos los momentos magnéticos están alineados paralelamente unos con otros.

- En los materiales **antiferromagnéticos**, los momentos magnéticos de átomos adyacentes se alinean de manera antiparalela, es decir, en direcciones opuestas. Los materiales **ferrimagnéticos**, son similares a los antiferromagnéticos pero los momentos de espín no se cancelan completamente, ya que hay momentos magnéticos más débiles que están orientados de manera antiparalela a sus vecinos. En ausencia de campo, presentan magnetización y dominios magnéticos.

En la Figura 2, se muestra una representación esquemática de los distintos comportamientos magnéticos.

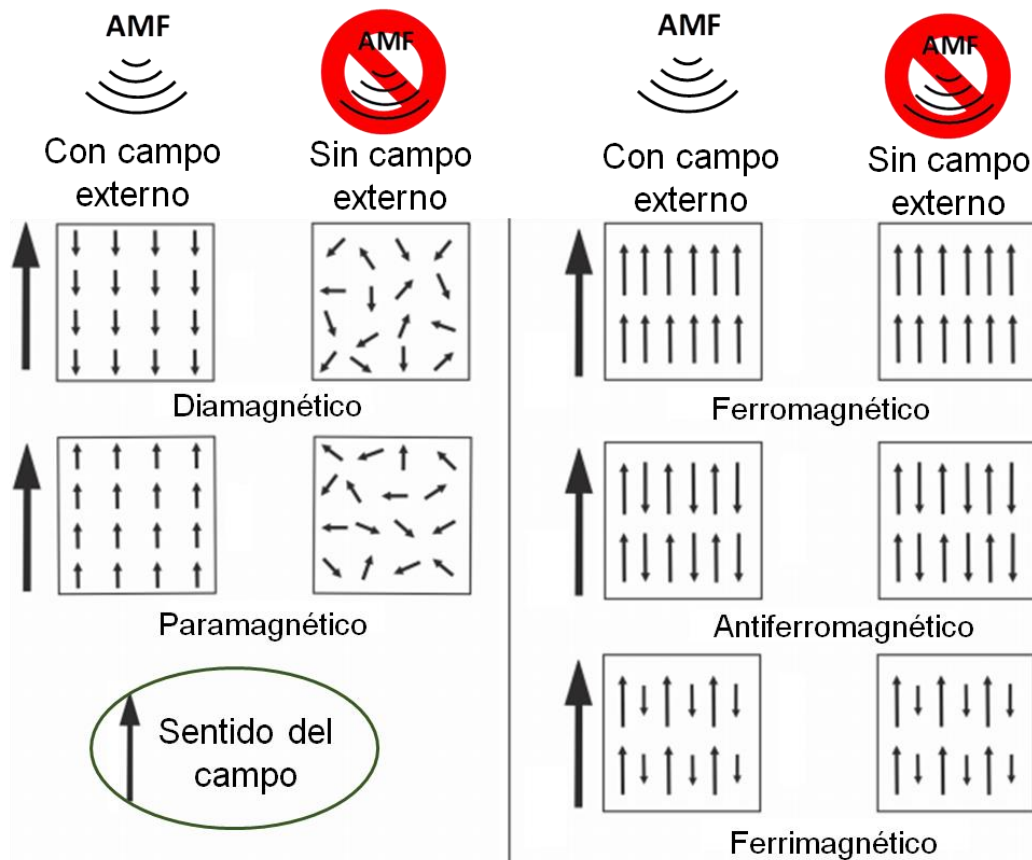


Figura 2. Diferentes tipos de comportamientos magnéticos. A la izquierda se puede observar el ordenamiento de los momentos magnéticos individuales cuando se aplica un campo magnético (lado izquierdo) o en ausencia del mismo (lado derecho).

En el caso de los materiales ferri y ferromagnéticos, la ordenación de los dominios depende de la interacción entre los dominios magnéticos y de la anisotropía magnetocristalina. Cuando se disminuye el tamaño de una partícula por debajo de su diámetro crítico (D_c), los dominios dentro del material pasan a ser monodominio. La coercitividad es la intensidad del campo magnético que se debe aplicar al material para reducir su imanación a cero después de que la muestra haya sido magnetizada hasta saturación. Por debajo de su D_c , el material ferromagnético presenta campo coercitivo (H_c)= 0, debido a que los dominios pueden desmagnetizarse espontáneamente. Es decir, en ausencia de campo externo, las partículas no tienen momentos magnéticos permanentes, pero responden rápidamente cuando se aplica un campo magnético, tal y como se muestra en la Figura 3. La respuesta de estas partículas al campo magnético es similar al de un material paramagnético, donde en vez de un momento individual de espín, se tiene un momento magnético grande correspondiente al del monodominio. A estos materiales se les denomina **superparamagnéticos**.

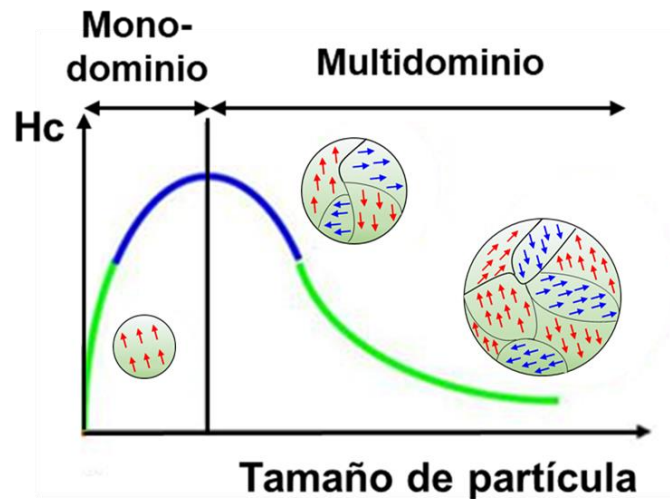


Figura 3. Variación de la coercitividad con el diámetro de la partícula

1.2 Hipertermia magnética

Una de las propiedades más interesantes de las MNPs en aplicaciones biomédicas reside en la capacidad que poseen de generar calor bajo la aplicación de un campo magnético alterno (AMF). Al aplicar un AMF sobre estas partículas, se produce una reorientación de sus momentos magnéticos produciendo energía en forma de calor. El incremento de temperatura resultante de este fenómeno se puede utilizar para inducir la muerte de células tumorales de manera específica^{7,8} o convertir a las MNPs en nanoactuadores magnéticos para la liberación de fármacos de una manera controlada⁹.

Esta capacidad que poseen las MNPs se puede emplear para la generación de un incremento local de la temperatura en el entorno de la nanopartícula tras ser expuesta a un campo magnético alterno. De esta manera se permitirá localizar este calentamiento en puntos concretos en el interior de la muestra sin afectar al entorno circundante y con una precisión nanométrica. Sin embargo, no es fácil obtener un calor local teniendo en cuenta la naturaleza de los mecanismos de transferencia de calor tales como la conducción o la convección.

En este capítulo se va a utilizar esta propiedad de las MNPs para emplearlas como nanocalentadores e inducir cambios en la fluidez de membranas lipídicas simuladas en los puntos donde las partículas estén localizadas. Los mecanismos responsables de la generación de calor en hipertermia magnética para partículas monodominio tienen lugar mediante dos mecanismos principales: (i) la relajación de Néel, relacionada con el cambio en la dirección de los momentos magnéticos de la red cristalina, y (ii) el movimiento Browniano, causado por la rotación de la partícula completa y las pérdidas por fricción con el medio circundante (Figura 4). El mecanismo depende de cómo se orienten los momentos magnéticos cuando se elimina el campo magnético aplicado. En el calentamiento de las partículas de menor tamaño, prevalece el mecanismo de relajación de Néel, que se da por la rotación del vector de momento magnético de la red cristalina sin que haya una rotación mecánica de la MNP. Por el contrario, la relajación de Brown tiene lugar preferentemente en MNPs de mayor tamaño, en este caso la MNP rota sobre sí misma manteniendo su momento magnético en la misma dirección.^{7,8}

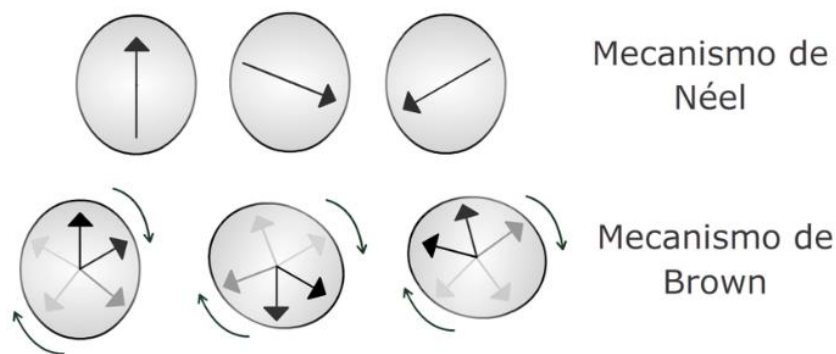


Figura 4. Representación esquemática de los mecanismos de Néel y Brown.

A la hora de cuantificar la capacidad de las MNPs de transformar la energía magnética tras aplicar un AMF en calor, se necesita definir la tasa de absorción específica (SAR) que no es más que la energía disipada por unidad de masa [W/g].

$$\text{SAR} = C * \Delta T / \Delta t \quad (\text{Ec.1})$$

Dónde: C = capacidad calorífica específica del medio; $\Delta T / \Delta t$ es el cambio de la temperatura en un intervalo de tiempo.

El SAR depende del tamaño y forma de las MNPs, su distribución, concentración y cristalinidad.¹⁰ También hay que tener en cuenta que el valor dependerá de la frecuencia y la amplitud del campo que se vaya a aplicar. Cuanto más alto sea el valor de SAR significa que la MNPs va a poseer mayor capacidad de calentamiento.

Como se ha mencionado anteriormente las MNPs disipan calor cuando se aplica un campo magnético alterno debido a la reorientación de sus momentos magnéticos. Este calor resulta en un incremento de temperatura que puede ser utilizado en terapias tales como la hipertermia magnética. Sin embargo, una limitación para este tipo de aplicaciones es la alta concentración de MNPs requerida para conseguir un incremento de temperatura sustancial. Es por ello, que recientemente, ha surgido una corriente de trabajos que utilizan estas MNPs como nanocalentadores, empleando únicamente el calor local en las inmediaciones de la superficie de las partículas, para inducir cambios químicos, estructurales etc. en moléculas directamente unidas a las MNPs. Una de las hipótesis para explicar este fenómeno, es que al aplicar campos magnéticos alternos sobre suspensiones de MNPs es que éstas absorben energía de los campos magnéticos y la convierten en calor disipado en sus inmediaciones, con una afección muy local; de esta manera, se localiza la energía en puntos concretos en el interior de la muestra sin afectar al entorno circundante. Sin embargo, en el caso de que la concentración de partículas sea alta o posean una gran capacidad para transformar la energía magnética en calor, se inducirá un incremento de temperatura global por toda la muestra. Se sabe que la disipación del calor depende del tamaño de las MNPs así como de la intensidad y

frecuencia del campo;^{11,12} pero también influye el medio en el que se encuentran. Nuestra hipótesis de trabajo es que podría modularse localmente la fluidez de la membrana mediante la inducción de un incremento local de la temperatura debido a la aplicación de un AMF sobre las MNPs depositadas en la superficie de dicha membrana. Para demostrar esta prueba de concepto se ha elegido un caso de estudio sencillo: depositar MNPs sobre un modelo de membrana celular (fosfolípido + colesterol) fabricado en el laboratorio, con un control preciso de su composición y topografía. Es éste es uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral, y del que nos vamos a ocupar en este capítulo.

Diversos estudios han demostrado que las MNPs son capaces de inducir un aumento de la temperatura alrededor de las NPs cuando se aplica un AMF sin incrementar la temperatura global del sistema. Por ejemplo, Polo-Corrales y Rinaldi, utilizaron polímeros modificados con fluoróforos, sensibles a la temperatura. Estos autores registraron temperaturas en las proximidades de las MNPs 15 °C por encima de la temperatura global del medio.¹³ Además, se ha demostrado una correlación directa entre el calentamiento local y la distancia desde la superficie de las nanopartículas.¹⁴⁻¹⁶ Así, Riedinger et al.¹⁴, incorporaron fluoróforos a diferentes distancias de la superficie de la MNP a través de enlaces azo termo-lábiles unidos a espaciadores de poli (etilenglicol) (PEG) de diferentes pesos moleculares, permitiendo así la medición de la temperatura local en función de la distancia. Estos autores mostraron que el aumento de temperatura en un determinado punto disminuyó exponencialmente con el aumento del peso molecular del PEG (es decir, con la distancia a la superficie). Huang et al.¹⁵ utilizaron MNPs funcionalizadas con fluoróforos sensibles a la temperatura para etiquetar la membrana plasmática de las células que expresan TRPV1 (un canal iónico sensible a la temperatura que se activa a 42 °C). Se observó un aumento de aproximadamente 5 °C en la temperatura de la superficie de las MNPs después de la aplicación del AMF. Este

calentamiento localizado fue suficiente para desencadenar la activación de los canales de calcio TRPV1 *in vitro*.¹⁶

Recientemente, en nuestro grupo de investigación se ha desarrollado una nanoplataforma diseñada para actuar como un calentador/termómetro y demostrar el gradiente de temperatura que se genera desde el nanocalentador hasta el medio.¹⁷ También hemos descrito una sonda térmica local que se basa en la desnaturalización térmica del ADN bicatenario.¹⁸ Es decir, sobre la partícula se dispone la sonda doble de ADN, con distinta longitud y distinta temperatura de transición de fase (T_m), permitiendo utilizar esta partícula como un termómetro. Las MNPs que se utilizaron están recubiertas con un polímero anfifílico, poli (anhídrido maleico-alt-1-octadeceno), PMAO, funcionalizado con ADN de hebra sencilla e hibridado con cadenas de ADN complementarias de tres longitudes diferentes, cada una de ellas con una T_m determinada y de esta manera serán deshibridadas a diferentes temperaturas. Cada una de ellas integra un fluoróforo diferente. De esta manera, analizando la cantidad de estos fluoróforos que se libera, se puede conocer el calor generado a distancias concretas en la superficie de la MNP. Usando este sistema, con ADNs de diferentes longitudes, se puede determinar simultáneamente el aumento de la temperatura local a tres distancias de la superficie de las MNPs. En este estudio observamos una clara correlación con los trabajos anteriormente mencionados, que mostró una disminución en la temperatura local con el aumento en la longitud de la cadena de ADN; por ejemplo, para una distancia de 5 nm se incrementó la temperatura local 8,3 °C y para el caso de distancias de 5,6 nm desde la superficie de la MNP, se incrementó la temperatura 6,1 °C.

Todos estos ejemplos ponen de manifiesto que es posible emplear MNPs como nanocalentadores tras aplicar un AMF. El calor es disipado únicamente en las proximidades de las MNPs sin producirse un aumento significativo de la temperatura

global del medio. Pero ¿cómo afecta el calentamiento local generado por las MNPs a la fluidez de las membranas?

Las membranas biológicas, son estructuras laminadas formadas principalmente por fosfolípidos, colesterol, glúcidos y proteínas, que desempeñan un papel muy importante en los organismos vivos. Toda la interacción y comunicación celular tiene lugar a través de estas membranas, es decir, son las encargadas de regular la entrada y liberación de muchas sustancias, expulsando del interior los desechos del metabolismo e incorporando los nutrientes a través de esa membrana. También es donde tiene la interacción con nanopartículas o principios activos. La permeabilidad de estas membranas va a depender en gran medida de su fluidez y de temperatura de transición de fase de los lípidos que la componen.

2. Resultados y discusión.

2.1 MNPs síntesis y caracterización (TEM, Magnetismo y SAR)

La síntesis de MNPs está ampliamente desarrollada en la literatura y puede realizarse a través de diferentes aproximaciones, tales como la coprecipitación, pirólisis láser, microelmusión o descomposición térmica.¹⁹ La síntesis de las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro recubiertas con moléculas de ácido oleico y oleamina utilizadas en este capítulo, se ha llevado a cabo siguiendo una metodología optimizada por el grupo de investigación Bionanosurf²⁰ mediante descomposición térmica de precursores de hierro, $\text{Fe}(\text{acac})_3$, tris(acetilacetato)hierro(III).²¹ Estas nanopartículas esféricas de óxido de hierro monodispersas y con un diámetro promedio de 12 nm se sintetizaron utilizando la metodología de descomposición térmica en dos etapas. En esta síntesis se utiliza el $\text{Fe}(\text{acac})_3$ como precursor de hierro y como surfactantes ácido oleico y oleamina, el proceso se realiza a altas temperaturas, primero se calienta la mezcla a

200 °C durante dos horas y se va aumentando progresivamente la temperatura hasta que alcanza 305 °C para que se evapore el éter bencílico. Gracias a este método de síntesis se tiene un elevado control en el tamaño y la morfología de las MNPs obteniendo gran monodispersidad y cristalinidad de las mismas. Estas MNPs han sido caracterizadas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Gracias a esta técnica se puede determinar el tamaño, la forma y el grado de agregación de las MNPs sintetizadas, tal y como se puede observar en la (Figura 5 a), estas MNPs poseen una distribución de tamaño muy homogénea. En la Figura 5b. se muestra el histograma de tamaños de las MNPs, obteniéndose un diámetro medio de 12 nm. Como se ha mencionado anteriormente, estas MNPs están recubiertas de ácido oleico. Con objeto de cuantificar el recubrimiento orgánico que tienen las NPs se realizó un análisis termogravimétrico (TGA) de las muestras. Esta técnica nos proporciona información sobre la pérdida de masa de la muestra frente a la temperatura. Al aumentar la temperatura se va descomponiendo la materia orgánica que está sobre la partícula y se detecta a cada temperatura un salto correspondiente con la disminución de la masa total de la partícula. A partir de estas medidas se determinó que aproximadamente 1.500 moléculas de ácido oleico se encontraban en la superficie de cada MNP. En la Figura 5 c, se muestra un esquema de la MNP recubierta de moléculas de ácido oleico.

Para determinar la capacidad calorífica de las MNPs se midió su tasa de absorción específica (SAR). Para ello, a una concentración fija de 1 mg de hierro·mL⁻¹ de MNPs, se le aplica un AMF determinado y se mide como varía la temperatura de la suspensión de MNPs en función del tiempo aplicado (entre 2- 3 minutos). Calculando la pendiente de la variación de la temperatura frente al tiempo en los primeros instantes de aplicación del campo, se determina el valor de SAR para la muestra. Estas medidas se suelen realizar en medio acuoso debido a las limitaciones de la sonda de temperatura que el grupo posee.

El valor de SAR obtenido para estas MNPs fue de $500 \text{ W}\cdot\text{gFe}^{-1}$, que es un valor adecuado para poder realizar estudios de hipertermia. A título comparativo, podemos indicar que el valor de SAR en bibliografía para MNPs de tamaño similar y con valores del mismo campo y frecuencia aplicados es de $350 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ (téngase en cuenta que para realizar una comparativa de los valores de SAR de diferentes MNPs tiene que haberse aplicado el mismo campo y frecuencia). La síntesis y caracterización de estas MNPs se encuentra ampliamente detallada en el capítulo de materiales y métodos.

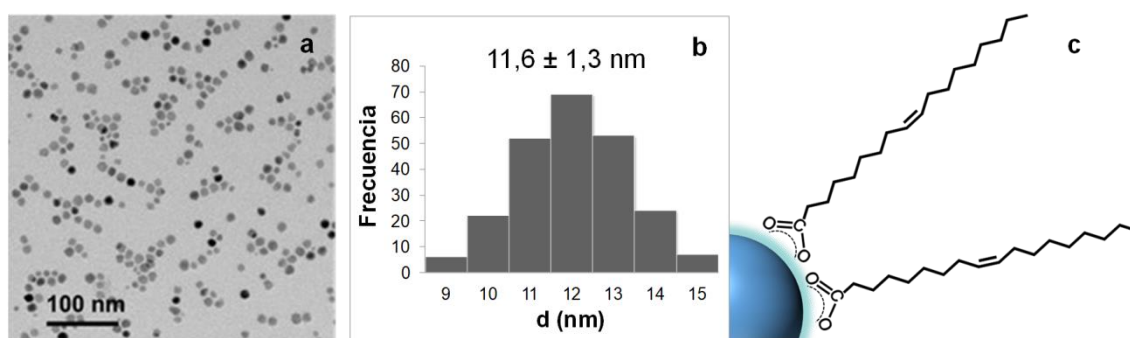


Figura 5. (a) Imagen de TEM de las MNPs de 12 nm de tamaño (escala, 100 nm). (b) Histograma de tamaños de las MNPs (c) Esquema de la NP con el núcleo de óxido de hierro recubierto de ácido oleico.

2.2 Preparación de las monocapas LB

A lo largo de este capítulo, se va a estudiar el efecto del calentamiento local generado por MNPs (depositadas sobre un modelo de membrana celular) tras la aplicación de un campo magnético alterno y se va a analizar cómo el efecto localizado de la hipertermia magnética afecta a la fluidez de membranas celulares simuladas. Sabemos que en MNPs recubiertas con ADN¹⁸ el efecto de calentamiento local es capaz de incrementar la temperatura en torno a los 8-12 °C; resultados similares se han obtenido

para las células¹⁸ en las que se ha observado un aumento de temperatura tras la aplicación de AMF. Teniendo en cuenta este dato, se utilizó 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (DPPC) como fosfolípido constituyente de las membranas simuladas, ya que la temperatura de fusión para una bicapa DPPC: COL 1:1 está en el rango de 39-47 °C, que está en el rango de la temperatura obtenida tras aplicar el campo.

Una vez que presentada la caracterización las MNPs, veamos cómo se fabricó la membrana simulada. Los componentes de estos modelos de membrana fueron DPPC y colesterol (COL); el colesterol es un componente esencial en la membrana de células animales y responsable de la fluidez de dichas membranas. Las películas se prepararon en la proporción 1:1 de ambos componentes, empleando la técnica Langmuir-Blodgett (LB). En la Figura 6 se muestra un esquema del proceso de fabricación de las monocapas de DPPC:COL 1:1 que se ha llevado a cabo. Previa limpieza de la cuba, se dispersa gota a gota la disolución de DPPC y COL 1:1 en cloroformo sobre la superficie del agua en la cuba de Langmuir, y se comprimen las barreras hasta que alcanza la presión superficial de 35 mN·m⁻¹. Una vez alcanzada esta presión, se transfiere por LB a un sustrato de mica previamente exfoliado.

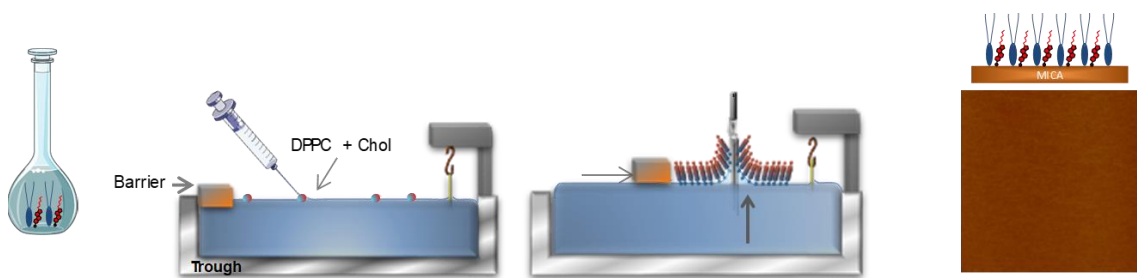


Figura 6. Proceso de fabricación de las monocapas de DPPC: COL 1:1

Es importante destacar que la fabricación de una monocapa DPPC:COL 1:1 sobre mica resulta en películas muy homogéneas y planas, con una rugosidad muy baja (RMS

de $0,07 \pm 0,01$ nm).²² Por lo tanto, esta superficie uniforme, sin presencia de defectos tridimensionales ni poros, y que además es muy plana, hace que la película DPPC:COL 1:1 sea un sistema perfecto para poder incorporar las MNPs y detectar mediante AFM cualquier cambio en la topografía de la superficie de la membrana.²³

2.3 Monocapas + MNPs

Una vez que se fabrica la membrana simulada, el siguiente paso es inmovilizar las nanopartículas magnéticas sobre esta. Las MNPs con las que se ha trabajado están funcionalizadas con ácido oleico y oleamina por lo que cabe esperar una favorable interacción de las cadenas hidrocarbonadas que envuelven a las MNPs con la parte hidrofóbica de la monocapa lipídica. Existen diversos métodos para depositar nanopartículas sobre monocapas; entre éstos podemos citar: autoensamblaje, drop casting, sping coating, y Langmuir-Blodgett, entre otros.²⁴⁻²⁸ En nuestro caso, el procedimiento de autoensamblaje se descartó, ya que la incubación de la muestra en disolventes orgánicos podría atacar a la monocapa y en el caso de incubarlo en medios acuosos, tal y como se ha mostrado en el capítulo anterior, se espera una reorganización en dominios de bicapa con áreas de mica libres.²² Descartada esa metodología, nuestra siguiente opción fue el empleo de la técnica LB, ya que ésta posibilita un buen control en la distribución de las MNPs, y también permite controlar el grado de recubrimiento, lo que es fundamental para el estudio que se va a desarrollar. La Figura 7 muestra una isoterma de compresión de las MNPs a 20 °C. En ella puede observarse que estas MNPs resultan en una isoterma presión – área que alcanza presiones superficiales muy altas, es decir estas MNPs tienen un claro comportamiento superficial sobre el agua y la cuestión ahora es elegir la presión de transferencia óptima para alcanzar un recubrimiento no demasiado

alto (que permita distinguir MNPs), pero suficiente como para localizar fácilmente un número significativo de MNPs en la superficie y poder realizar estudios estadísticos.

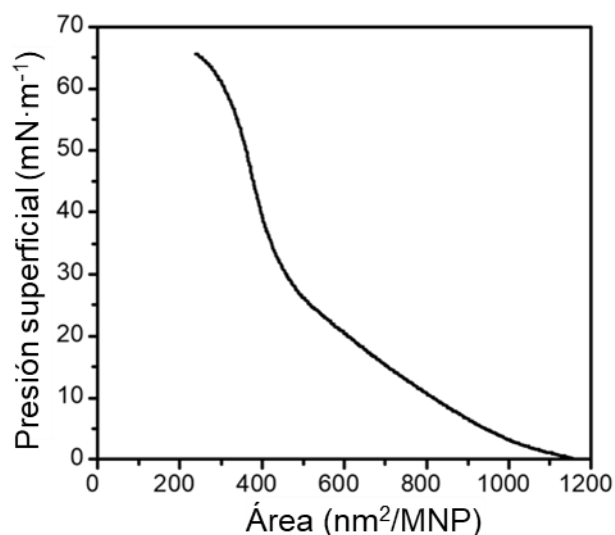


Figura 7. Isoterma de presión superficial frente área por molécula para las MNP. Isoterma registrada a 20 °C en una subfase de agua Milli-Q.

Las MNPs se transfirieron a una presión superficial de 15 mN·m⁻¹ sobre un sustrato de mica previamente recubierto por una monocapa de DPPC:COL 1:1, tal y como se ilustra en la Figura 8. Se eligió esta presión de transferencia, ya que, el recubrimiento superficial obtenido a dicha presión nos pareció óptimo para los objetivos de este estudio.

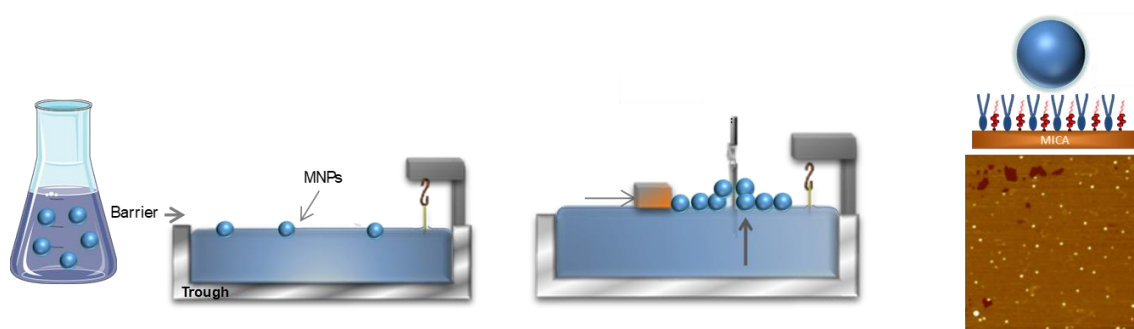


Figura 8. Proceso de incorporación de las MNPs en las monocapas de DPPC: COL 1:1

2.3.1 Caracterización mediante AFM

Tal como se observa en la Figura 9.a, la transferencia de las MNPs a $15 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ resulta en una distribución homogénea de MNPs; además esas MNPs no forman agregados. El recubrimiento superficial de las MNPs inmovilizadas en la monocapa es bastante bajo, aproximadamente un 7% del área total, tal y como se observa en el histograma de la Figura 9.b. Además, hay que tener en cuenta que la forma de las MNPs puede variar si están en suspensión, o si están depositadas sobre un sustrato, ya que cuando se ponen en contacto con el sustrato tienden a achatarse, como se ha visto en otros trabajos descritos en la bibliografía.²⁹ Es por ello que el valor de altura medio que se obtuvo para estas MNPs es de 6-7 nm, lo que indica que dejan de tener forma esférica tras inmovilizarlas en la superficie.

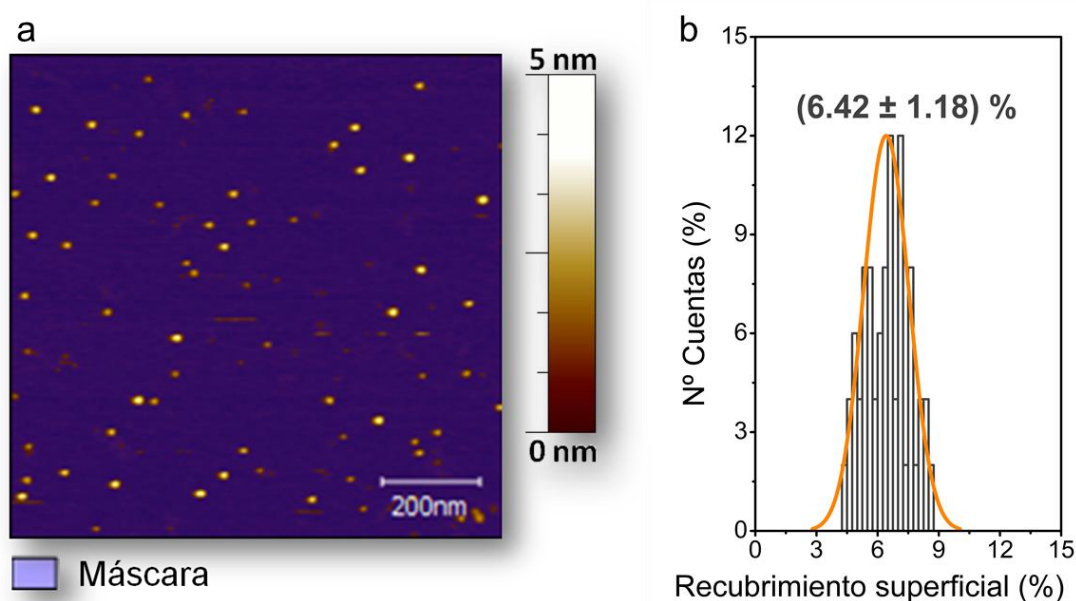


Figura 9. (a) Imagen AFM de $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ de mica / DPPC:COL 1:1 / MNPs con la máscara en azul que indica el área de DPPC:COL que no está recubierta con MNPs.

(b) *Histograma que muestra el porcentaje promedio de área de sustrato cubierto por MNPs. Este histograma se ha realizado en tres zonas de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$.*

3. Aplicación de campo magnético alterno: estudio del incremento de temperatura localizado en las membranas

Gracias a que las MNPs están distribuidas homogéneamente, con un recubrimiento superficial bajo, se puede realizar un estudio detallado e individual de lo que sucede con cada nanopartícula tras aplicar un AMF. Al tratarse de un efecto local, y para poder realizar una comparativa, se necesita realizar un estudio exactamente en la misma región de la muestra. Como no es posible acoplar el equipo de hipertermia al AFM, es virtualmente imposible situar la punta de AFM tras la aplicación del AMF en la misma región de la muestra explorada antes de aplicar el campo, salvo que tengamos una referencia que nos permita volver al mismo lugar de la muestra. Por lo tanto, se tuvo que ingeniar una manera de poder marcar el sustrato para ser capaces de volver a la misma zona de la muestra. Para ello se emplearon técnicas de litografía, con el objetivo de crear patrones de tamaño micrométrico sobre la muestra. La Figura 10 ilustra la metodología empleada. Se hizo uso de la litografía FIB (Focused Ion Beam) con iones galio para crear los patrones necesarios sobre nuestras superficies. Al utilizar estos iones, la litografía FIB puede desgastar la superficie directamente, sin necesidad de utilizar una capa de protección. En la sección de materiales y métodos, capítulo 1, se encuentra más información.

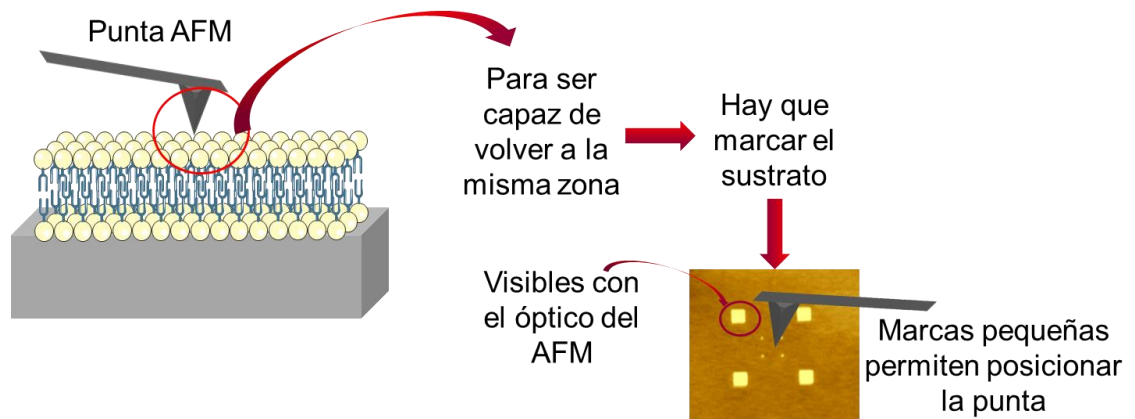


Figura 10. Esquema que muestra los pasos a seguir para posicionar la punta de AFM en la misma área de la muestra antes y después de aplicar AMF.

Con objeto de poder posicionar en la muestra y analizar las mismas zonas antes y después de aplicar el campo magnético externo, se realizaron dos tipos de marcas cuadradas, unas marcas más grandes para que fueran fácilmente identificables con la cámara óptica del equipo de AFM, y otras más pequeñas, para ayudarnos a posicionar la punta de AFM y poder empezar a realizar barridos topográficos y localizar el área de estudio. Para ello, se diseñó una máscara en una membrana de Si_3N_4 con cuatro marcas cuadradas de $30 \times 30 \mu\text{m}^2$, separadas $100 \mu\text{m}$ que preparadas por indentación con un haz de iones FIB (Figura 11, cuadrados 1-4), correspondientes a las marcas más grandes. Para las marcas pequeñas, se hicieron marcas análogas, pero, en este caso, de $3 \times 3 \mu\text{m}^2$ de ancho, y separadas $30 \mu\text{m}$ entre sí (Figura 11, cuadrados 5-8). Estas últimas marcas actúan como referencias internas cuando se escanean las imágenes AFM, es decir, son las que nos van a ayudar a conseguir realizar el estudio de la misma región de la muestra.

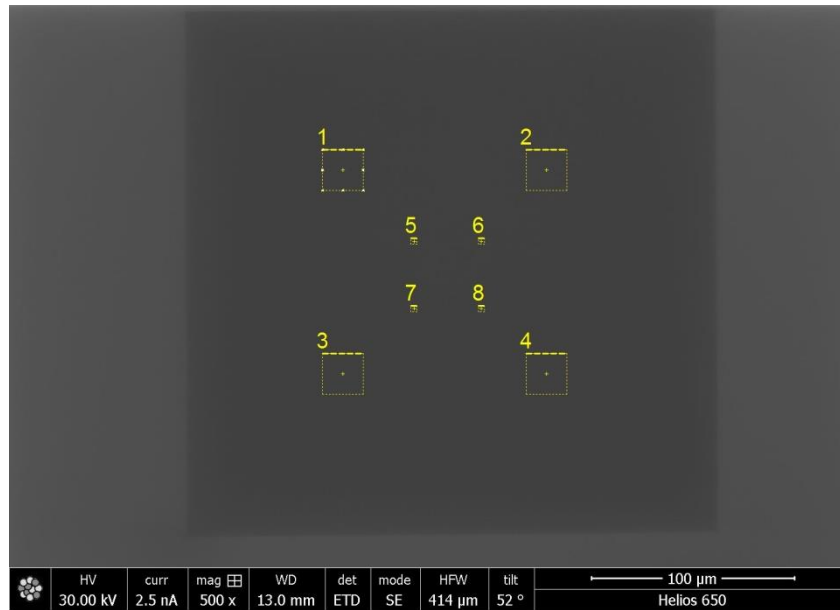


Figura 11. Imagen tomada en el equipo Dual Beam, donde se muestra el patrón de marcas cuadradas, diseñado, sobre una máscara de Si_3N_4 .

A continuación, se llevó a cabo una evaporación sucesiva de Cr (5 nm Cr) seguido de Cu (75 nm) sobre la superficie de la mica y a través de la membrana de Si_3N_4 con las marcas. Por último, se realizaron imágenes de AFM de la mica marcada con el patrón para verificar que el proceso de evaporación no afecta a la topografía del sustrato de mica. La Figura 12.a muestra una imagen, tomada con el microscopio óptico del AFM, del sustrato de mica modificado con el patrón de las cuatro marcas cuadradas mencionadas anteriormente. Los cuadrados grandes exteriores y los cuadrados pequeños interiores son claramente visibles en la imagen. La Figura 12.b muestra una imagen en 3D de AFM de un sustrato de mica modificado con el patrón de las cuatro marcas cuadradas. En la Figura 12.c y 12.d se pueden observar en el perfil de la sección transversal las dimensiones de las marcas cuadradas internas (3,0 μm de ancho y 80 nm de alto).

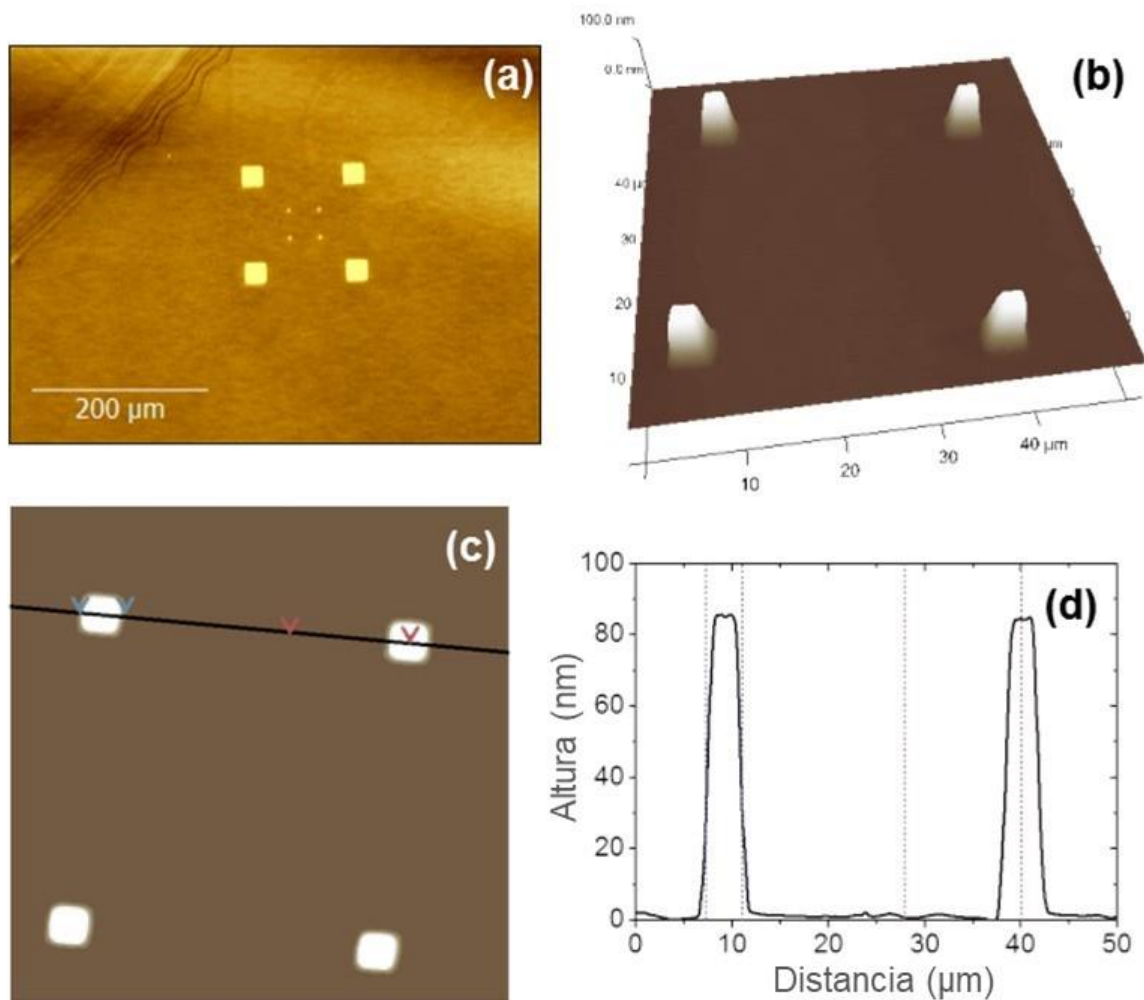


Figura 12. Imagen óptica de $600 \times 450 \mu\text{m}^2$ correspondiente al patrón con las marcas cuadradas sobre el sustrato de mica. (b) Imagen en 3D de AFM de dimensiones $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ que muestra el patrón interno. (c) Imagen en 2D de AFM de dimensiones $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ que muestra el patrón interno. (d) Sección transversal que muestra la altura y las dimensiones del patrón con las marcas cuadradas grabadas en la superficie de la mica.

Una vez preparado de esta manera el sustrato de mica con el patrón de las marcas cuadradas y comprobarse por AFM que la zona interior no se vio afectada por el proceso, se procedió a transferir la monocapa de DPPC:COL 1:1 a una presión de $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. En el siguiente paso, se transfirieron las MNPs mediante la técnica LB, tal y como se ha explicado anteriormente, a una presión de $15 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Se procedió después a caracterizar

el sistema mediante AFM tomando imágenes de 50×50 , 20×20 , 10×10 , 5×5 y $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ de la región que se ha seleccionado para ser analizada.

La Figura 12 muestra un ejemplo representativo de los resultados obtenidos antes de aplicar un campo magnético alterno. A partir de una imagen de dimensiones $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ (Figura 12.a) se selecciona una imagen de $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ (Figura 12.b). Se puede observar como las MNPs se distribuyen de manera homogénea sobre la membrana simulada sin formar agregados de MNPs.

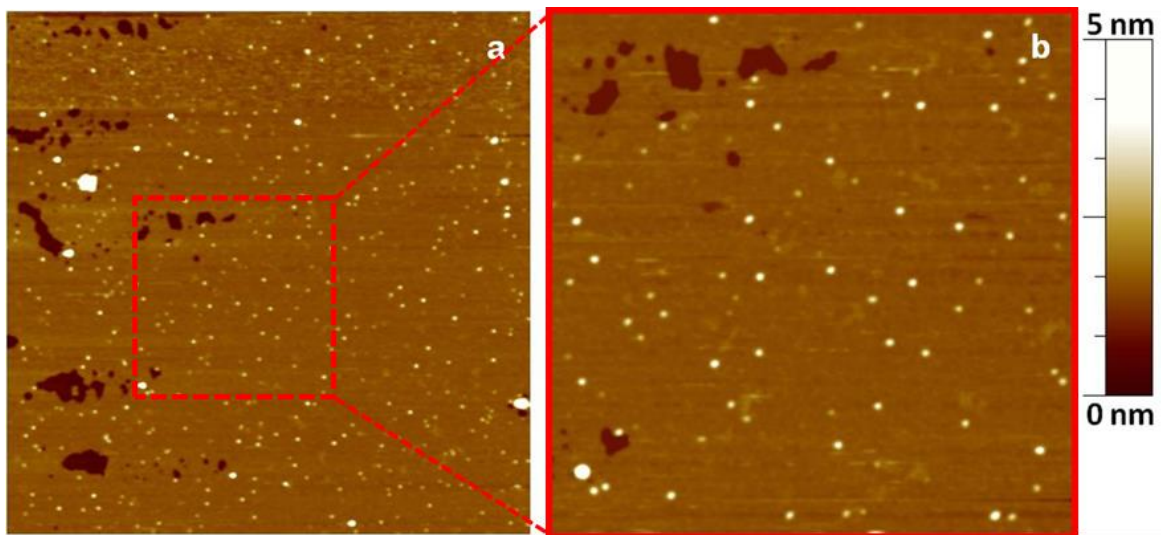


Figura 12. Imagen topográfica de AFM de (a) $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ y (b) $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ antes de la aplicación de un campo magnético alterno.

3.1 Aplicación de un campo magnético: Estudio post-campo

Se aplicó un AMF (836 kHz , $20,1 \text{ kA} \cdot \text{m}^{-1}$ durante un tiempo de 90 min)³⁰, sobre el sistema integrado por las MNPs incorporadas en la monocapa de DPPC:COL 1:1, tal y como se ilustra en la Figura 13. Cuando se genera el campo, las nanopartículas magnéticas absorben la energía de este fenómeno de acoplamiento.⁷ Para más información de hipertermia magnética se encuentra en el capítulo 1 de materiales y métodos.

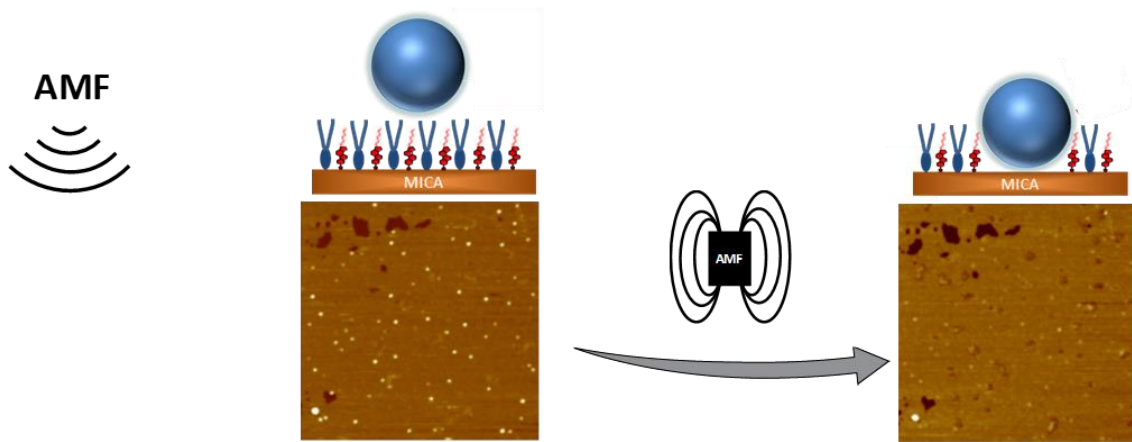


Figura 13. Esquema ilustrativo del proceso llevado a cabo en el sistema mica/DPPC:COL 1:1/MNPs al aplicar un AMF (836 kHz, $20.1 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ durante 90 min).

A continuación, se analizó mediante AFM si se había producido algún efecto en la topografía de la membrana simulada que incorpora las MNPs debido a la aplicación del campo magnético. La Figura 14 a y b muestran la misma región de la muestra antes y después de la aplicación del campo magnético. La presencia de algunos huecos en la monocapa (región superior de las imágenes) indica de forma inequívoca que estamos explorando exactamente la misma región de la muestra. Además, estos defectos son de interés ya que muestran la diferencia de altura entre el soporte base y la película (medida mediante perfiles de sección transversal), tal y como se muestra en la Figura 14 c; dicha diferencia de alturas es de $2,1 \pm 0,3 \text{ nm}$, lo que está en concordancia con lo indicado en el capítulo 2,²² es decir, $2,4 \text{ nm}$ para el espesor de la monocapa.

Seguidamente se realizó un estudio estadístico de las diferentes alturas de las MNPs antes y después de aplicar AMF. Se puede observar en las imágenes que, una vez que se ha aplicado el AMF, la altura correspondiente a la misma MNP (H_{BH} , círculo azul

Figura 14.a, H_{AH} círculo rojo Figura 14.b) ha disminuido respecto a la que tenía antes de la aplicación del campo magnético alterno.

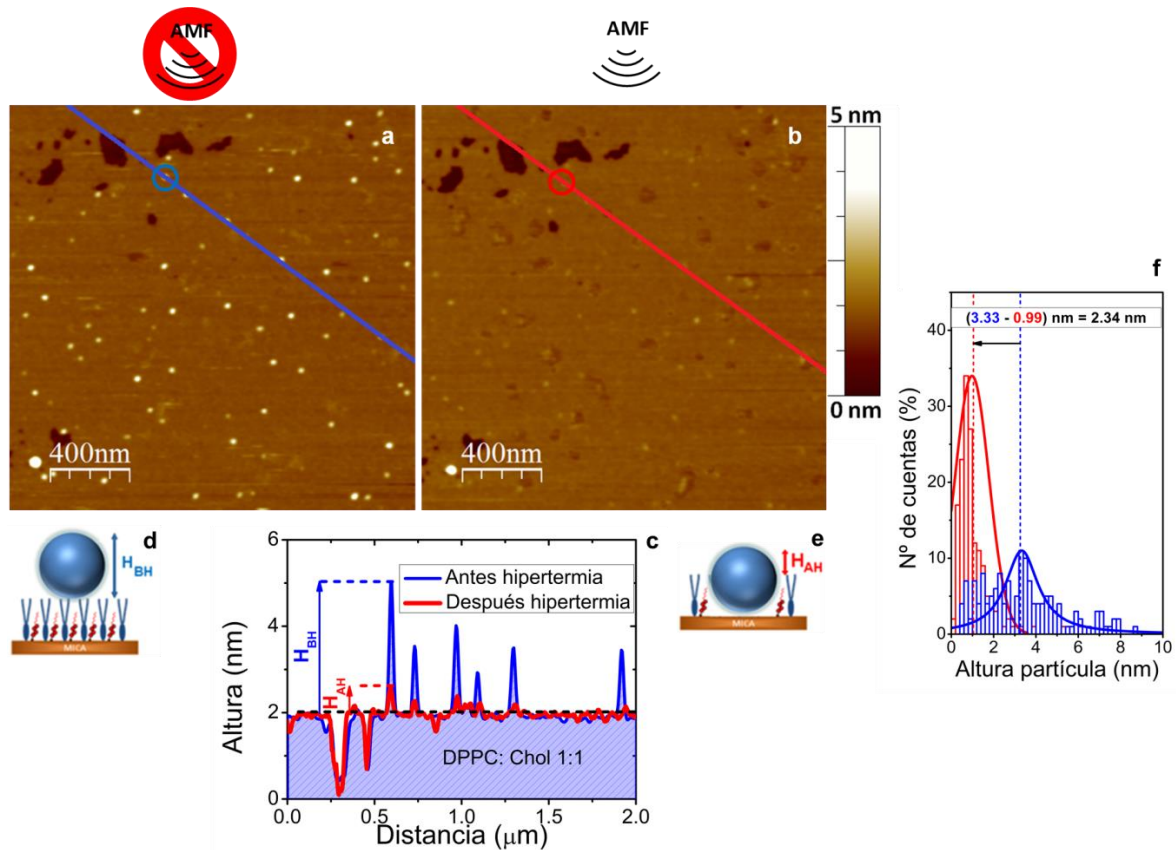


Figura 14. (a) Imagen representativa de AFM de $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ de una mica / DPPC:COL 1:1 / MNPs. (b) Imagen AFM de $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ de la mica / DPPC:COL 1:1 / MNPs (misma área que a) después de la aplicación de un campo magnético alterno externo con una frecuencia de 836 kHz y una amplitud de campo magnético de $20,1 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ por 90 min. (c) Perfiles de sección transversal correspondientes a la línea azul en (a) para el sistema inicial y el mismo perfil de sección transversal después de la aplicación de la altura del campo magnético alterno (línea roja). (d) Esquema gráfico que muestra H_{BH} , altura de la NP antes de aplicar hipertermia magnética (e) Esquema gráfico que muestra H_{AH} y que verifica el modelo propuesto para la incorporación de las MNPs en la membrana simulada. (f) Histogramas correspondientes a los valores de altura obtenidos al tomar secciones transversales de las mismas MNPs antes (azul) y después de la hipertermia (rojo) obtenidas de diferentes imágenes de AFM. El resultado de restar el valor promedio de la altura de MNPs antes y después de la hipertermia es 2,3 nm.

En la Figura 14.f se puede observar el histograma de los valores promedio de altura correspondientes a las diferentes distribuciones de los datos de altura obtenidos para más de 150 MNPs. Es importante destacar que la diferencia entre la altura promedio de las MNPs (medida frente a la superficie DPPC:COL 1:1) antes y después del tratamiento de hipertermia magnética es similar a la medida para la altura de la monocapa DPPC:COL (frente al sustrato de mica libre). Este resultado indica que cada una de las MNPs individuales distribuidas en la superficie de la monocapa se incorpora a la monocapa DPPC:COL 1:1 cuando se aplica el AMF externo, tal y como se muestra en el esquema de la Figura 14.d y e. Esos resultados corroboran la validez de la hipótesis de nuestro trabajo, es decir, la aplicación de un campo magnético alterno resulta en un incremento de temperatura localizada en el entorno de la nanopartícula, el cual induce un cambio en la fluidez de la membrana y promueve la incorporación de las MNPs en dicha membrana.

Para ahondar en los resultados obtenidos, cuantificando las observaciones arriba descritas, se determinó la raíz cuadrática media (RMS) de la rugosidad de las superficies estudiadas. Con los valores de RMS de la rugosidad obtenidos para las diferentes regiones de la muestra antes y después de aplicar AMF, se obtuvo una disminución significativa de dicha rugosidad desde un valor inicial de 0,2 nm (antes de aplicar el AMF) hasta 0,1 nm (después de aplicar el AMF) tal y como se muestra en la Figura 15. La determinación de la raíz cuadrática media de la rugosidad siempre se realizó en áreas de $1,5 \times 1,5 \mu\text{m}^2$ correspondientes a imágenes AFM sin defectos en la capa.

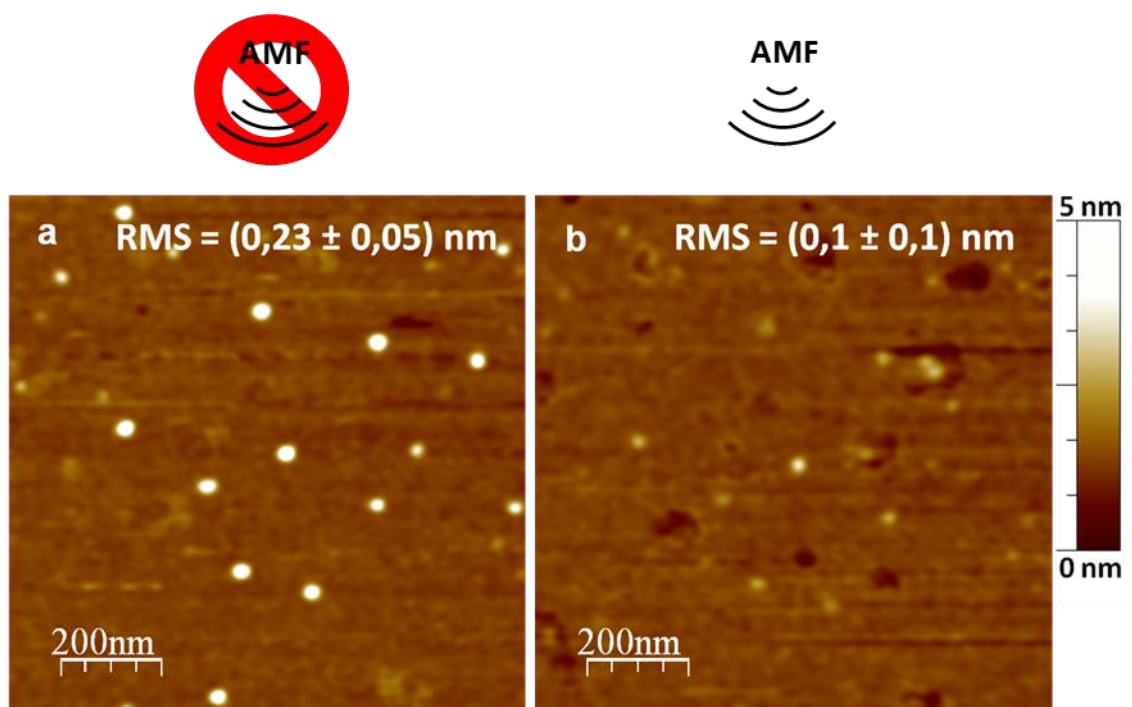


Figura 15. Imágenes topográficas de AFM de dimensiones $1,5 \times 1,5 \mu\text{m}^2$ que muestran los valores de topografía y rugosidad (RMS) del sistema mica / DPPC:COL 1:1 / MNPs (a) antes de la aplicación de un AMF; (b) después de la aplicación de un AMF.

Para poder confirmar plenamente la interpretación de los resultados obtenidos, se llevó a cabo un experimento de control aplicando un AMF sobre una monocapa de DPPC:COL 1:1 sin la presencia de las MNPs. Se puede observar en las imágenes de AFM, Figura 16, que la monocapa de DPPC:COL 1:1 después de aplicar un AMF, muestra las mismas características topográficas que antes de aplicar campo no habiéndose podido identificar cambios en la morfología de DPPC:COL 1:1 debido a la aplicación del AMF. Con estas observaciones, se puede estimar que los cambios que se han visto probablemente sólo sean atribuibles al calentamiento local inducido por el AMF sobre cada MNP.

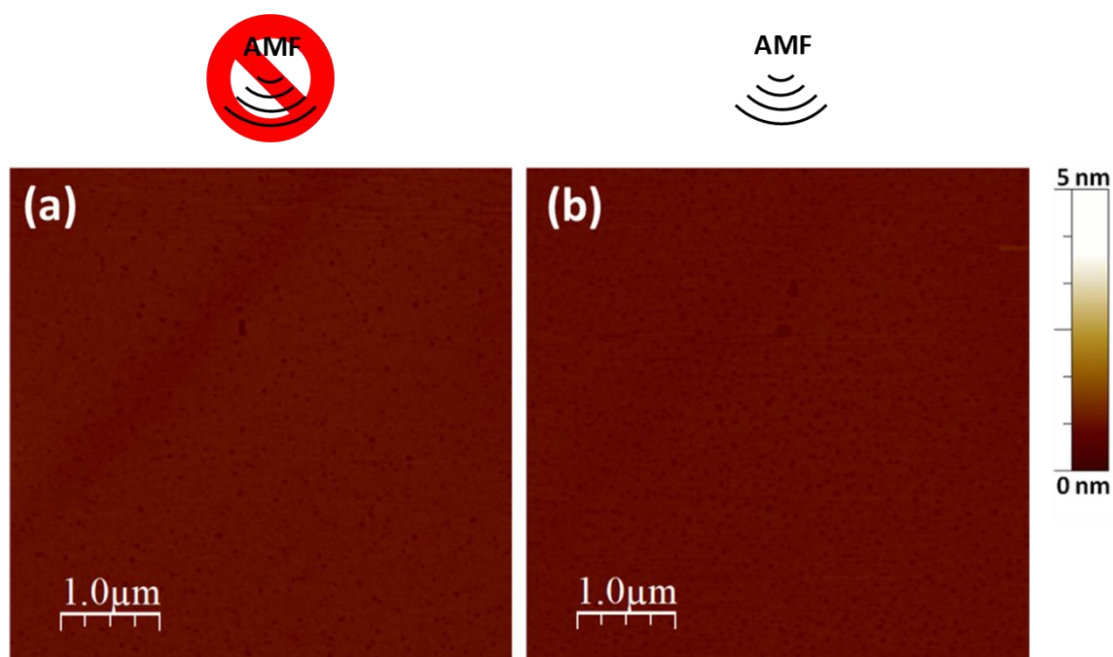


Figura 16. Imágenes topográficas de AFM de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ de la mica / DPPC:COL 1:1 (a) antes (a) y (b) después de la aplicación de un AMF.

Al objeto de descartar que las MNPs se hubieran incorporado a la membrana simulada por un incremento de la temperatura global en la muestra, se realizaron medidas *in situ* de la muestra controlando la temperatura de la misma mediante un Peltier en el mismo AFM. En este caso el estudio de los perfiles de altura para el sistema mica / DPPC:COL 1:1 / MNPs se llevó a cabo en muestras sujetas a un calentamiento progresivo desde temperatura ambiente hasta 40 y 60 °C. Las muestras estuvieron sometidas a estas temperaturas finales durante 90 minutos (el mismo tiempo que se aplicó el AMF). Tal y como se muestra en la Figura 17, se puede concluir que un aumento en la temperatura global del sistema no da como resultado una incorporación de las MNPs en la membrana simulada. Este resultado confirma que el calentamiento local de las MNPs que resulta después de la aplicación de un AMF es el responsable de la incorporación de las MNPs en la membrana. Además, a la vista de este resultado se puede pensar que el incremento de temperatura local inducido por la MNP al aplicar el AMF tiene que ser mayor que el alcanzado con el peltier, es decir, de 60 °C o que al generar un calor

localizado la fluidez es local y eso permite la incorporación de las MNPs a la membrana en cambio con el calentamiento global, no se fluidiza localmente por lo que el efecto observado es distinto. Se quiso llegar a temperaturas más altas con el Peltier pero las medidas topográficas de AFM no eran estables, por lo tanto, fue imposible registrar imágenes a temperaturas por encima de los 60 °C. Se realizaron medidas complementarias con un horno a temperaturas de 100 °C, pero al realizar la medida, una vez que se había enfriado la muestra no se apreciaron cambios en la altura de las MNPs.

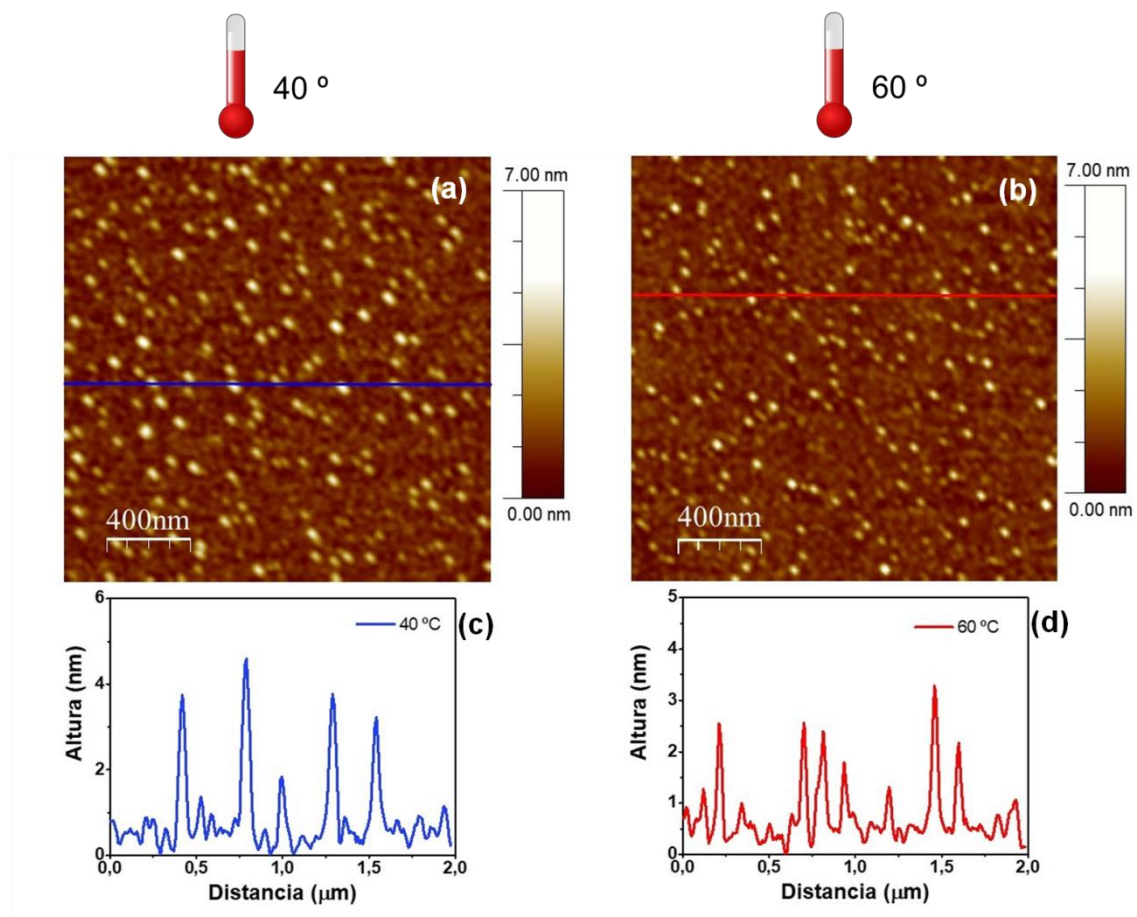


Figura 17. Imágenes topográficas de AFM de $2.0 \times 2.0 \mu\text{m}^2$ y sus correspondientes secciones transversales después de un calentamiento progresivo del sistema mica / DPPC:COL 1:1 / MNPs a 40 °C y 60 °C durante 90 minutos.

4. Conclusiones

En este capítulo se ha demostrado:

Que la técnica LB resulta muy conveniente para obtener una distribución homogénea de MNPs (no agregadas) distribuidas uniformemente sobre la superficie de una membrana simulada; posiblemente este hecho viene favorecido por interacciones de tipo van der Waals entre la cadena alquílica de los fosfolípidos y colesterol de la membrana y la cadena alquílica de las moléculas utilizadas para funcionalizar las MNPs (ácido oleico y oleamina).

Que la utilización de MNPs tiene un papel clave en la generación de un incremento de temperatura localizado al aplicarse un AMF que resulta en una fluidización de la membrana simulada en la región adyacente a la nanopartícula, fomentando la inserción de esta en la membrana.

Estos resultados demuestran el potencial que estas MNPs tienen como potenciales agentes terapéuticos empleando hipertermia magnética y utilizándolos como “nanocalentadores”.

5. Bibliografía

- (1) Mosayebi, J.; Kiyasatfar, M.; Laurent, S. *Synthesis, Functionalization, and Design of Magnetic Nanoparticles for Theranostic Applications*; 2017; Vol. 6.
- (2) Colombo, M.; Carregal-Romero, S.; Casula, M. F.; Gutierrez, L.; Morales, M. P.; Boehm, I. B.; Heverhagen, J. T.; Prospero, D.; Parak, W. J. *ChemInform Abstract: Biological Applications of Magnetic Nanoparticles. ChemInform* **2012**, *43* (35), no-no.
- (3) Dutz, S.; Hergt, R. Magnetic Particle Hyperthermia - A Promising Tumour Therapy? *Nanotechnology* **2014**, *25* (45).

- (4) Obaidat, I. M.; Issa, B.; Haik, Y. Magnetic Properties of Magnetic Nanoparticles for Efficient Hyperthermia. *Nanomaterials* **2014**, *5* (1), 63–89.
- (5) Maldonado-Camargo, L.; Torres-Díaz, I.; Chiu-Lam, A.; Hernández, M.; Rinaldi, C. Estimating the Contribution of Brownian and Néel Relaxation in a Magnetic Fluid through Dynamic Magnetic Susceptibility Measurements. *J. Magn. Magn. Mater.* **2016**, *412*, 223–233.
- (6) Tong, S.; Quinto, C. A.; Zhang, L.; Mohindra, P.; Bao, G. Size-Dependent Heating of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *ACS Nano* **2017**, *11* (7), 6808–6816.
- (7) Di Corato, R.; Espinosa, A.; Lartigue, L.; Tharaud, M.; Chat, S.; Pellegrino, T.; Ménager, C.; Gazeau, F.; Wilhelm, C. Magnetic Hyperthermia Efficiency in the Cellular Environment For different Nanoparticle Designs. *Biomaterials* **2014**, *35* (24), 6400–6411.
- (8) Asín, L.; Stepien, G.; Moros, M.; Fratila, R. M.; de la Fuente, J. M. Magnetic Nanoparticles for Cancer Treatment Using Magnetic Hyperthermia. In *Clinical Applications of Magnetic Nanoparticles*; CRC Press: Boca Raton : Taylor & Francis, 2018., 2018; pp 305–318.
- (9) Dutz, S.; Hergt, R. Magnetic Nanoparticle Heating and Heat Transfer on a Microscale: Basic Principles, Realities and Physical Limitations of Hyperthermia for Tumour Therapy. *Int. J. Hyperth.* **2013**, *29* (8), 790–800.
- (10) Shah, R. R.; Davis, T. P.; Glover, A. L.; Nikles, D. E.; Brazel, C. S. Impact of Magnetic Field Parameters and Iron Oxide Nanoparticle Properties on Heat Generation for Use in Magnetic Hyperthermia. *J. Magn. Magn. Mater.* **2015**,

- 387, 96–106.
- (11) Kobayashi, T. Cancer Hyperthermia Using Magnetic Nanoparticles. *Biotechnol. J.* **2011**, *6* (11), 1342–1347.
 - (12) Deatsch, A. E.; Evans, B. A. Heating Efficiency in Magnetic Nanoparticle Hyperthermia. *J. Magn. Magn. Mater.* **2014**, *354*, 163–172.
 - (13) Polo-Corrales, L.; Rinaldi, C. Monitoring Iron Oxide Nanoparticle Surface Temperature in an Alternating Magnetic Field Using Thermoresponsive Fluorescent Polymers. *J. Appl. Phys.* **2012**, *111* (7), 2010–2013.
 - (14) Riedinger, A.; Guardia, P.; Curcio, A.; Garcia, M. A.; Cingolani, R.; Manna, L.; Pellegrino, T. Subnanometer Local Temperature Probing and Remotely Controlled Drug Release Based on Azo-Functionalized Iron Oxide Nanoparticles. *Nano Lett.* **2013**, *13* (6), 2399–2406.
 - (15) Huang, H.; Delikanli, S.; Zeng, H.; Ferkey, D. M.; Pralle, A. Remote Control of Ion Channels and Neurons through Magnetic-Field Heating of Nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5* (8), 602–606.
 - (16) Munshi, R.; Qadri, S. M.; Zhang, Q.; Rubio, I. C.; del Pino, P.; Pralle, A. Magnetothermal Genetic Deep Brain Stimulation of Motor Behaviors in Awake, Freely Moving Mice. *Elife* **2017**, *6*, 1–26.
 - (17) Piñol, R.; Brites, C. D. S.; Bustamante, R.; Martínez, A.; Silva, N. J. O.; Murillo, J. L.; Cases, R.; Carrey, J.; Estepa, C.; Sosa, C.; et al. Joining Time-Resolved Thermometry and Magnetic-Induced Heating in a Single Nanoparticle Unveils Intriguing Thermal Properties. *ACS Nano* **2015**, *9* (3), 3134–3142.

- (18) Dias, J. T.; Moros, M.; Del Pino, P.; Rivera, S.; Grazú, V.; De La Fuente, J. M. DNA as a Molecular Local Thermal Probe for the Analysis of Magnetic Hyperthermia. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, *52* (44), 11526–11529.
- (19) Ali, A.; Zafar, H.; Zia, M.; Ul Haq, I.; Phull, A. R.; Ali, J. S.; Hussain, A. Synthesis, Characterization, Applications, and Challenges of Iron Oxide Nanoparticles. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **2016**, *9*, 49–67.
- (20) Fratila, R. M.; Navascuez, M.; Idiago-López, J.; Eceiza, M.; Miranda, J. I.; Aizpurua, J. M.; De La Fuente, J. M. Covalent Immobilisation of Magnetic Nanoparticles on Surfaces: Via Strain-Promoted Azide-Alkyne Click Chemistry. *New J. Chem.* **2017**, *41* (19), 10835–10840.
- (21) Moros, M.; Pelaz, B.; López-Larrubia, P.; García-Martin, M. L.; Grazú, V.; de la Fuente, J. M. Engineering Biofunctional Magnetic Nanoparticles for Biotechnological Applications. *Nanoscale* **2010**, *2* (9), 1746–1755.
- (22) Ruiz-Rincón, S.; González-Orive, A.; De La Fuente, J. M.; Cea, P. Reversible Monolayer-Bilayer Transition in Supported Phospholipid LB Films under the Presence of Water: Morphological and Nanomechanical Behavior. *Langmuir* **2017**, *33* (30), 7538–7547.
- (23) Vist, M. R.; Davis, J. H. Phase Equilibria of Cholesterol/Dipalmitoylphosphatidylcholine Mixtures: ²H Nuclear Magnetic Resonance and Differential Scanning Calorimetry. *Biochemistry* **1990**, *29* (2), 451–464.
- (24) Tanaka, M.; Sackmann, E. Polymer-Supported Membranes as Models of the Cell Surface. *Nature* **2005**, *437* (7059), 656–663.

- (25) Peetla, C.; Stine, A.; Labhasetwar, V. Biophysical Interactions with Model Lipid Membranes: Applications in Drug Discovery and Drug Delivery. *Mol. Pharm.* **2009**, *6* (5), 1264–1276.
- (26) Brezesinski, G.; Möhwald, H. Langmuir Monolayers to Study Interactions at Model Membrane Surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2003**, *100–102* (SUPPL.), 563–584.
- (27) Fernández-Botello, A.; Comelles, F.; Asunción Alsina, M.; Cea, P.; Reig, F. A Monolayer Study on Interactions of Docetaxel with Model Lipid Membranes. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (44), 13834–13841.
- (28) Lipkowski, J. Building Biomimetic Membrane at a Gold Electrode Surface. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12* (42), 13874–13887.
- (29) Li, Q.; Kartikowati, C. W.; Horie, S.; Ogi, T.; Iwaki, T.; Okuyama, K. Correlation between Particle Size/Domain Structure and Magnetic Properties of Highly Crystalline Fe₃O₄ Nanoparticles. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 9894.
- (30) Ruiz-Rincón, S.; González-Orive, A.; Grazú, V.; Fratila, R. M.; Fuente, J. M. de la; Cea, P. Altering Model Cell Membranes by Means of Localized Magnetic Heating. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2020**, *196*, 111315.

Capítulo 5.

Reconocimiento de la Concanavalina A en glicosfingolípidos incorporados en modelos de membrana celulares e interacción de nanopartículas magnéticas con y sin alquino

1. Introducción

Las membranas celulares son estructuras laminares formadas principalmente por fosfolípidos, colesterol, glúcidos y proteínas. Juegan un papel esencial en los organismos vivos ya que son las responsables de limitar, dar forma y de actuar como barreras permeables entre el interior (medio intracelular) y el exterior (medio extracelular). La integridad de la célula va a depender de esa capacidad de separación y del mantenimiento del equilibrio entre ambos medios. Además, toda la interacción y comunicación celular tiene lugar a través de estas membranas. Son las encargadas de regular la entrada y liberación de sustancias entre el citoplasma y el medio extracelular. El estudio exhaustivo de estos procesos que tienen lugar se ve dificultado en ocasiones por la elevada complejidad del sistema. Por lo tanto, ser capaces de imitar esta membrana celular nos permitiría estudiar y evaluar de una manera más sencilla todos estos procesos ocurridos entre un agente externo y la membrana a nivel molecular.^{1,2}

Para comprender mejor la organización estructural, las propiedades mecánicas y las funciones de las biomembranas se han creado modelos que logran imitar estas membranas celulares. Existen diversos métodos para la fabricación de membranas biomiméticas: liposomas, vesículas, monocapas insolubles de Langmuir y bicapas lipídicas soportadas sobre sustratos, entre otros.³⁻⁵ Para ello las técnicas Langmuir-Blodgett y Langmuir-Schaefer constituyen estrategias eficaces para la fabricación de membrana celulares a la vez que producen bicapas altamente ordenadas y libres de defectos.^{6,7} Se trabajará con DPPC (Dipalmitoilfosfatidilcolina) y colesterol (COL), el cual es un componente esencial en la membrana de células animales y responsable de su fluidez en la transición de fase de las bicapas lipídicas.⁸⁻¹⁰

Tal y como se ha podido ver en capítulos anteriores, este sistema nos ha permitido estudiar el comportamiento de ambos compuestos entre sí y cómo se organizan cuando

están en contacto con un medio líquido. Asimismo, este sistema nos ha hecho posible estudiar la interacción de estos compuestos con nanopartículas magnéticas (MNPs). Pero nuestro objetivo final es que la interacción que tiene lugar entre las MNPs y los compuestos de la membrana celular, sean específicas. Para conseguir inmovilizar las MNPs en la membrana celular, se pueden seguir varias estrategias, las más comunes son la unión covalente a grupos funcionales presentes de forma natural en las biomoléculas de la superficie celular (por ejemplo, aminas o tioles)¹¹ a grupos funcionales presentes en la superficie de los nanomateriales. Esta es la estrategia que hemos desarrollado en esta Tesis. En este capítulo se muestran los resultados obtenidos mediante la unión covalente a través de química clic biortogonal de MNPs funcionalizadas con grupos alquinos a grupos azida incorporados en membranas celulares simuladas, tal y como se ha mostrado en capítulos anteriores, mediante glicosfingolípidos (GSL), y reduciendo al máximo posible interacciones inespecíficas con las mismas.

El objetivo final de este trabajo consiste en inducir un calentamiento controlado y localizado de la membrana celular usando nanopartículas magnéticas utilizando el calor liberado de las MNP unidas covalentemente a la membrana celular, para de esta manera intentar conseguir un aumento local de la temperatura que induzca una mayor permeabilidad de la membrana celular.

Para conseguir este objetivo, en la preparación de las membranas simuladas, se va a utilizar un glicosfingolípido sintético (GSL), sintetizado por el grupo de Daniel B Werz, y cuya estructura está compuesta por un β -D-glucósido y dos cadenas lipídicas (2S,3R,4E)-2-(tetracosanamido)-4-octadecene-1,3-diol, dos cadenas hidrocarbonadas de diferente longitud que le confieren insolubilidad en agua y favorecen las interacciones laterales de van der Waals entre moléculas vecinas. Con objeto de conferirle reactividad, el monosacárido incorpora un grupo azida en la posición 6 de su anillo capaz de

reaccionar con un grupo alquino mediante química clic. Este grupo azida puede ser empleado para su reacción covalente mediante tres mecanismos diferentes de actuación: actuando como nucleófilo, electrófilo y a través de reacciones de adición y cicloadición. En este último caso, el grupo azida actúa como un dipolo frente al grupo alquino que es el dipolarófilo.¹²

Desde que, en 2001, K. Barry Sharpless definió el nuevo término de la química clic como un “conjunto de reacciones potentes, rápidas, selectivas y de alto rendimiento”¹³, esta estrategia ha sido ampliamente utilizada en múltiples áreas de conocimiento entre las que destacan la ciencia de los materiales, la química y la biotecnología.^{14,15} Las reacciones que se engloban dentro del concepto de química clic se caracterizan en que son modulares, de amplio alcance, tienen altos rendimientos, generan subproductos que son inocuos y se eliminan de una manera sencilla. También son reacciones estereoespecíficas y tienen una alta estabilidad fisiológica. Además, este tipo de reacciones deben tener condiciones de reacción simples, utilizar reactivos que sean fácilmente accesibles y utilizar un disolvente que se pueda eliminar de una manera sencilla. Por último, otra característica importante es que deben ser exotérmicas, es decir, que no necesiten de un aporte energético externo. Así, estas reacciones ocurren de una manera rápida y tienden a producir selectivamente un solo producto.

Además de todos estos requisitos, en nuestro caso, es importante que sea una química clic bioortogonal, es decir, que no interactúe con ninguna funcionalidad biológica y que se dé en condiciones fisiológicas y con reactivos no tóxicos. Es por todo esto que en esta Tesis se ha seleccionado una cicloadición de azida-alquino para modificar químicamente nuestras membranas biomiméticas con MNPs (Figura 1).

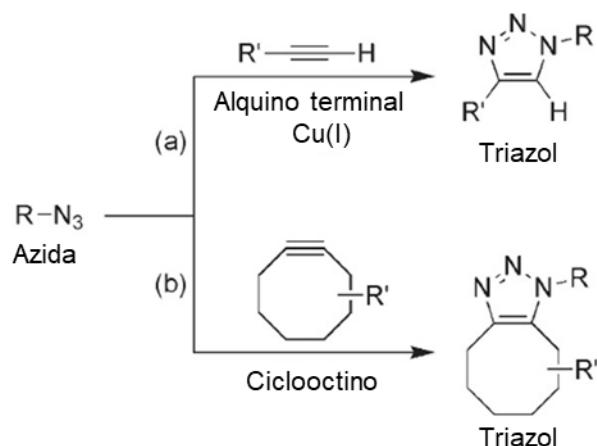


Figura 1. Cicloadiciones de azida-alquino [3 + 2]. (a) Cicloadición de azida-alquino catalizada por Cobre (Cu) de azidas y alquinos terminales para formar 1,2,3-triazoles disustituídos en 1,4. (b) Cicloadición de azidas y ciclooctinos (sin la presencia de Cu) para formar productos de triazol.

Este tipo de cicloadiciones pueden llevarse a cabo en presencia o en ausencia de Cu(I). En el primer caso (Figura 1.a), la concentración del catalizador de cobre debe mantenerse a un nivel suficientemente alto durante toda la reacción. Se suele utilizar CuAAC, que es la combinación de Cu(II) con un agente reductor para proporcionar el Cu(I) in situ. Por ejemplo, se utilizan CuSO₄ o el ascorbato de sodio, ya que son dos reactivos económicos y fácilmente disponibles. En presencia de un agente reductor, la reacción es menos susceptible a oxidarse y, por lo tanto, puede llevarse a cabo sin atmósfera inerte. Sin embargo, esta cicloadición no es bioortogonal, ya que requiere la utilización de Cu, que presenta cierta toxicidad. Es por ello que para esta tesis se ha optado por la cicloadición azida-ciclooctino (Figura 1.b), que no requiere de cobre ya que emplea un ciclooctino en vez de un alquino terminal. La tensión de este anillo permite la activación de grupo alquino sin requerir de ningún catalizador. De esta manera, puede reaccionar de manera eficiente y selectiva con azidas en mezclas biológicas, incluidas en las superficies de células vivas.

Es por ello, que en este capítulo se ha empleado este tipo de reacciones, y que para ello necesitamos disponer de un grupo azida localizado en la superficie de la membrana celular simulada. Esto se ha conseguido a través del empleo de un GSL que incorpora este grupo, para que posteriormente reaccione con un grupo ciclooctino presente en las nanopartículas funcionalizadas adecuadamente para este fin. De esta manera, al depositar las MNPs con el ciclooctino reaccionarán de manera específica con el grupo azida de la membrana a través de química clic bioortogonal.

Hay que tener en cuenta que realizar un marcado covalente y que además sea selectivo de biomoléculas concretas, especialmente en células, no es fácil, ya que en el entorno biológico están presentes numerosos grupos funcionales además del grupo azida, como aminas (NH_2) y tioles (SH)¹¹ que pueden interferir con la reacción de química clic bioortogonal entre la azida y el alquino.

En el caso de querer aplicar esta estrategia en células vivas, es necesario realizar el marcaje con grupos azida en la membrana celular. Para ello se tendría que utilizar una estrategia de modificaciones de las membranas in vivo, llamada ingeniería glicometabólica, que permite introducir varios grupos funcionales en el glicocálix de la célula mediante el empleo de monosacáridos no naturales incorporando grupos funcionales capaces de dirigir reacciones químicas concretas sobre las mismas. Estos monosacáridos serán metabolizados por la célula, incorporando en la membrana celular estos grupos funcionales. En nuestro caso, se puede utilizar tetraacil N-azidoacetil manosamina (Ac_4ManNAz , Figura 2). Este monosacárido posee un grupo azida en posición 2 y que se encuentra totalmente peracetilado. Este grado de acetilación va a favorecer la internalización del mismo en la célula.¹⁶

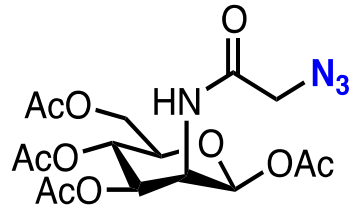


Figura 2. Estructura de la *N*-azidoacetil manosamina tetraacilada (*Ac*₄*ManNAz*).

Una vez que el monosacárido es internalizado por la célula, se hidroliza por la esterasa citoplásmica a *N*- α -azidoacetilmanosamina (*ManNAz*). *ManNAz* se convierte en ácido siálico a través de cinco pasos enzimáticos y luego se acopla al final de la cadena de azúcar, exponiendo el grupo azida al exterior de la membrana celular¹² (Figura 3). El objetivo final es unir covalentemente las MNPs funcionalizadas con el grupo alquino a la membrana celular a través de química de clic bioortogonal.

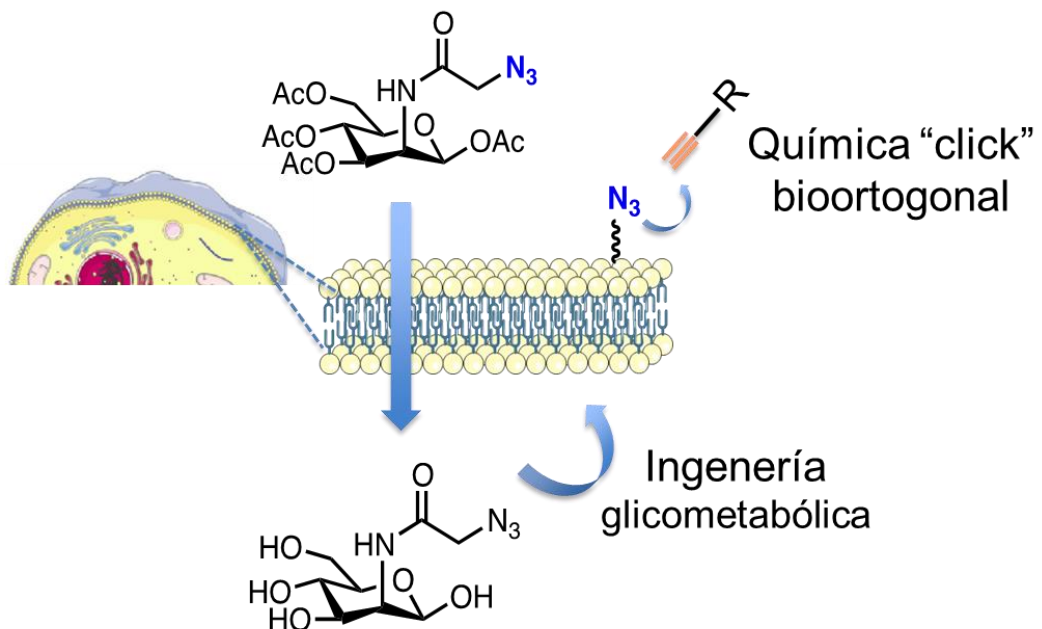


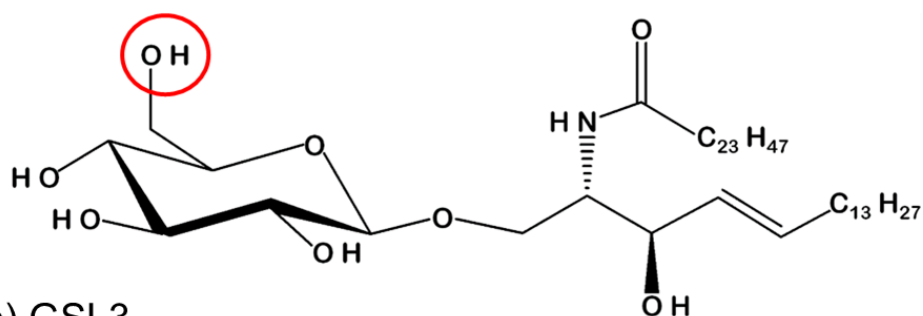
Figura 3. Unión covalente mediante química “clic” bioortogonal de un grupo alquino al grupo azida presente en la membrana celular, incorporado a la célula por ingeniería glicometabólica.

2. Resultados y discusión

2.1 Caracterización de los diferentes glicosfingolípidos (GSL) por microscopía de ángulo de Brewster (BAM), ATR y RAMAN

En este capítulo, se han empleado diferentes glicosfingolípidos GSLs (Figura 4) con objeto de poder simular de esta manera la membrana celular y estudiar la eficiencia de la química clic sobre la misma. Para ello, el grupo del Prof. Daniel B. Werz (Technische Universität Braunschweig (Alemania)) nos ha proporcionado una colección de estos GSL incorporando un grupo azida. Estos GSLs están compuestos por un monosacárido y dos cadenas lipídicas. El monosacárido es una β -D-glucosa con un grupo azida o un grupo OH incorporado en el carbono 6 del anillo de glucosa. Gracias a esta estructura y que su tamaño se asemeje a otros lípidos utilizados en esta tesis como el DPPC (Dipalmitoilfosfatidilcolina), los convierte en excelentes candidatos para estudiar el comportamiento de los GSLs al ser mezclados con DPPC y colesterol a la hora de formar membranas lipídicas. Los dos GSLs empleados son el $C_{48}H_{93}NO_8$ (GSL1) y el $C_{48}H_{92}N_4O_7$ (GSL3) (Figura 4).

a) GSL1



b) GSL3

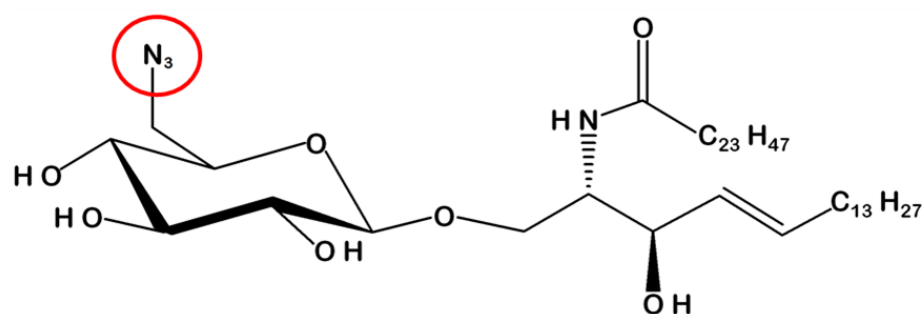


Figura 4. Estructura de los glicosfincolípidos (GSLs). La diferencia entre ambos es que el GSL1 (a) tiene un grupo OH en el carbohidrato C-6, en cambio el GSL3 (b) tiene un grupo azida N_3 .

Para observar cómo se van formando las películas de GSL sobre la subfase, se empleó la microscopía de ángulo de Brewster (BAM) de los GSL1 y GSL3. Cuando se registran las isothermas π -A se puede hacer simultáneamente imágenes mediante Microscopía de ángulo de Brewster (BAM) dándonos información de los dominios que se van formando en la interfase aire-agua mientras la película de Langmuir se va comprimiendo. En las Figuras 5 y 6 se observa tanto la isoterma de presión superficial versus área por molécula del GSL correspondiente como las diferentes imágenes de BAM obtenidas a las presiones superficiales indicadas de 8, 15, 25, 35 y 50 $mN \cdot m^{-1}$. Tal como se puede observar, se forman monocapas que no presentan agregados tridimensionales

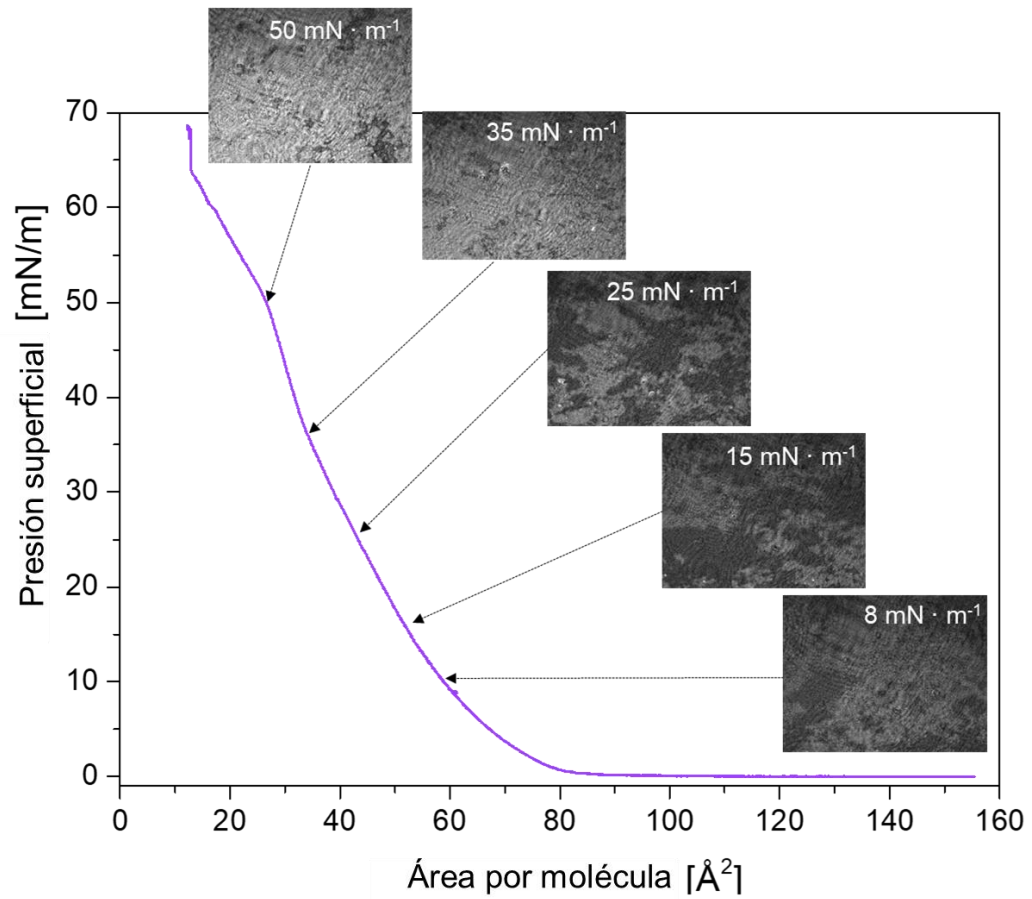


Figura 5. Isotherma presión superficial versus área por molécula e imágenes de microscopía de ángulo de Brewster (BAM) de la película GSL1 en agua a 20 °C. Las imágenes BAM corresponden a presiones superficiales de 8, 15, 25, 35 y 50 mN · m⁻¹

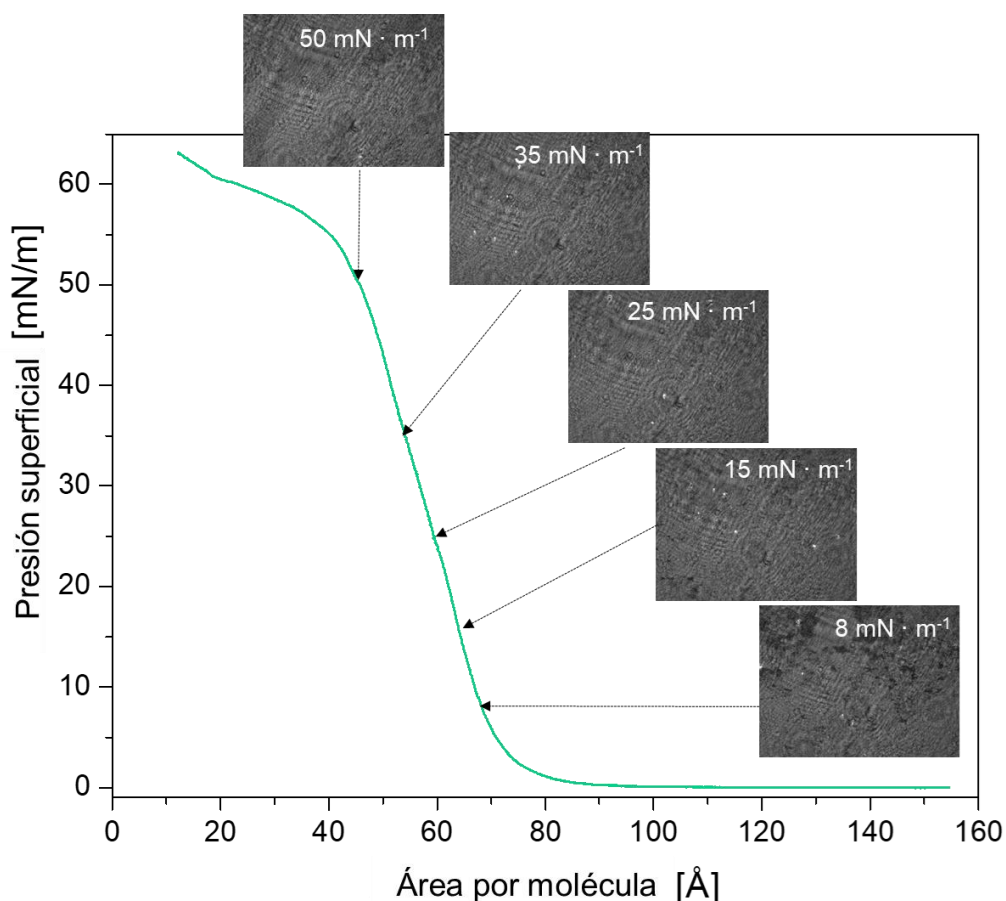


Figura 6. Isoterma pressão superficial versus área por molécula e imagens de microscopia de ângulo de Brewster (BAM) de la película GSL3 en agua a 20 °C. Las imágenes BAM corresponden a presiones superficiales de 8, 15, 25, 35 y 50 $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$

Con objeto de caracterizar los grupos funcionales presentes en GSL1 y en GSL3, se procedió a realizar sus espectros RAMAN y ATR. La espectroscopía RAMAN se trata de una técnica fotónica de alta resolución que es capaz de utilizar la interacción de la luz con la materia proporcionando espectros característicos de las vibraciones específicas de una molécula, y por lo tanto permitiendo identificar los grupos funcionales que ésta presenta. Por otra parte, la espectroscopía de reflectancia total atenuada (ATR), utilizada como método de muestreo en espectrómetros de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR), permite la obtención de un espectro infrarrojo de absorción o emisión que proporciona un espectro de reflexión, por el cual es posible realizar una identificación del tipo de enlaces y grupos funcionales de los materiales presentes en la muestra.

En nuestro caso, ambos compuestos tienen una estructura base similar, con la salvedad que el glicosfingolípido GSL1 posee un grupo hidroxilo (-OH) en el C6 del anillo piranosido, mientras que el glicosfingolípido GSL3 posee un grupo azida (-N₃). Tal y como se observa en las Figuras 7 se muestran los espectros de RAMAN de ambas moléculas y una comparativa del GSL1 y el GSL3. Era de esperar que la diferencia principal entre estos dos espectros estuviera en la aparición de una banda en el rango de los 2000 cm⁻¹ correspondiente al grupo azida en el caso del GSL3. Tal como se marca en la Figura 7.c, esta banda no aparece. Una razón para que esta banda no aparezca en este tipo de espectroscopia, es que la molécula contenga un centro de inversión. En ese caso las bandas RAMAN y las bandas IR son mutuamente excluyentes, es decir, el enlace podrá ser activo en Raman o en IR, pero no en los dos casos. Por otro lado, aquellos grupos funcionales con cambios fuertes en sus dipolos, deberían de observarse más nítidamente mediante FTIR, mientras que aquellos que tienen cambios débiles o tienen mucha simetría, se verán mejor en Raman.

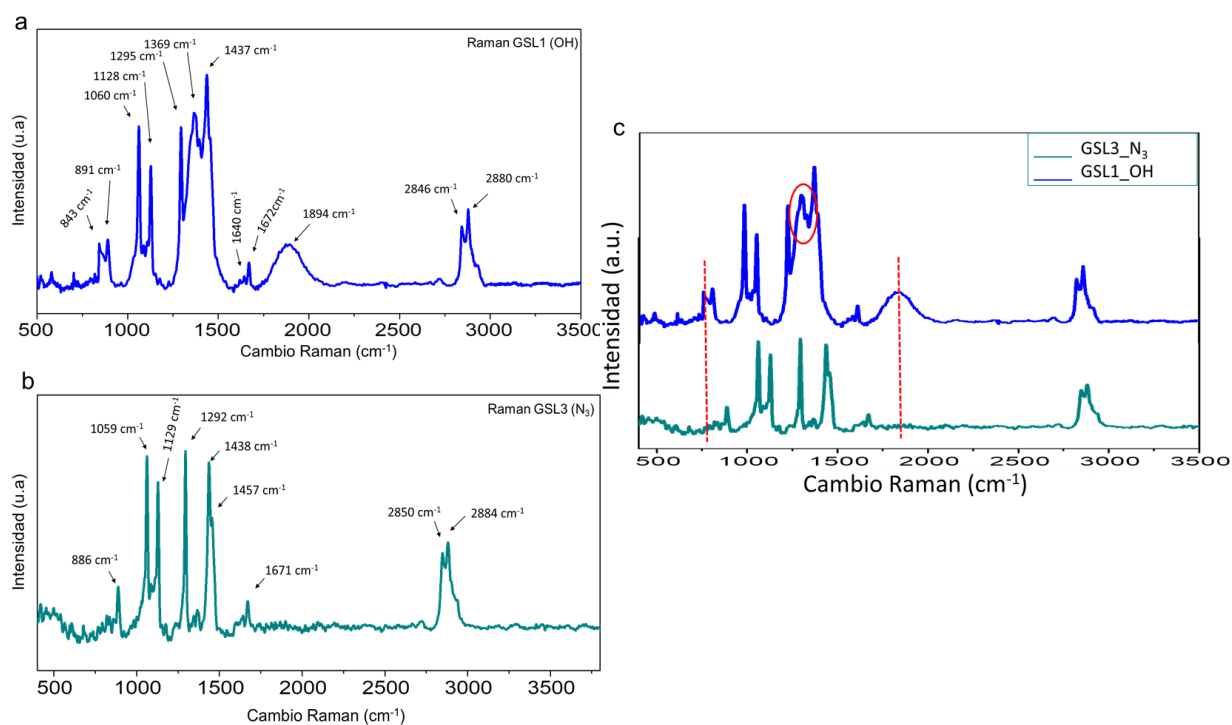


Figura 7.a) Espectro de RAMAN del GSL; b) Espectro de RAMAN del GSL3; c) Comparativa de los espectros RAMAN para el GSL1 y el GSL3.

En cambio, tal y como se puede ver en la Figura 8 donde se muestran los espectros de ATR del GSL1 y GSL3, sí que se observa la banda característica del grupo azida para el GSL3 en torno a los 2000 cm^{-1} , confirmándose de esta manera la presencia de este grupo funcional en dicha molécula.

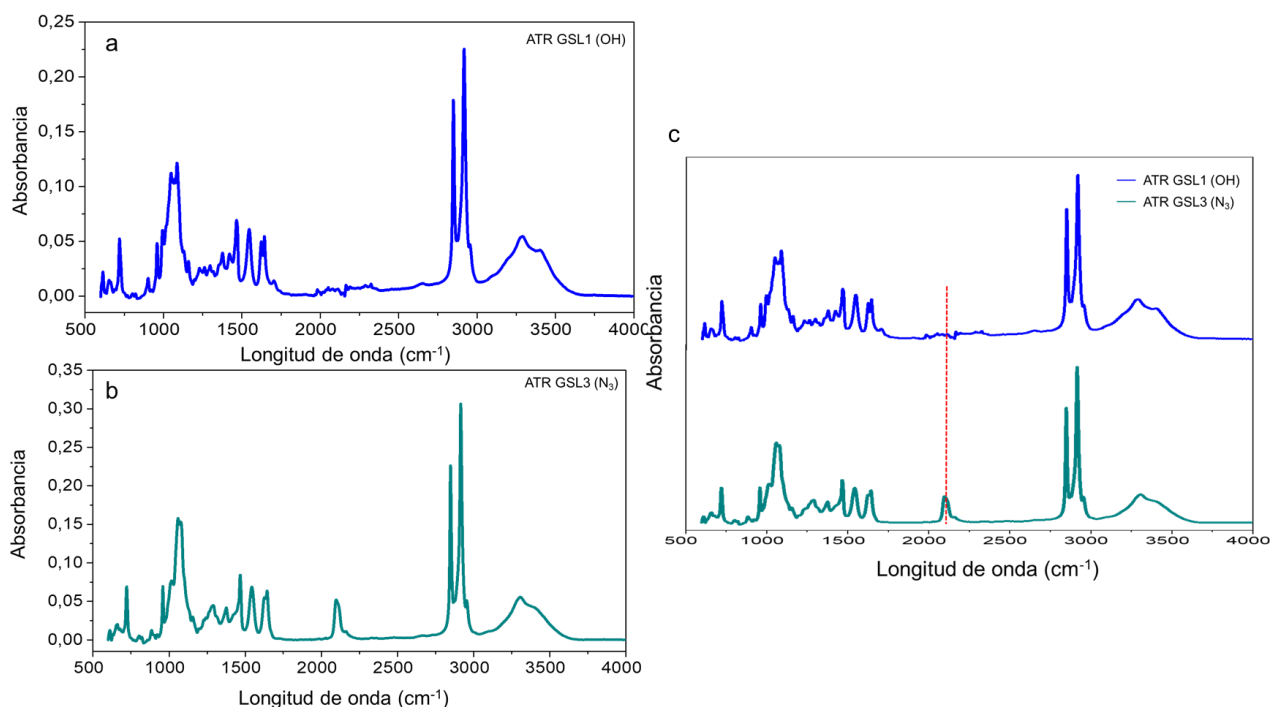


Figura 8. a) Espectro ATR del GSL1, b) Espectro ATR del GSL3, c) Comparativa del espectro ATR del GSL1 y GSL3.

2.2 Estudio interacción GSL-Concanavalina A (ConA) y GSL-PPB (Fosfina-PEG-Biotina)

Con objeto de poder inmovilizar nanopartículas magnéticas mediante química bioortogonal sobre estas membranas, tal y como se ha comentado anteriormente, se ha

trabajado en la incorporación del GSL3, el cual incorpora un grupo azida en la posición C6 de anillo de piranosa. Para ello, este glicosfingolípido se ha incorporado a la membrana mediante la fabricación de una monocapa de DPPC:Colesterol 1:1 sobre mica depositada por la técnica de Langmuir-Blodgett ($35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) tal y como se ha indicado anteriormente (Capítulo 3- Preparación y caracterización de membranas celulares simuladas). A continuación, se llevó a cabo una transferencia de esta monocapa por la técnica de Langmuir-Schaefer a $8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ sobre la monocapa de DPPC: Colesterol 1:1 (más información en el Capítulo 2. Materiales y métodos).

Tal y como se puede ver en la Figura 9 en la cual se muestra una imagen topográfica de AFM para esta película, se observa la presencia de zonas más oscuras correspondientes a mica sin recubrir, alguna región recubierta solo por la capa de DPPC:COL, y regiones más externas correspondientes a las regiones recubiertas por el glicosfingolípido. Tras evaluar el nivel de recubrimiento superficial obtenido, se observó que prácticamente toda la superficie está recubierta por DPPC:COL, obteniéndose un porcentaje de recubrimiento del 90%. Además, en torno al 68% de la superficie está recubierta con el GSL3, correspondiente a la zona más clara en la imagen de AFM. Si se hace una relación entre ambos porcentajes se obtiene que un 74% de la muestra contiene el GSL3 sobre la capa de DPPC:COL. En la Figura 9.c se muestran los diferentes valores de alturas obtenidas incluyendo su sección transversal correspondiente.

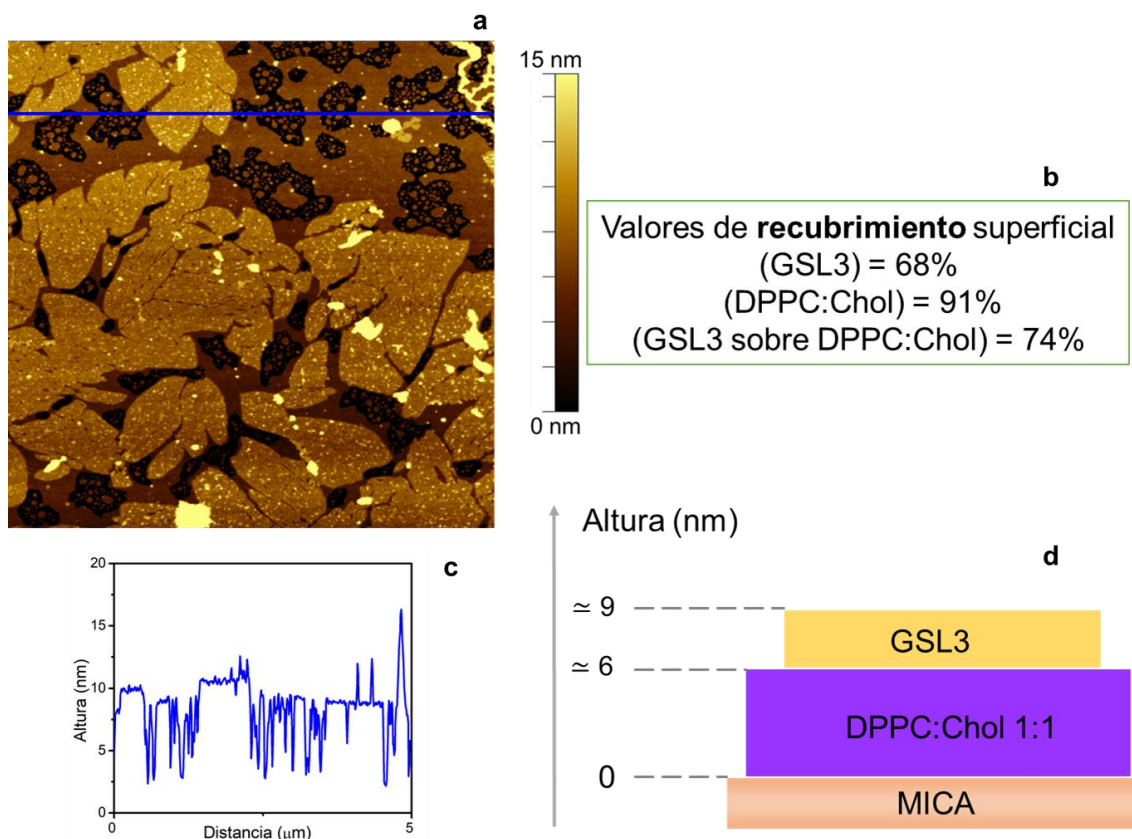


Figura 9. a) Imagen topográfica de AFM correspondiente a DPPC:COL 1:1 y el GSL3 depositado por LS; b) Valores del recubrimiento del DPPC:COL y el GSL3, valores sacados de la imagen topográfica; c) sección transversal correspondiente; d) esquema donde se muestra las diferentes alturas obtenidas.

Con objeto de demostrar que las moléculas de glicosfingolípido depositadas sobre estas capas son funcionales y el GSL3 queda expuesto de una manera adecuada, se ha optado por el uso de lectinas. Las lectinas son biomoléculas capaces de reconocer de manera específica y reversible determinados carbohidratos.¹⁷

En este caso concreto se ha seleccionado la concanavalina A (ConA), originalmente extraída del frijol, *Canavalia ensiformis*. La ConA fue una de las primeras lectinas disponible comercialmente, y se usa ampliamente en biología y bioquímica para caracterizar glicoproteínas y otras moléculas que contienen grupos glicosídicos, en concreto residuos de glucosa y manosa. También se usa para purificar macromoléculas

glicosiladas mediante cromatografía de afinidad de lectina, así como para estudiar la regulación inmune por varias células inmunitarias.^{18,19} Como en la mayoría de las lectinas, la ConA está formada por 1, 2 o 4 subunidades dependiendo del pH del medio. Cada subunidad tiene un peso molecular de 26.5KDa, cuenta con 235 aminoácidos, es muy glicosilada y se une a un átomo metálico, generalmente Mn^{2+} y un Ca^{2+} . A $pH \geq 7$, la ConA está en forma de tetrámero,^{20,21} tal y como se ve en la Figura 10.

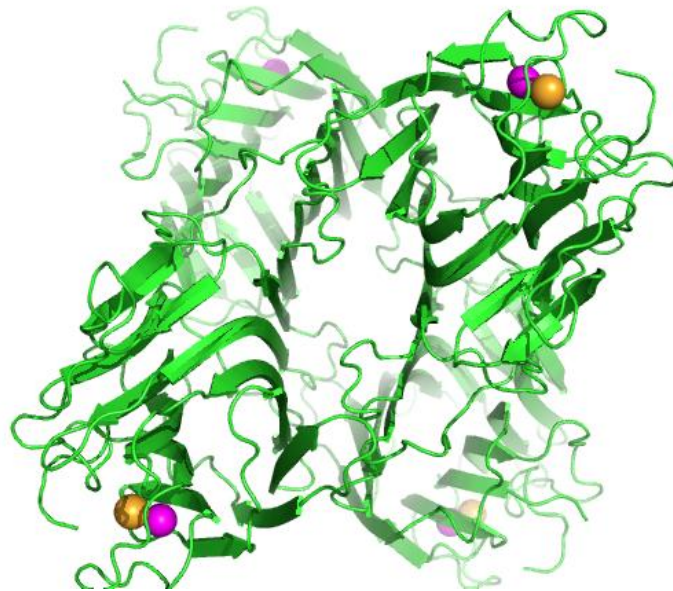


Figura 10. Estructura de la ConA a $pH \geq 7$ donde se observan las 4 subunidades que forman parte del tetrámero. Imagen obtenida con Pymol.

Con objeto de identificar la presencia del GSL3 sobre las superficies modificadas, se va a emplear esta ConA aprovechando su alta afinidad por manosa y por glucosa.²² Para ello se incubó la membrana previamente descrita con una disolución de ConA en PBS (pH 7,4) durante 5h. Se decidió trabajar a este pH para garantizar que la lectina se encontrara en forma tetramérica y de esta manera incrementar su tamaño. En presencia

del GSL3, y ya que integra una molécula de β -D glucosa del GSL, la ConA quedará unida a este azúcar de manera específica.

En la Figura 11a se muestran los resultados obtenidos a través de una imagen topográfica de AFM. En ella se observa que se ha depositado más material en aquellas muestras que presentan GSL3, con un recubrimiento superficial entorno al 60%, correspondiendo bastante bien con el recubrimiento del 68% obtenido para la muestra con GSL3 (Figura 12b). Por otro lado, también se observa un aumento en la altura de la sección transversal, confirmando de esta manera la presencia del GSL3 en la membrana preparada.

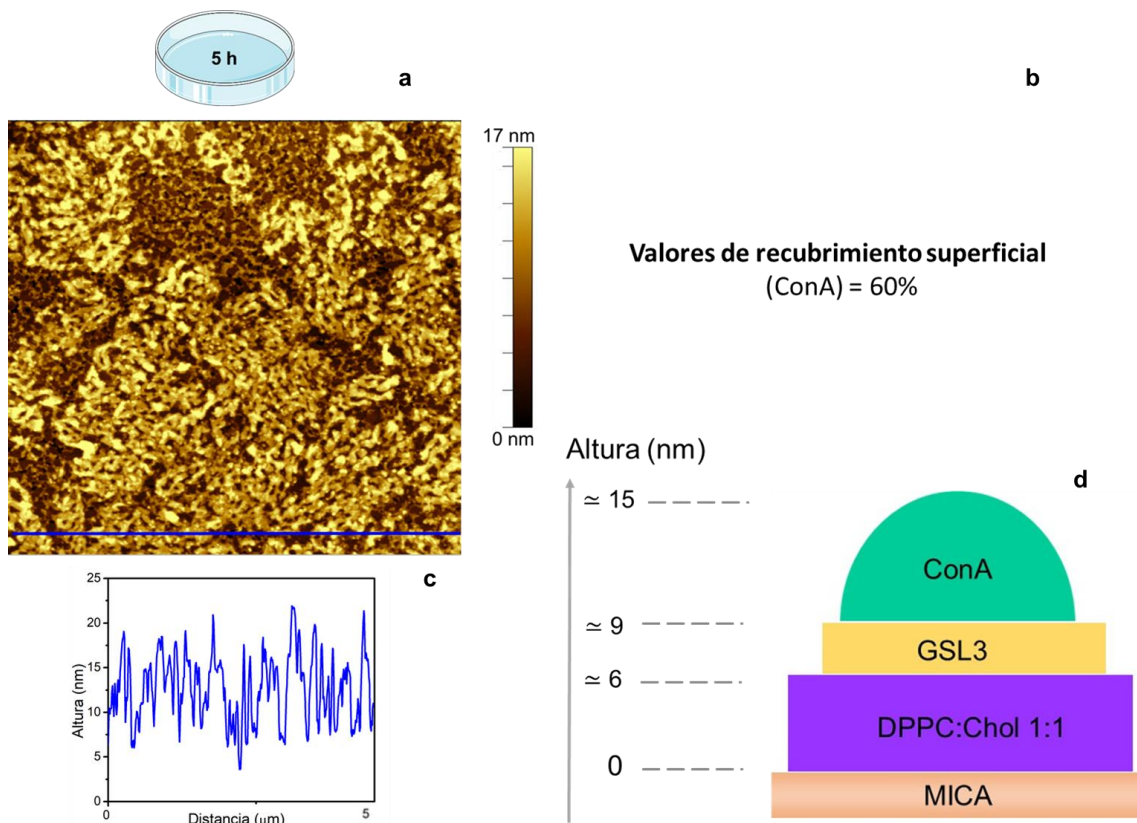


Figura 11. a) Imagen topográfica de AFM correspondiente a DPPC:COL 1:1 y GSL3 depositado por LS incubado 5 horas con ConA en buffer de PBS, b) Valores del recubrimiento

de la ConA c) sección transversal correspondiente d) esquema donde se muestra las diferentes alturas obtenidas.

Con objeto de poder cuantificar y monitorizar todo el proceso de funcionalización de los sustratos, se ha optado por realizar medidas a través de una microbalanza de cuarzo (QCM). La QCM nos permite observar cambios de masa con una alta sensibilidad. Esto es posible mediante la ecuación de Sauerbrey²³ que nos relaciona el cambio de la frecuencia de piezoeléctrico, con un cambio en la masa. La microbalanza de cuarzo está construida con un disco de cuarzo con dos electrodos en ambas caras, por lo tanto, cuando se deposita una cierta cantidad de masa se genera un campo en una frecuencia de resonancia. (Para más información de la técnica se encuentra en el capítulo de materiales y métodos “Microbalanza de cuarzo”). Gracias a esta técnica podemos verificar si se cumple cuantitativamente lo mismo que se observa en las imágenes topográficas de AFM. Para ello se caracterizó la muestra del GSL3 con la QCM y se estudió el cambio de masa en cada una de las transferencias.

Tabla 1. Resultados de la diferencia de masa obtenida con la QCM

	Diferencia de masa en $\mu\text{gramos}/\text{cm}^2$	Diferencia de moles/ cm^2
Transferencia de DPPC:COL 1:1 por LB	$\Delta m = 0,4947$	$\Delta m = 8.85 \cdot 10^{-10}$
LS del GSL (con el grupo azida)	$\Delta m = 0,2297$	$\Delta m = 1,1863 \cdot 10^{-9}$

ConA (5 h. + Ca ²⁺)	$\Delta m = 0,5565$	$\Delta m = 2,18 \cdot 10^{-11}$
---------------------------------	---------------------	----------------------------------

Con estos resultados mostrados en la Tabla 1, se observa que por cada mol de GSL, se deposita 0,02 moles de ConA, lo que tiene consistencia con la diferencia en área que ocupan las diferentes moléculas, y además se corrobora con las imágenes obtenidas de recubrimiento de AFM antes mencionadas.

Otra forma de demostrar la presencia del glicosfingolípido 3 en la membrana preparada, sería a través del grupo azida que ésta presenta. Para ello se ha empleado la molécula fosfina-PEG₃ biotina (PPB). El grupo fosfina reacciona con los grupos azida a través de una reacción de Staudinger (Figura 12) mediante ataque nucleófilo del fósforo de la fosfina al nitrógeno terminal de la azida, dando lugar a un óxido de fosfina y una amina, con desprendimiento de nitrógeno gaseoso.^{12,24} Gracias a la presencia de biotina en el PPB, posteriormente esta biotina podría ser identificada mediante el empleo de estreptavidina,²⁵ debido a la alta afinidad de unión que tiene esta con la biotina. En el caso particular de esta tesis doctoral, no se va a emplear la estreptavidina, ya que el interés radica solamente en la fosfina, el PPB se había utilizado con anterioridad en nuestro grupo de investigación.

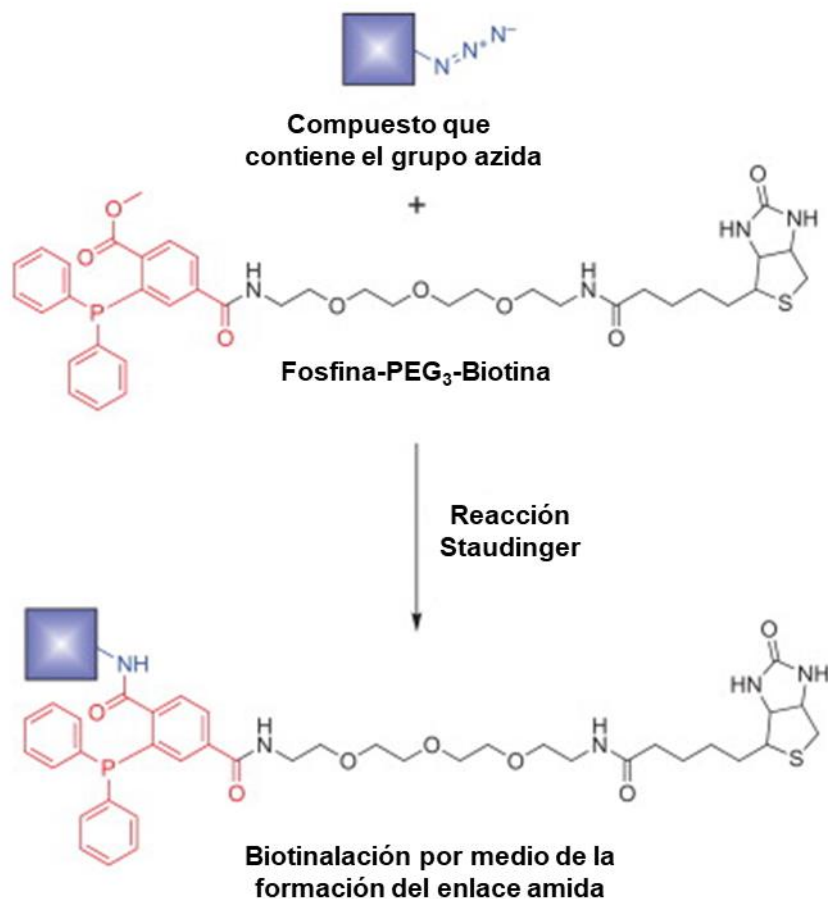


Figura 12. Reacción de Staudinger que se da entre un compuesto que contiene grupo azida y la PPB. Imagen Adaptada de Greg T. Hermanson,²⁵ in *Bioconjugate Techniques (Third Edition)*, 2013

En la Figura 13 se muestran los resultados obtenidos tras la incubación de los sustratos de DPPC:COL:GSL1 y DPPC:COL:GSL3 tras su incubación con PPB durante 30 minutos. Tal y como se muestra en el esquema (Figura 13 c y d), el PPB debería reaccionar sólo en el caso del GSL3 a través del grupo azida ahí presente. En el caso del GSL1, ya que carece de este grupo, no se debería de dar reacción de ningún tipo. En las imágenes topográficas de AFM se puede observar como en la Figura 13.b más estructuras tridimensionales sobre las áreas recubiertas por GSL.

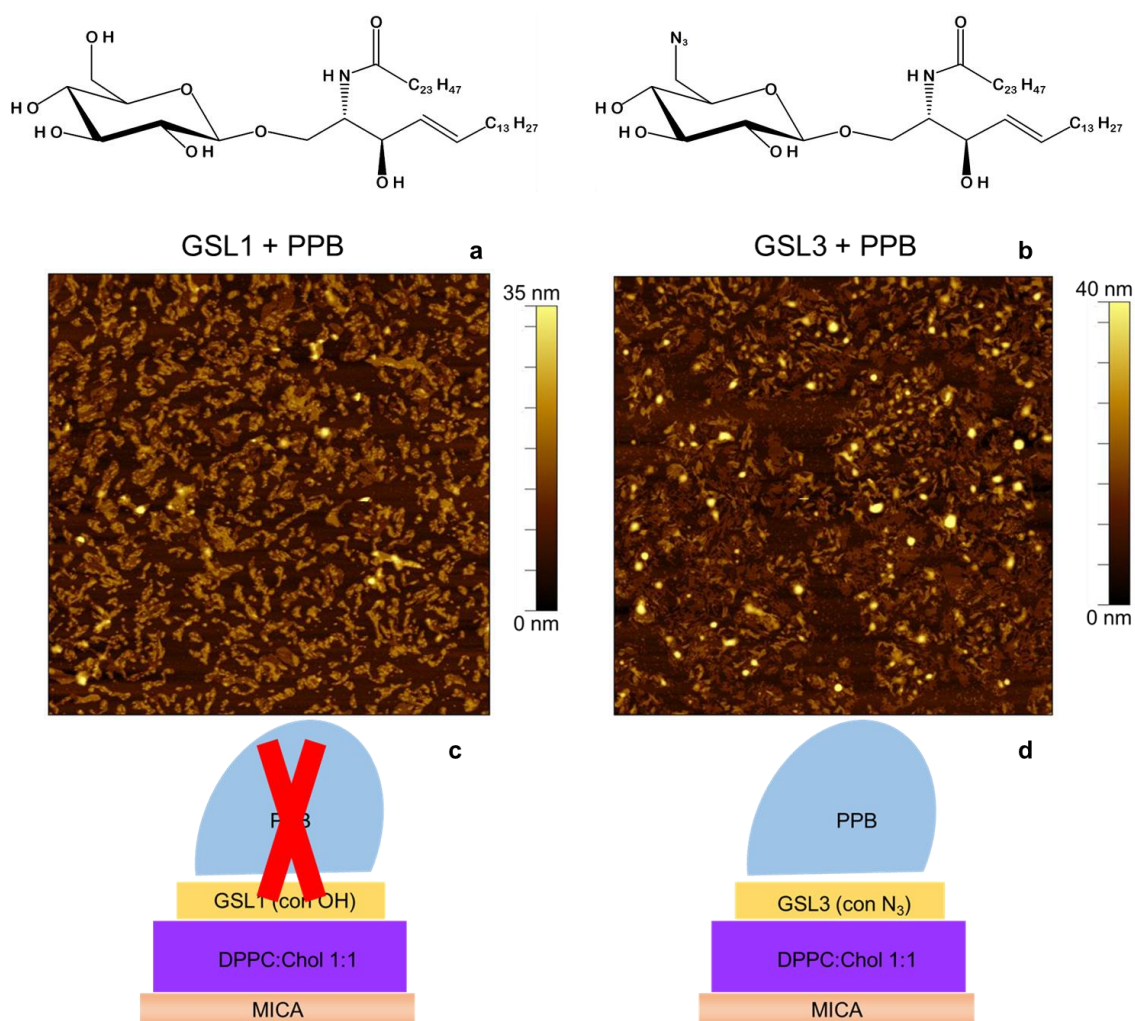


Figura 13. a) Imagen topográfica de AFM correspondiente a GSL1 incubado en PPB b) Imagen topográfica de AFM correspondiente a GSL3 incubado en PPB c) esquema que representa el proceso que tiene lugar con el GSL1, el que tiene el OH d) esquema que representa el proceso que tiene lugar con el GSL3, el que tiene la azida y que sí que tendría que unirse a la PPB.

2.3 Incorporación de las MNPs en las películas DPPC:COL + GSL3 con y sin alquino.

Como se ha mencionado anteriormente el objetivo final de este capítulo es anclar las MNPs funcionalizadas con alquino al grupo azida que contiene el glicoesfingolípido GSL3. Por lo tanto, una vez que hemos comprobado qué dominios de la película de

DPPC:COL + GSL3 corresponden al glicosfingolípido mediante los estudios llevados a cabo con la ConA y el PPB, el siguiente paso es incorporar las MNPs a la película.

Para ello se han seleccionado dos tipos de MNPs, unas derivatizadas con cadenas de polietilenglicol (PEG) y grupos ciclooctinos (MNP-alquino) y su control correspondiente a la que no se ha incorporado dicho grupo (MNP-control).²⁶⁻²⁸ (Estas nanopartículas han sido mostradas con más detalles en el Capítulo 2-Materiales y métodos “Síntesis de las MNPs”). Basándonos en estudios previos de nuestro grupo de investigación,²⁹ se han seleccionado dos tiempos de incubación diferentes de las nanopartículas con las membranas, 1 y 24 horas. Previamente habíamos visto que la cinética de reacción entre el ciclooctino y moléculas derivatizadas con un grupo azida, tenía lugar en menos de una hora. Es de esperar, que en el caso de utilizar MNPs derivatizadas con ciclooctinos, esta cinética sea más lenta debido al impedimento estérico que puede provocar el PEG o que la concentración de los grupos alquino que rodea la MNP sea más baja de lo que se tiene en disolución. En la actualidad se está realizando un estudio más exhaustivo de esta cinética empleando MNPs y que es objeto de otra tesis doctoral.

La incubación de las MNPs con la membrana de DPPC:COL 1:1 + GSL3 se llevó a cabo a una concentración $0.04 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Fe, se incubaron una hora o 24 horas en un vial, tal y como está descrito en materiales y métodos y después se lavó la muestra con abundante agua para quitar cualquier exceso de MNPs, se dejó secar toda la noche y al día siguiente se midió por AFM.

Para poder realizar una comparativa de la incorporación de las MNPs, con y sin alquino en la membrana de DPPC:COL 1:1 + GSL3, se han seleccionado imágenes de AFM de dimensiones $2 \times 2 \mu\text{m}^2$. En la Figura 17.a se observa como las MNPs con alquino

sobre la película de DPPC:COL 1:1 + GSL3 se distribuyen de manera homogénea, sin formar agregados.

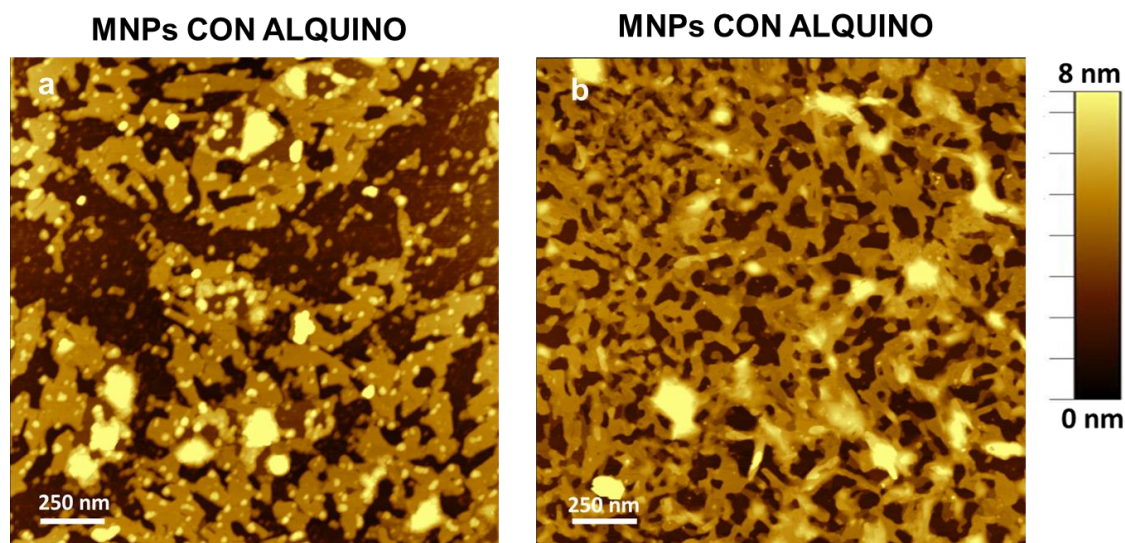


Figura 17 a) MNPs con alquino incubadas en agua durante una hora sobre la película de DPPC:COL 1:1 + GSL3 b) MNPs con alquino incubadas en agua durante una hora sobre la película de DPPC:COL 1:1 + GSL3

Si se compara el recubrimiento superficial de las MNPs incubadas una hora es muy diferente si se trata de las MNPs funcionalizadas con alquino o sin alquino. En la Figura 17a, la densidad superficial de las MNPs es de 13-14% frente al 0,8% de recubrimiento de las MNPs en la Figura 17.b. Hay que tener en cuenta a la hora de analizar estos datos que en la Figura 17.b, quizá no se puedan apreciar las MNPs porque tenemos una gran cantidad de GSL3 depositado sobre la superficie y nos dificulta el poder observar las MNPs. Aun así, si tenemos esto en consideración, una mayor cantidad de GSL3, implicaría mayor número de grupos azida en la superficie, por lo que nos llevaría a una mayor incorporación de las MNPs. Por lo tanto, se puede verificar que se han incorporado una mayor cantidad de MNPs cuando estas están funcionalizadas con el grupo alquino produciéndose la química clic bioortogonal.

Se realizaron dos pruebas más de control incubando las MNPs con alquino con el sustrato de mica y las MNPs incubadas con la monocapa del DPPC:COL 1:1 sin el GSL por el mismo procedimiento y tiempo, una hora, lavando con agua cualquier exceso y dejando secar a temperatura ambiente y no se observó la incorporación de las MNPs en la mica ni en la monocapa de DPPC:COL sin el GSL.

Pero si aumentamos el tiempo de incubación de las MNPs a 24 horas, se produce una adsorción inespecífica de las MNPs sobre la película de DPPC:COL y GSL 3. En la Figura 18 se muestran los resultados obtenidos, Figura 18.a corresponde a las MNPs con alquino y la Figura 18.b a las MNPs sin alquino y se observa que se han unido MNPs inespecíficamente. Por lo tanto, esta reacción tiene que darse a tiempos más cortos, de una hora para no tener adsorciones inespecíficas.

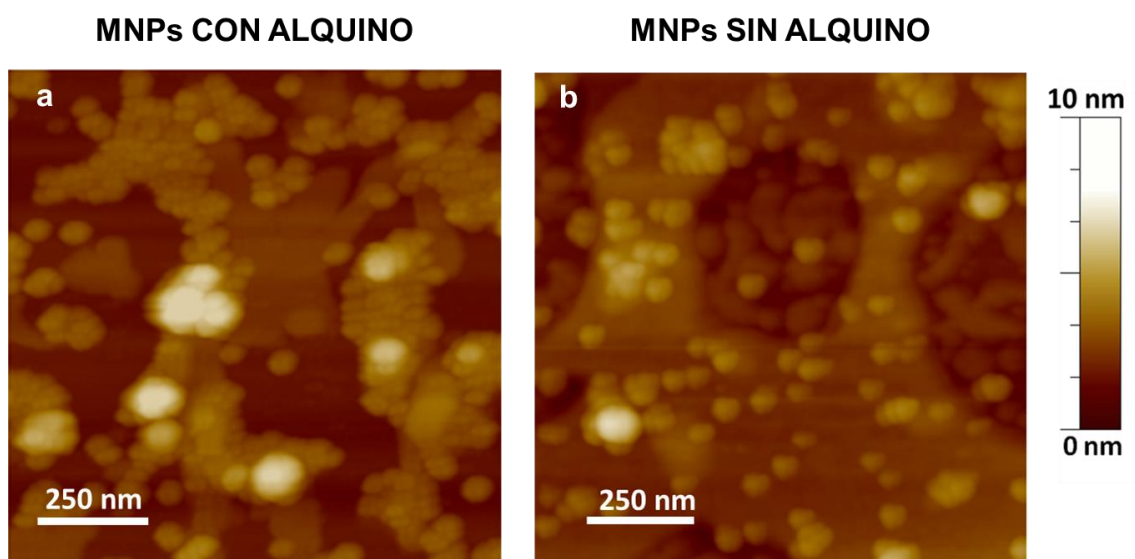


Figura 18 a) MNPs con alquino incubadas en agua durante 24 horas sobre la película de DPPC:COL 1:1 + GSL3 b) MNPs con alquino incubadas en agua durante 14 horas sobre la película de DPPC:COL 1:1 + GSL3

Aunque sea necesaria una mayor optimización en la funcionalización de las MNPs y en la incorporación de estas en las membranas simuladas de DPPC:COL 1:1 + GSL3, estos resultados preliminares nos muestran que es posible realizar la química clic

bioortogonal en las membranas simuladas consiguiendo la incorporación de las MNPs en los grupos azida de la membrana celular.

3. Conclusiones

La ConA se ha depositado por afinidad al GSL y se ha identificado que dominios de la película corresponden al glicoesfingolípido.

La fosfina-PEG3-biotina (PPB) se ha unido al grupo azida del GSL3, por lo tanto, se corrobora que tenemos en la superficie grupos azida que van a poder interactuar con el grupo alquino de las MNPs

Para realizar el anclaje del grupo alquino de las MNPs con el grupo azida del glicoesfingolípido se necesita un tiempo de incubación de una hora, con tiempos de incubación mayores se produce una adsorción inespecífica de las MNPs.

Con estos resultados preliminares se puede concluir que es posible realizar la química clic bioortogonal en las membranas simuladas consiguiendo la incorporación de las MNPs en los grupos azida de la membrana celular.

4. Bibliografía

- (1) Jurak, M. Thermodynamic Aspects of Cholesterol Effect on Properties of Phospholipid Monolayers: Langmuir and Langmuir-Blodgett Monolayer Study. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117* (13), 3496–3502.
- (2) Wydro, P.; Knapczyk, S.; Łapczyńska, M. Variations in the Condensing Effect of Cholesterol on Saturated versus Unsaturated Phosphatidylcholines at Low and High Sterol Concentration. *Langmuir* **2011**, *27* (9), 5433–5444.
- (3) Haro, M.; Giner, B.; Lafuente, C.; López, M. C.; Royo, F. M.; Cea, P. Proton Sponge and Fatty Acid Interactions at the Air-Water Interface. Thermodynamic,

- Spectroscopic, and Microscopic Study. *Langmuir* **2005**, *21* (7), 2796–2803.
- (4) Anariba, F.; DuVall, S. H.; McCreery, R. L. Mono- and Multilayer Formation by Diazonium Reduction on Carbon Surfaces Monitored with Atomic Force Microscopy “Scratching.” *Anal. Chem.* **2003**, *75* (15), 3837–3844.
- (5) Gericke, A.; Hühnerfuss, H. The Conformational Order and Headgroup Structure of Long-Chain Alkanoic Acid Ester Monolayers at the Air/Water Interface. *Berichte der Bunsengesellschaft für Phys. Chemie* **1995**, *99* (4), 641–650.
- (6) Ruiz-Rincón, S.; González-Orive, A.; De La Fuente, J. M.; Cea, P. Reversible Monolayer-Bilayer Transition in Supported Phospholipid LB Films under the Presence of Water: Morphological and Nanomechanical Behavior. *Langmuir* **2017**, *33* (30), 7538–7547.
- (7) Aroti, A.; Leontidis, E.; Dubois, M.; Zemby, T. Effects of Monovalent Anions of the Hofmeister Series on DPPC Lipid Bilayers Part I: Swelling and in-Plane Equations of State. *Biophys. J.* **2007**, *93* (5), 1580–1590.
- (8) Toimil, P.; Prieto, G.; Miñones, J.; Sarmiento, F. A Comparative Study of F-DPPC/DPPC Mixed Monolayers. Influence of Subphase Temperature on F-DPPC and DPPC Monolayers. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12* (40), 13323–13332.
- (9) Krause, M. R.; Regen, S. L. The Structural Role of Cholesterol in Cell Membranes: From Condensed Bilayers to Lipid Rafts. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47* (12), 3512–3521.
- (10) Redondo-Morata, L.; Giannotti, M. I.; Sanz, F. Influence of Cholesterol on the Phase Transition of Lipid Bilayers: A Temperature-Controlled Force Spectroscopy Study. *Langmuir* **2012**, *28* (35), 12851–12860.

- (11) Stephan, M. T.; Irvine, D. J. Enhancing Cell Therapies from the Outside In: Cell Surface Engineering Using Synthetic Nanomaterials. *Nano Today* **2011**, *6* (3), 309–325.
- (12) Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R. Cu-Free Click Cycloaddition Reactions in Chemical Biology. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (4), 1272–1279.
- (13) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40* (11), 2004–2021.
- (14) Arseneault, M.; Wafer, C.; Morin, J.-F. Recent Advances in Click Chemistry Applied to Dendrimer Synthesis. *Molecules* **2015**, *20* (5), 9263–9294.
- (15) Patterson, D. M.; Nazarova, L. A.; Prescher, J. A. Finding the Right (Bioorthogonal) Chemistry. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9* (3), 592–605.
- (16) Kayser, H.; Zeitler, R.; Kannicht, C.; Grunow, D.; Nuck, R.; Reutter, W. Biosynthesis of a Nonphysiological Sialic Acid in Different Rat Organs, Using N-Propanoyl-D-Hexosamines as Precursors. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (24), 16934–16938.
- (17) Ajit Varki, Richard D Cummings, Jeffrey D Esko, Hudson H Freeze, Pamela Stanley, Carolyn R Bertozzi, Gerald W Hart, and M. E. E. C. S. H. (NY). *Essentials of Glycobiology*; **1999**.
- (18) Turner, G. A. N-Glycosylation of Serum Proteins in Disease and Its Investigation Using Lectins. *Clin. Chim. Acta.* **1992**, *208* (3), 149–171.
- (19) Kucik, D. F.; Elson, E. L.; Sheetz, M. P. Weak Dependence of Mobility of Membrane Protein Aggregates on Aggregate Size Supports a Viscous Model of Retardation of Diffusion. *Biophys. J.* **1999**, *76* (1 I), 314–322.
- (20) Huet, M. Factors Affecting the Molecular Structure and the Agglutinating Ability

- of Concanavalin A and Other Lectins. *Eur. J. Biochem.* **1975**, *59* (2), 627–632.
- (21) Edelman, G. M.; Cunningham, B. A.; Reeke Jr, G. N.; Becker, J. W.; Waxdal, M. J.; Wang, J. L. The Covalent and Three-Dimensional Structure of Concanavalin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1972**, *69* (9), 2580–2584.
- (22) Sumner, J. B.; Howell, S. F. Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. *J. Bacteriol.* **1936**, *32* (2), 227–237.
- (23) Sauerbrey, G. Verwendung von Schwingquarzen Zur Wägung Dünner Schichten Und Zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Phys.* **1959**, *155* (2), 206–222.
- (24) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15046–15047.
- (25) Greg T. Hermanson, E. *Bioconjugate Techniques*; 2013.
- (26) Moros, M.; Pelaz, B.; López-Larrubia, P.; García-Martin, M. L.; Grazú, V.; de la Fuente, J. M. Engineering Biofunctional Magnetic Nanoparticles for Biotechnological Applications. *Nanoscale* **2010**, *2* (9), 1746–1755.
- (27) Storm, G.; Belliot, S. O.; Daemen, T.; Lasic, D. D. Surface Modification of Nanoparticles to Oppose Uptake by the Mononuclear Phagocyte System. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1995**, *17* (1), 31–48.
- (28) Moros, M.; Hernáez, B.; Garet, E.; Dias, J. T.; Sáez, B.; Grazú, V.; González-Fernández, Á.; Alonso, C.; de la Fuente, J. M. Monosaccharides versus PEG-Functionalized NPs: Influence in the Cellular Uptake. *ACS Nano* **2012**, *6* (2), 1565–1577.
- (29) Fratila, R. M.; Navascuez, M.; Idiago-López, J.; Eceiza, M.; Miranda, J. I.; Aizpurua, J. M.; De La Fuente, J. M. Covalent Immobilisation of Magnetic Nanoparticles on Surfaces: Via Strain-Promoted Azide-Alkyne Click Chemistry.

New J. Chem. **2017**, *41* (19), 10835–10840.

Capítulo 6.

Influencia de la nanorugosidad del sustrato en las propiedades nanomecánicas y nanotribológicas de bicapas lipídicas soportadas

1. Introducción. Importancia de la curvatura.

Las membranas biológicas son estructuras laminadas formadas principalmente por fosfolípidos, colesterol, glúcidos, proteínas. Son las responsables de conferir integridad a la célula y juegan un papel fundamental en muchos de los procesos celulares como señalización, ataque de patógenos, respuesta inflamatoria...,^{1,2} pero, además, existen muchos procesos celulares tales como el crecimiento, la división, la movilidad,³⁻⁵ en los que los intermedios estructurales generan curvaturas y las membranas celulares experimentan cambios conformacionales. Así mismo en el interior de la célula existen estructuras que presentan cierta curvatura como en las membranas plegadas de muchos orgánulos, los cilios o las mitocondrias. Además, hay lípidos que están formando parte de la membrana celular que están más predispuestos a la curvatura, así como algunas proteínas.⁶

Se ha demostrado previamente que las membranas celulares son capaces de modular sus curvaturas de una manera localizada dependiendo de la concentración de lípidos o proteínas que las componen.^{7,8} Por lo tanto, se pueden generar diferentes curvaturas como resultado de las redistribuciones espaciales y formación de dominios.^{3,4}

Comprender los mecanismos que hay detrás de todos esos procesos celulares y en particular el papel que juega la composición química y la distribución de los componentes de la membrana, así como el balance de las fuerzas que actúan entre estos componentes es esencial. Como resultado de este interés por comprender las fuerzas que operan a nivel molecular han surgido los modelos de membranas celulares, tal y como hemos descrito ya en capítulos anteriores, así como otras metodologías que incluyen el uso de vesículas o polímeros⁹ en los que es posible tener un mayor control de los procesos que tienen lugar.

Las ventajas de utilizar modelos de membrana celulares en lugar de utilizar vesículas libres, es la capacidad que tienen las primeras estar soportadas en un sustrato sólido lo que permite realizar estudios más exhaustivos de la superficie empleando técnicas microscópicas, entre las que se destaca la microscopia de fuerza atómica. Además, al estar soportadas en un sustrato, es posible generar defectos en éste mediante unas ondulaciones superficiales, con un radio de curvatura o una longitud de onda determina,⁵ permitiendo simular aquellos procesos celulares en los que se generan intermedios con curvaturas.

En el área de los biosensores y en biotecnología de células y tejidos se ha utilizado recientemente la combinación del concepto de membrana lipídica soportada con su deposición en sustratos modificados topográficamente.¹ Así, la comprensión de la formación de los modelos de membrana SBLs (bicapas lipídicas soportadas) sobre superficies rugosas tales como sustratos sólidos porosos o sustratos recubiertos con una capa de nanopartículas,¹⁰ es relevante para avanzar en el diseño de biosensores basados en superficies nanoporosas. Otros muchos fenómenos pueden también ser analizados con esta metodología como, por ejemplo, estudiar de qué manera las NPs al ser inhaladas interaccionan con las capas pulmonares tensioactivas.^{11,12} Importante también en este contexto es la rugosidad del sustrato en la nanoescala, ya que dicha rugosidad aumenta la distancia media entre el sustrato y la bicapa y disminuye la energía de adhesión cuando las ondulaciones del sustrato son más bajas que la altura de la capa. Además, modificaciones en la rugosidad del sustrato también contribuyen a alterar otras propiedades físicas. Tradicionalmente, los sustratos se clasifican atendiendo a 3 rangos de rugosidad en función de la escala de irregularidades de la superficie del material atendiendo al tamaño de las ondulaciones que presenta la superficie: superficies macro-rugosas (aquellas con ondulaciones desde 100 μm hasta unos pocos milímetros), micro-rugosas (en el rango de 1 μm a 100 μm), y superficies nano-rugosas (valores por debajo

de los 100 nm).¹³ En nuestro caso, nos vamos a centrar en sustratos que tienen una superficie nano-rugosa, es decir, ondulaciones por debajo de los 100 nm.

Existe un número limitado de antecedentes en este tipo de estudios, entre los que nos gustaría destacar las siguientes contribuciones:

- Babak y colaboradores⁹ analizaron cómo se ensamblan los lípidos en superficies curvas y observaron como en la parte curva del sustrato hay una mayor densidad de lípidos, ya que se detectó una mayor intensidad en la fluorescencia. De este estudio se concluyó que la organización de los fosfolípidos autoensamblados en superficies curvas es función la curvatura del sustrato.
- Swain y colaboradores¹⁴ sugirieron que pequeñas periodicidades de la superficie topográfica (menos de 31 nm) pueden disminuir considerablemente - más de un 10% - la energía de adhesión de la membrana en el sustrato.
- Florence y colaboradores¹⁵ depositaron modelos de membranas sobre sustratos con ondulaciones nanométricas demostrando que hay una fuerte relación entre la curvatura de la membrana y su fluidez. Recuérdese que la fluidez, como se ha visto en el capítulo 4 (*Efecto de la aplicación de campos magnéticos locales sobre nanopartículas magnéticas depositadas sobre sistemas modelo de membranas celulares*), es una propiedad clave para muchas funciones de la membrana celulares, tales como adhesión o la señalización. Estos estudios, investigan la relación entre la topografía de la superficie y el coeficiente de difusión de los lípidos de las SBLs en dos tipos diferentes de superficies rugosas con una amplitud y longitud de onda típicas de 20 y 50 nm respectivamente, en vidrio y silicio y

observaron una disminución en el coeficiente de difusión (D) cuando los SBLs se depositaron en superficies con una rugosidad entre 0.15 y 0.25 nm.

- Florence y colaboradores también¹⁵ demostraron que una asimetría en el empaquetamiento de los lípidos de la doble capa lipídica puede inducir un aumento en los parámetros de orden local: coeficiente de difusión o rigidez en membranas con radio de curvatura entre 10 y 40 nm.
- Tayabeti y colaboradores,¹⁶ han demostrado experimentalmente, como al aumentar la rugosidad de una superficie decrece el efecto de las fuerzas de adhesión y de fricción y por lo tanto los lípidos son menos propensos a colapsar cuando se ponen en contacto con el sustrato.

1.1 La microscopia de fuerza atómica (AFM). Propiedades nanomecánicas y nanotribológicas.

La aparición de nuevas técnicas microscópicas para la caracterización materiales y superficies, tales como el AFM han posibilitado un avance significativo en la comprensión de los procesos de fricción (o tribología) en la escala atómica (nanotribología). El AFM permite estudiar la interacción entre los niveles atómicos de dos superficies (fricción), desgaste, lubricación y adherencia.¹⁷

El AFM también permite estudiar propiedades mecánicas y estructurales de los materiales en los sistemas biológicos.¹⁸⁻²¹ A través de AFM-FS (Espectroscopia de fuerzas, curvas de fuerza-indentación) se pueden determinar las propiedades mecánicas y elásticas de biomateriales e incluso de células enteras.^{22,23} Esta técnica nos proporciona información útil en sistemas biológicos para poder conocer su comportamiento mecánico y como ya se ha visto en capítulos anteriores realizando curvas de fuerza también se puede

evaluar cómo es la dureza de un material y poder obtener el valor de su módulo elástico en el rango de la nanoescala.

En capítulos previos de esta tesis doctoral se ha visto cómo se depositan las SBLs sobre sustratos de mica (hidrofílica). Para más información en el capítulo de materiales y métodos. A lo largo de este capítulo se van a estudiar las SBLs depositadas en sustratos planos de silicio, con una hidrofiliidad parecida a la mica, y en sustratos de silicio con ondulaciones en su superficie confiriendo nanorugosidad al sustrato. En la Figura 1 se puede observar la representación esquemática del estudio que se va a llevar a cabo en este capítulo comparando el comportamiento de la bicapa sobre un sustrato de silicio plano Figura 1.a y sobre un sustrato de silicio nanorugoso (la rugosidad se consigue mediante bombardeo de iones con una ondulación de $\lambda=24$ nm), Figura 1.b.

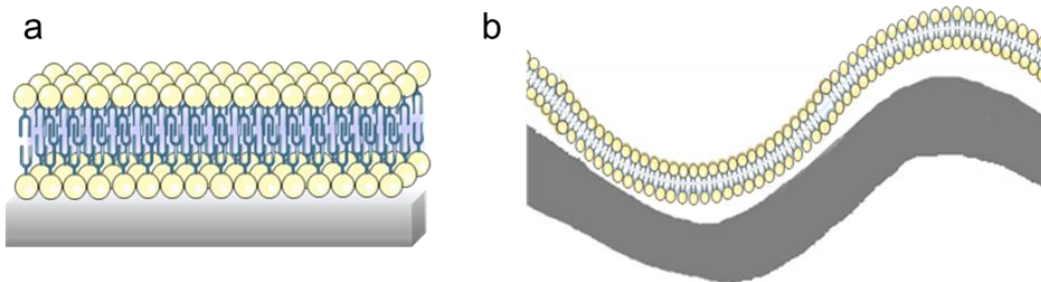


Figura 1. Representación esquemática de bicapa de DPPC:COL 1: 1 sobre un sustrato de silicio plano (a). Representación esquemática de bicapa de DPPC:COL 1: 1 sobre un sustrato de silicio nano-rugoso (b).

Este último estudio, nos dará una idea más exacta del comportamiento de la membrana celular, ya que, por un lado, las superficies con las que interaccionan dichas membranas no van a ser planas y, además, las membranas lipídicas adoptan de forma natural determinadas curvaturas. Por lo tanto, es fundamental conocer el efecto que tiene el sustrato sobre el empaquetamiento de los lípidos y averiguar cómo crece la bicapa sobre

sustratos que presentan cierta rugosidad, u ondulaciones a escala nanométrica. Al utilizar moléculas anfifílicas se puede estudiar en detalle cómo se van reorganizando y conocer la capacidad que tienen los fosfolípidos para ensamblarse en diferentes sustratos, o bien planos o que presenten patrones con unas ondulaciones determinadas.

La densidad de empaquetamiento de los lípidos sobre el sustrato va a depender tanto de su carácter hidrofóbico o hidrofílico como de su rugosidad.

En este capítulo se va a analizar el impacto de la nano-rugosidad de los sustratos en los modelos de membrana, estudiando las propiedades nanomecánicas y nanotribológicas de los SLBs. Se estudiará también la evolución temporal de una monocapa homogénea hasta una bicapa completa cuando la primera se expone a un medio. Los sustratos nano-rugosos han sido preparados mediante bombardeo de iones de baja energía con una longitud de onda de $\lambda=24$ nm. Se siguió la metodología utilizada por el Dr. Adrian Keller²⁴ donde se modifica la superficie de la oblea de Si (100) mediante bombardeo iónico. Estos sustratos nanorugosos presentan una diferencia de altura entre picos y valles, es decir, entre la parte más alta y más baja de la ondulación, de 2 nm. Este valor de altura estaría razonablemente cerca de la longitud teórica de las moléculas de DPPC (aprox. 2,4 nm).²⁵ En relación a esta longitud del DPPC se considera que tiene una cadena larga frente a otros lípidos similares por ejemplo el DMPC, esto es importante a la hora de tener en cuenta los resultados, ya que cuanto más larga sea una cadena de lípidos puede permitir el desacoplamiento de la rugosidad y el efecto de la altura de la bicapa.

En consecuencia, se espera que tanto la interacción de la cadena lateral intermolecular, las interacciones entre el sustrato y la membrana compuesta por

fosfolípidos y colesterol muestren diferencias con las interacciones reportadas para superficies atómicamente planas.

Antes de comenzar con el apartado de resultados y discusión hay destacar que los sustratos fueron realizados por el grupo de Adrian Keller en Paderborn, Alemania. Las transferencias se realizaron en el Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA) y los resultados de AFM se han realizado durante mi estancia doctoral en Paderborn con el microscopio de fuerza atómica de alta velocidad (High-speed AFM), nombrado en el capítulo 1-materiales y métodos)

2. Resultados y discusión

2.1 Caracterización fisicoquímica de películas de DPPC:COL 1:1 sobre sustratos de Si

Se transfirió una monocapa de DPPC:COL 1:1 mediante Langmuir-Blodgett a una presión superficial de $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ sobre la superficie de una oblea de silicio (100) tratada con plasma de oxígeno para conseguir un sustrato limpio, hidrófilo y atómicamente plano. En este estudio se registraron imágenes AFM del sustrato antes (sustrato limpio) y después de transferir la monocapa, tal y como se muestra en la Figura 2.

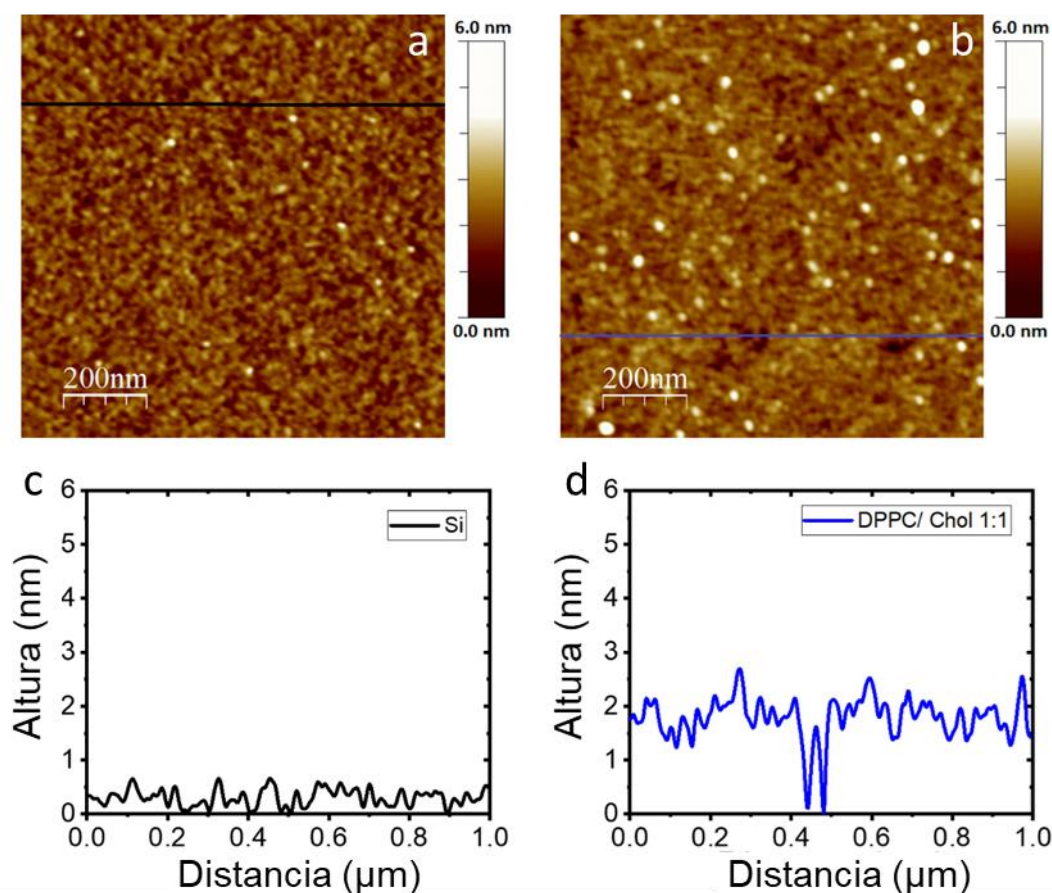


Figura 2. Imágenes de AFM de $1,0 \times 1,0 \mu\text{m}^2$ de una oblea de Si tratada con plasma de oxígeno (a) y después de la transferencia de una monocapa de DPPC:COL 1:1 por Langmuir-Blodgett a una presión de transferencia de $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (b). Sección transversal representativa para: el silicio (c) y la monocapa de DPPC:COL 1:1 (d)

Como se puede observar en la Figura 2, se ha formado una monocapa de DPPC:COL 1:1 ordenada en la que no se observan ni huecos ni estructuras tridimensionales.

La disposición de las moléculas de DPPC y colesterol ensambladas por LB sobre la superficie de silicio plana provocó un cierto aumento en la rugosidad (Tabla 1). Por el contrario, la presencia de la monocapa DPPC:COL disminuye notablemente la rugosidad registrada para los sustratos de Si nano-rugoso ($\lambda = 24 \text{ nm}$). Este hecho puede explicarse

considerando la altura de las ondulaciones que permite que las moléculas de DPPC y COL se ensamblen en las ondulaciones, disminuyendo así las diferencias de altura.

Tabla 1. Diferentes muestras estudiadas y su rugosidad RMS correspondiente.

Muestra	Rugosidad RMS (R_q)/ nm
Silicio (plano)	0.22 ± 0.02
Silicio (plano) + DPPC:COL 1:1	0.31 ± 0.04
Silicio nanorugoso ($\lambda = 24$ nm)	0.76 ± 0.07
Silicio nanorugoso($\lambda = 24$ nm) + DPPC:COL 1:1	0.48 ± 0.11

En la Figura 2.b, se ha realizado una sección transversal de la muestra en la región en la que hay un defecto en la monocapa (una pequeña área sin cubrir), lo que permite calcular la altura de la capa sin necesidad de hacer un raspado con la punta de AFM (asumiendo que realmente esta zona es mica desnuda); el espesor así obtenido es de aproximadamente 2,1 nm. Este valor no se aleja de la longitud molecular obtenida en el capítulo 2- Preparación y caracterización de membranas celulares de 2,4 nm). Esta variación en la altura puede ser debida a la dificultad de la punta en llegar a tocar el sustrato en este pequeño defecto. Por lo tanto, se puede concluir que se ha depositado una monocapa de colesterol y DPPC, altamente empaquetada y libre de poros y defectos tridimensionales.

Cuando sobre un sustrato de silicio nanorugoso se transfiere una monocapa de DPPC:COL 1: 1, Figura 3b, los dominios moleculares depositados parecen seguir la topografía de la superficie del sustrato, pero aumentando el grosor de las ondulaciones y disminuyendo la altura de pico a valle. Este último fenómeno puede explicarse mediante el esquema que se muestra en la Figura 1b de este capítulo.

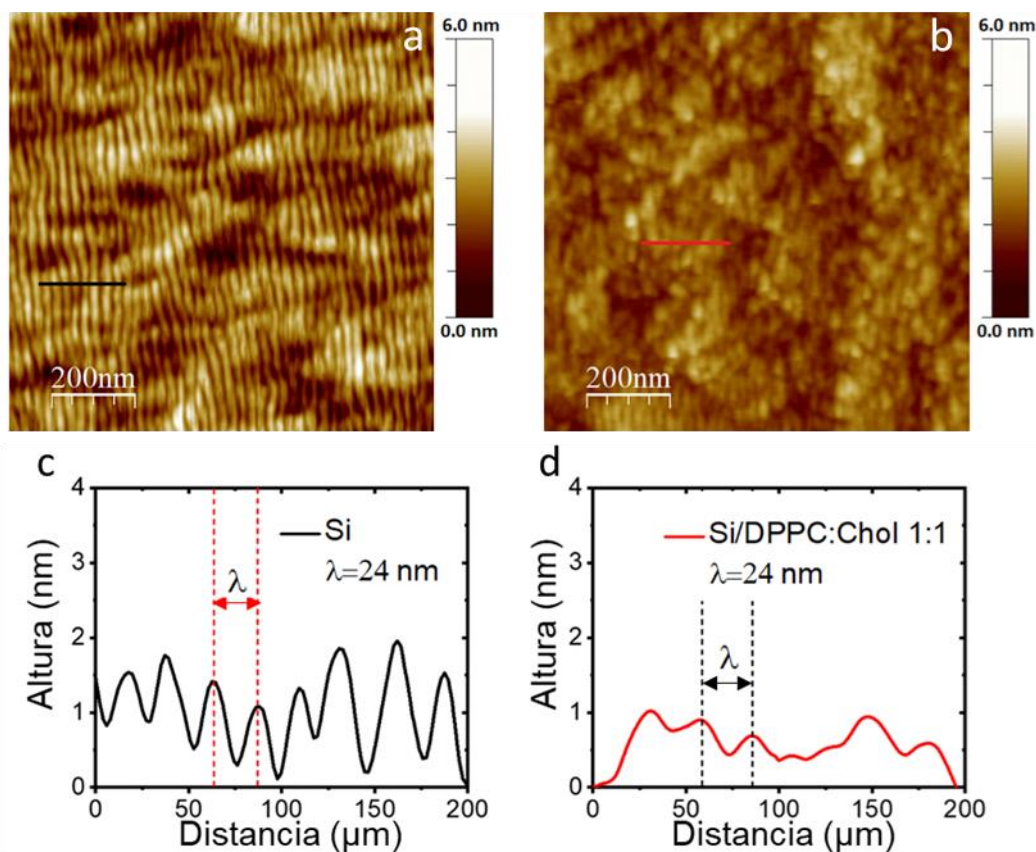


Figura 3. Imágenes de AFM de $1,0 \times 1,0 \mu\text{m}^2$ de una oblea de Si modificada por bombardeo iónico antes (a) y después de ser modificada con una monocapa de DPPC:COL 1:1 por Langmuir-Blodgett a una presión de transferencia de $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (b). Sección transversal representativa de una imagen AFM correspondiente a: un sustrato de silicio modificado por bombardeo iónico (c) y esquema que muestra la monocapa de DPPC:COL 1:1 sobre el sustrato (d) donde se observa la rugosidad media y el espesor de la capa de fosfolípidos.

Con el objetivo de obtener información sobre la orientación de las moléculas en la monocapa sobre las superficies de silicio se realizaron medidas de espectroscopia de absorción por reflexión infrarroja con modulación de polarización (PM-IRRAS). En particular, esta técnica se utiliza para determinar los ángulos de inclinación de las moléculas ensambladas con respecto a la normal a la superficie. La configuración del PM-IRRAS utilizado permite la detección simultánea de la suma y la diferencia de reflectividades de dos haces infrarrojos polarizados (mutuamente perpendiculares) en las

direcciones perpendicular (s) y paralela (p) a la normal a la superficie cuyas direcciones están definidas por el plano definido por la luz incidente y la reflejada, tal y como se describe en la Figura 5. Así, tras la reflexión en superficie, para la polarización s, los haces incidente y reflejado interactúan destructivamente en la superficie. Por el contrario, para la polarización p, aquellas moléculas activas en IR que están adsorbidas sobre una superficie metálica, los haces incidente y reflejado interactuarán constructivamente en superficie tras la reflexión, lo que resulta en un campo eléctrico de superficie exaltado que hace que la luz p-polarizada sea la adecuada para la detección de especies presentes sobre la superficie de interés. Mientras, las moléculas presentes en un entorno gaseoso (o líquido) isotrópico exhibirán interacciones constructivas frente a la luz IR polarizada p y s. Por lo tanto, es posible obtener un espectro de absorción IR específico de la superficie.

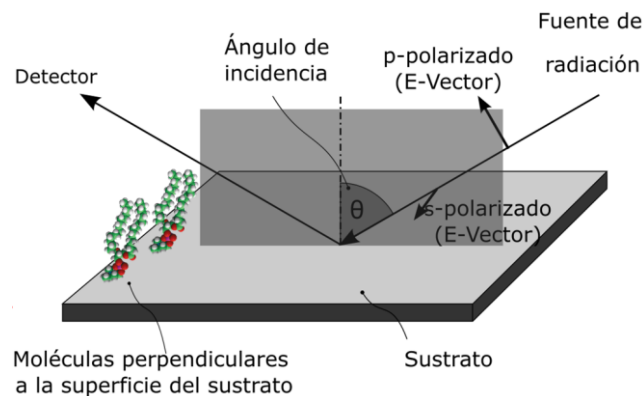


Figura 5. Esquema con los principios básicos en los que se basa la técnica de PM-IRRAS.

(Adaptado de Wikimedia Commons)

En la Figura 6 se muestran los distintos modos vibracionales correspondientes a una molécula de DPPC debido a los grupos metilos y metilenos de las cadenas alquílicas, del grupo colina (sales cuaternarias de amonio que contienen el catión N,N,N-trimetiletanolamina) y del grupo fosfonato presentes en la misma.

Con vistas a la determinación de la orientación de las moléculas de DPPC frente a la normal a las superficies de Si por medio de PM-IRRAS, se tendrán fundamentalmente en cuenta las vibraciones de tensión de los grupos metilo y metileno de acuerdo con la metodología publicada por Thissen y colaboradores.²⁶ Este valor corresponde al promedio de las orientaciones del conjunto de moléculas que se miden por medio de PM-IRRAS.

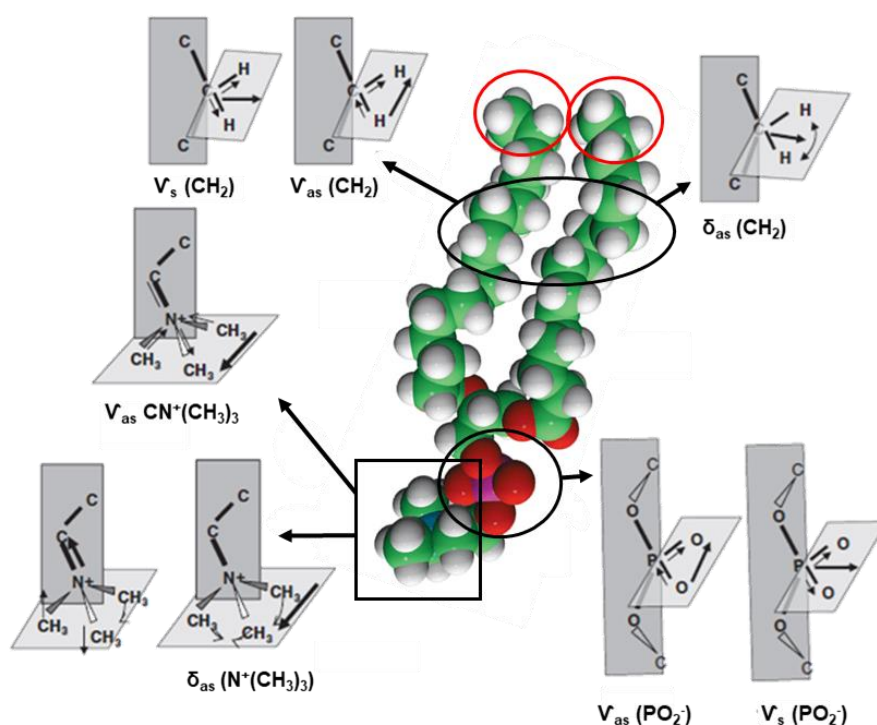


Figura 6. Esquema con las diferentes vibraciones tensión C-C y C-H de una molécula de DPPC inmovilizada sobre un soporte sólido. Esta imagen ha sido adaptada de ²⁶ y la figura 3D del DPPC, de Avanti Polar Lipids.

En la Figura 7 se muestran los espectros PM-IRRAS correspondientes a la monocapa DPPC:COL 1:1 en Si (100) y Si nanorugoso ($\lambda = 24$ nm), obtenidos al aire.

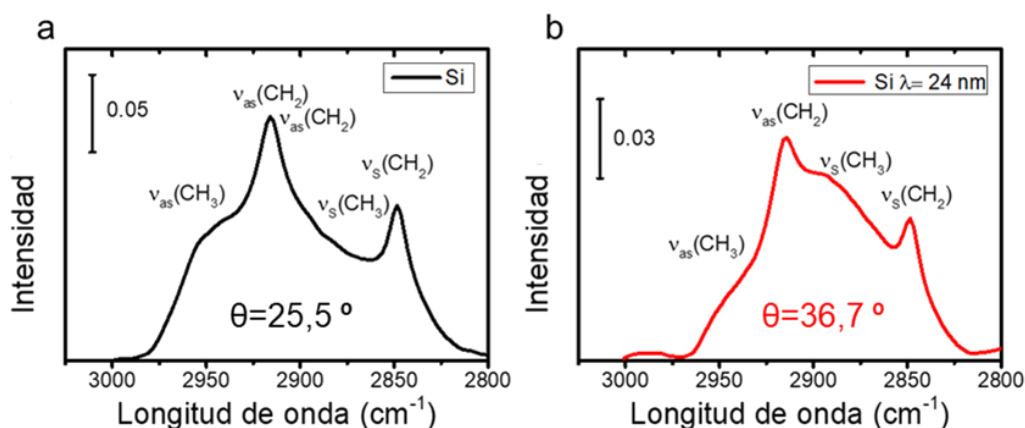


Figura 7. Espectros PM-IRRAS correspondientes a una oblea de Si tratada con plasma de oxígeno (a) y una oblea de Si modificada por bombardeo iónico con $\lambda=24$ nm (b) después de haber sido modificada con una monocapa LB de DPPC:COL 1: 1 transferida $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. El ángulo de inclinación estimado para las moléculas de DPPC se muestra en el gráfico correspondiente.

En la Figura 7 se indican las asignaciones de las bandas de vibración de tensión asimétricas y simétricas de $-\text{CH}_2$ y $-\text{CH}_3$. Los espectros muestran cuatro bandas prominentes identificadas en la literatura como los modos de estiramiento del metileno (CH_2) y del metilo terminal (CH_3). Los modos de estiramiento asimétrico y simétrico del $-\text{CH}_3$ aparecen en la región de 2960 y 2870 cm^{-1} , respectivamente. Los modos de estiramiento simétrico y antisimétrico del $-\text{CH}_2$ aparecen en las regiones de 2850 y 2920 cm^{-1} , respectivamente.

Teniendo en cuenta las relaciones de intensidad de CH_2 y CH_3 se puede cuantificar el ángulo de inclinación (θ) frente a la normal a la superficie estimado para las moléculas de DPPC en la monocapa de acuerdo al procedimiento seguido por Thissen y colaboradores.²⁶ Estos ángulos se muestran dentro de las gráficas en la Figura 7. La cuantificación de estos ángulos se obtiene mediante cálculos geométricos considerando la interacción del vector campo eléctrico con el vector momento dipolar de transición

correspondiente a la vibración considerada. Concretamente, se utiliza la relación entre la intensidad máxima del grupo CH₃ y CH₂ mediante esta fórmula:

$$\frac{I_{CH_2}}{I_{CH_3}} = \frac{2n \cdot \cos^2(90^\circ - \alpha)}{3 \cdot \cos^2(35^\circ - \alpha)} \quad (\text{Ec 1})$$

Donde I corresponde a la intensidad de las bandas de vibración CH_x correspondientes, n es el número de grupos metílenos en la cadena de alquilo y α es el ángulo entre el eje de la cadena del alquilo y la normal a la superficie.

Los ángulos de inclinación de la cadena alquílica respecto a la normal a la superficie estimados a partir de los espectros de PM-IRRAS son notablemente más altos para la superficie de silicio nano-rugoso frente al silicio plano. Este hecho puede atribuirse a la superficie curva de las ondas que evita que las moléculas de colesterol y DPPC se empaqueten de la misma forma que en el sustrato plano.

2.2. Evolución de la monocapa DPPC:COL 1:1 cuando se expone a un medio líquido.

En el capítulo 1 se ha estudiado en detalle cómo se comporta el DPPC:COL 1:1 cuando se pone en contacto con un medio líquido, bien sea agua o una disolución tampón y se observa como el sistema va evolucionando de una monocapa a una bicapa con un recubrimiento de las islas de bicapa de aproximadamente 50%.²⁵ Los distintos estados intermedios de la transición de monocapa a bicapa se identificaron midiendo la altura de los dominios conforme se iban formando. Este capítulo retomamos este tema de transición monocapa a bicapa cuando la primera es expuesta a un medio líquido, pero analizando el proceso en un sustrato de silicio plano y de silicio nanorugoso. La Figura 8 muestra una secuencia de imágenes AFM representativas registradas para la monocapa DPPC:COL 1:1 transferido sobre una superficie de silicio plano para diferentes tiempos de inmersión. Estas imágenes fueron tomadas con un AFM de alta velocidad en la

Universidad de Paderborn, por lo que se pudo observar a tiempo real, como se iba formando la monocapa a bicapa. Para ver en tiempo real como se va formando la bicapa, puede escanearse el código QR con la cámara del móvil o Tablet y así enlazar con el vídeo*

**Los pasos son: Paso1: Abra la cámara desde la pantalla de bloqueo o tocando el icono correspondiente en la pantalla de inicio en el móvil o tablet. Paso 2. Enfoque el código QR y sujete el dispositivo durante dos o tres segundos sin moverlo. Paso 3 Haga clic en la notificación para acceder al contenido del código QR.*



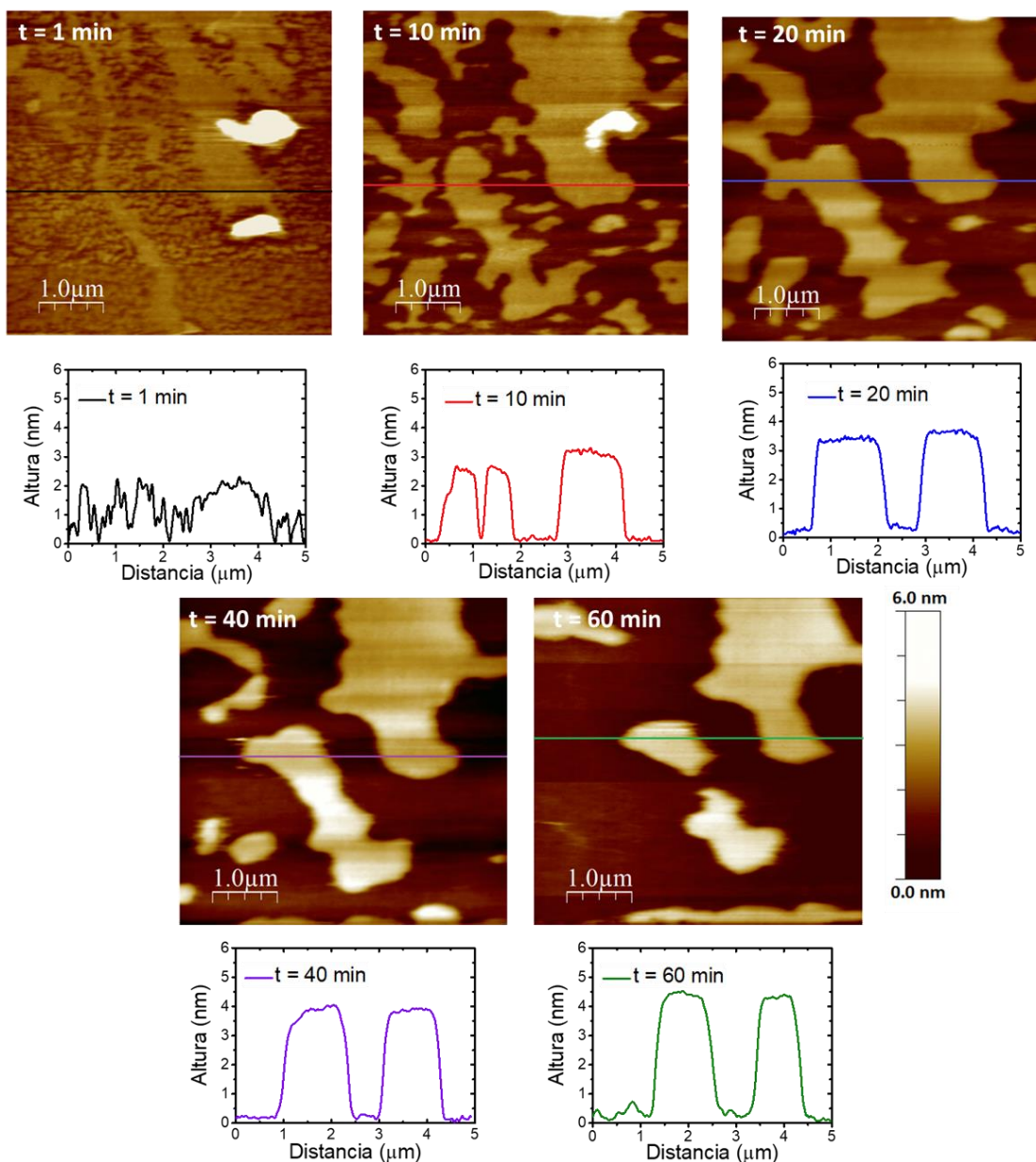


Figura 8. Imágenes AFM de $5,0 \times 5,0 \mu\text{m}^2$ de una oblea de silicio plano modificado con una monocapa LB de DPPC:COL 1: 1 transferida a $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ después de la exposición a HEPES 10 mM para diferentes tiempos de inmersión: 1 min (línea negra), 10 min (rojo), 20 min (azul), 40 min (morado) y 60 min (verde). Se muestran debajo de cada imagen las correspondientes secciones transversales para mostrar el espesor de la película.

Después de un solo minuto, ya se detectan defectos en la monocapa. El sistema evoluciona de forma similar a la observada para una monocapa DPPC:COL en mica, explicada en detalle en el capítulo 1, y donde vimos que la monocapa se reconvierte a

bicapa. La altura creciente de estos parches bicapa observados en los perfiles de sección transversal de las películas sobre silicio plano (Figura 8) confirman un sustrato similar al observado en mica.

Para poder confirmar que las moléculas de DPPC y colesterol sobre la superficie del sustrato van incorporándose progresivamente en una segunda capa cuando la muestra está inmersa en un medio líquido, se ha llevado a cabo un estudio de recubrimiento superficial. Para ello se ha utilizado la herramienta de análisis superficial denominada *Bearing Analysis*, dentro del software del programa de tratamiento de datos del AFM, fijando el umbral de altura entre el máximo valor teórico posible para la monocapa y el medido experimentalmente para la bicapa. Aunque dichos resultados no pueden ser extrapolados directamente (para ello se debería trabajar con imágenes de menor magnificación y mayor estadística), sí que permiten ilustrar el modelo propuesto para la evolución de monocapa a bicapa observado cuando las moléculas de DPPC y colesterol se ponen en contacto en un medio líquido, o bien agua o una disolución tampón 10 mM en HEPES (pH 7,4). Estos estudios de recubrimiento se ilustran en la Figura 9. Se obtuvo, después de una hora de inmersión, un recubrimiento del 34%. En las imágenes de AFM el área coloreada en azul equivale al sustrato desnudo tras la reorganización de la monocapa, es decir, a las regiones no recubiertas por el DPPC y colesterol. Los porcentajes indicados en la figura corresponden al porcentaje del sustrato recubierto por la película.

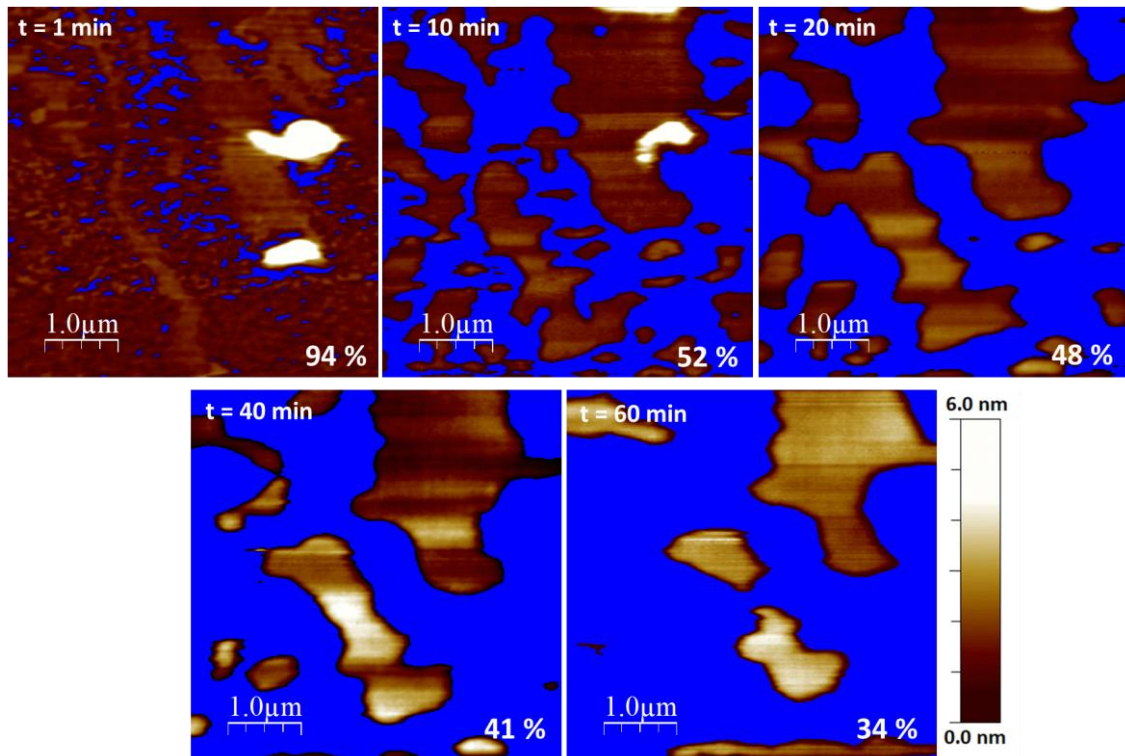


Figura 9. Imágenes AFM de $5,0 \times 5,0 \mu\text{m}^2$ de una oblea de Si tratada con plasma de oxígeno con una monocapa LB de DPPC:COL 1:1 transferida a de $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ después de la incubación a HEPES 10 mM para diferentes tiempos de inmersión: 1 min, 10 min, 20 min, 40 min y 60 min.

Los valores de recubrimiento de la superficie correspondiente se representan en % en cada imagen AFM. El fondo sombreado en azul representa las regiones no cubiertas por el DPPC y el colesterol.

Se ha realizado el mismo experimento, pero esta vez usando un sustrato de silicio nanorugoso. Las imágenes topográficas de AFM se muestran en la Figura 10 y 11.

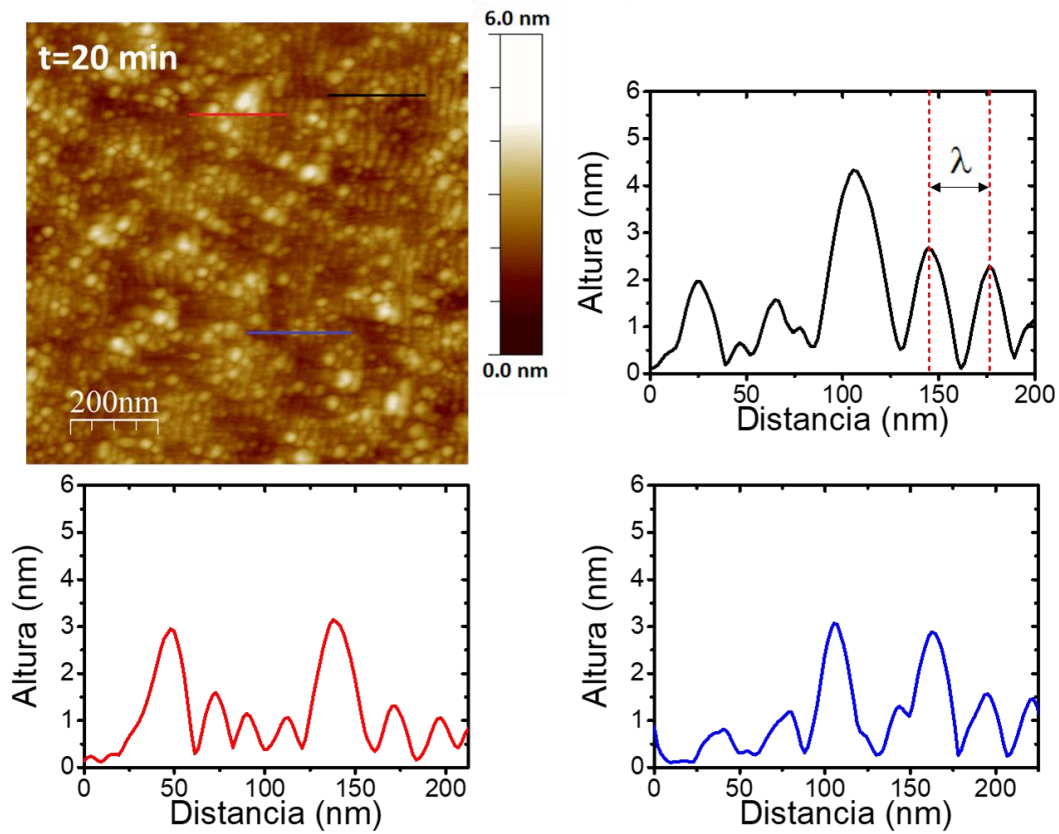


Figura 10. Imagen de AFM de $1.0 \times 1.0 \mu\text{m}^2$ de una monocapa LB de DPPC:COL 1:1 transferida sobre un sustrato de silicio nanorugoso ($\lambda=24 \text{ nm}$) por LB a una presión de transferencia de $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ después de la exposición a HEPES 10 mM para un tiempo de inmersión de 20 min. Con sus correspondientes secciones transversales en tres zonas diferentes de la muestra para mostrar la rugosidad media y el espesor de la capa de fosfolípidos.

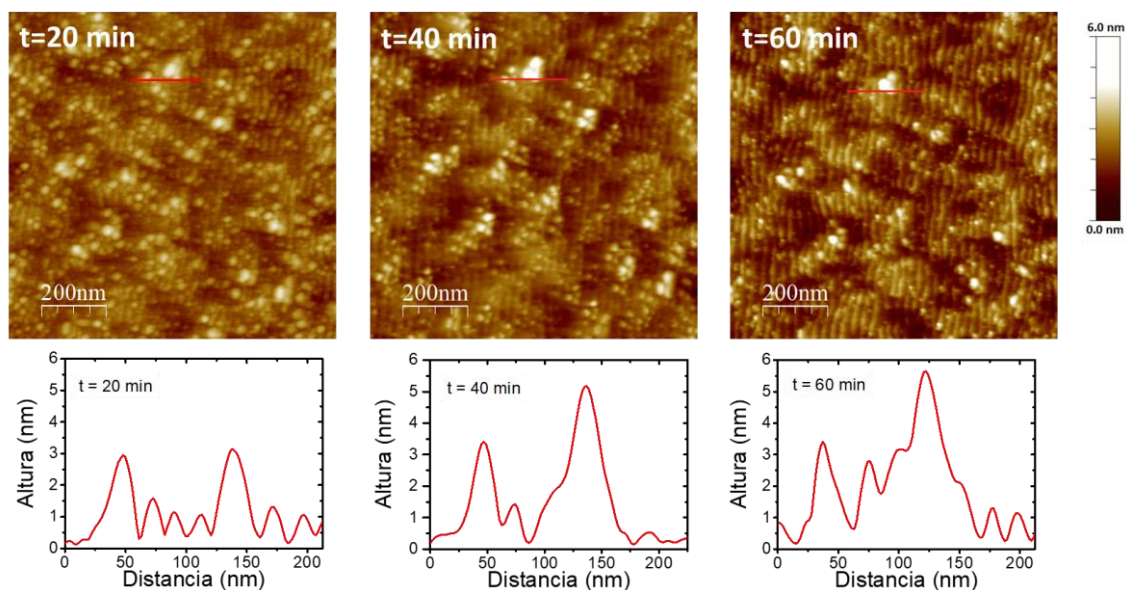


Figura 11. Imágenes de una monocapa LB de DPPC:COL 1:1 transferida sobre un sustrato de silicio nanorugoso ($\lambda=24$ nm) transferida a $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ después de la exposición a HEPES 10 mM para diferentes tiempos de inmersión: 20 min, 40 min y 60 min. Con sus correspondientes secciones transversales en tres zonas diferentes de la muestra para mostrar la rugosidad media y el espesor de la capa de fosfolípidos

Tal y como se puede observar en la Figura 10 y 11, se produce cierta desorción de las moléculas del DPPC y colesterol de la superficie de silicio nanorugosa cuando la monocapa se expone a la disolución tampón. Se han realizado diferentes perfiles de sección transversal, representados en la Figura 10, la primera sección transversal, con la línea negra, nos sirve para mostrar que la longitud de onda de la superficie inferior se mantiene constante incluso después de la exposición al medio líquido una vesícula de DPPC:COL cuyo tamaño y altura aumentan con el tiempo, atrapando moléculas de la interfase sólido-líquido (sección transversal 2, rojo) y, finalmente, una partícula de DPPC:COL que se disuelve para aumentar los tiempos de inmersión (sección transversal 3, azul). Si nos fijamos en la partícula 2 (línea roja en la Figura 10) corresponde a la misma en la Figura 11 a tiempo 20 minutos. Se ha etiquetado de esta manera para poder

observar como varía esa vesícula a medida que el tiempo de incubación es mayor, se puede ver como las dimensiones van aumentando, alcanzando un valor estimado de aproximadamente 4 nm en el centro de la partícula después de 60 min. Esta cifra sería ligeramente inferior a los valores de altura que podrían registrarse para los dominios de bicapa en las muestras anteriores, con el sustrato de silicio plano.

En este caso, debido a la mayor rugosidad del sustrato resulta imposible una estimación del grado de recubrimiento de la superficie, por lo que no se ha podido llevar a cabo para estas muestras. Pero observando las imágenes topográficas de AFM se puede confirmar que la rugosidad del sustrato parece jugar un papel importante en el mecanismo de autoensamblaje de las membranas lipídicas soportadas en la superficie.

2.3 Propiedades nanomecánicas

Para obtener las propiedades nanomecánicas se han registrado curvas de fuerza-indentación en las áreas de bicapa obtenidas en las superficies de silicio plano y de silicio nanorugoso a través de la fuerza de ruptura o *breakthrough force* (F_b) (ya comentada en el capítulo 2-Preparación y caracterización de membranas celulares simuladas). Estas curvas de fuerza-indentación se obtienen cuando una punta AFM se pone en contacto con la superficie modificada inmersa en una disolución electrolítica.

La hipótesis de trabajo inicial era que la ondulación de los sustratos nano-rugosos, llegue a ejercer una influencia notable en las interacciones intermoleculares de las cadenas laterales de los fosfolípidos alterando así su fuerza de rotura.^{27,28}

En la Figura 12 se presenta una curva característica de fuerza-distancia obtenida de la película DPPC:COL 1:1 expuesta a la disolución de HEPES 10 mM.

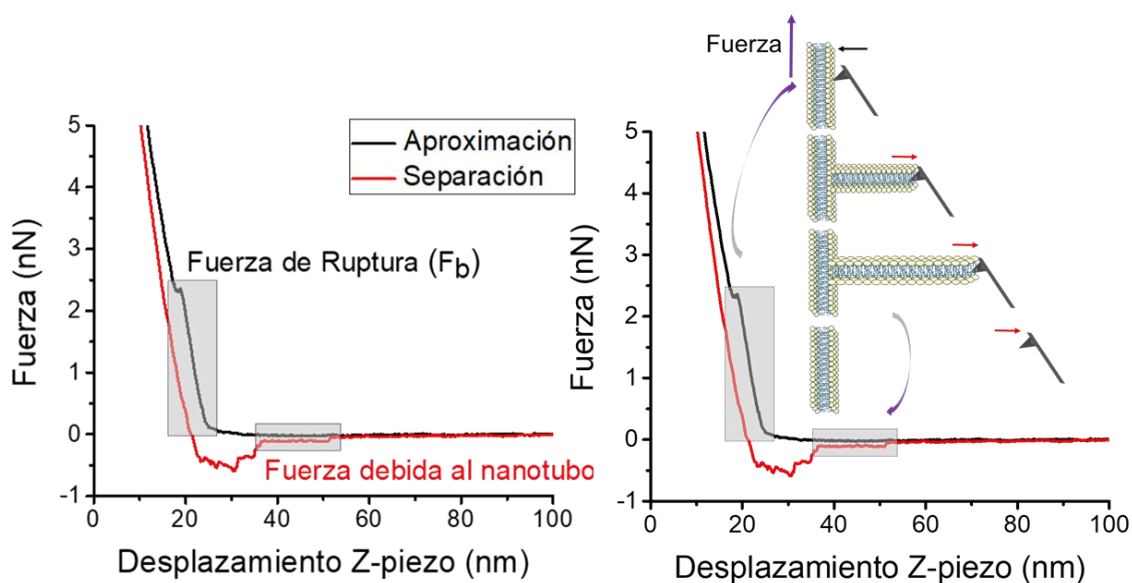


Figura 12. Curvas de fuerza-distancia representativas para las películas LB de DPPC:COL 1:1 sobre silicio plano durante 60 min de inmersión en HEPES 10 mM. Los recuadros en color gris muestran rasgos característicos de las curvas de fuerza-distancia explicados con más detalle en el esquema realizado debajo de la curva.

Se pueden distinguir tres rasgos característicos en las secciones de aproximación-retracción de la curva fuerza-distancia: fuerza de aproximación, correspondiente a la línea negra, (i), interacción inespecífica de la punta (rojo) (ii) y fuerza de ruptura, y fuerza de ruptura debido al nanotubo generado con la bicapa (sombreado en gris) (iii). La fuerza de ruptura debido al nanotubo tiene lugar cuando la punta toca la membrana y se retrae, la punta arrastra la membrana consigo formando una estructura tubular, tal y como se observa gráficamente en el esquema de la Figura 12. Hasta ahora hay pocos estudios sobre la aparición de fuerzas debidas al nanotubo de equilibrio en el caso de moléculas adsorbidas reversible e inespecíficamente sobre la superficie. Sanz y colaboradores²⁹ atribuyeron estas fuerzas a la formación de nanotubos de dos capas cuando la punta se retrae de la superficie.

El área sombreada de la Figura 12 corresponde a la aproximación de la curva fuerza-distancia. En este punto se puede observar la fuerza de ruptura (F_b), que representa el valor máximo de fuerza que estas membranas son capaces de resistir antes de romperse por la punta del AFM.

En consecuencia, F_b se ha asociado ampliamente con la magnitud de la fuerza de interacción lateral que surge entre moléculas vecinas, es decir, interacciones de van der Waals entre cadenas de alquilo, así como interacciones de grupos de cabeza zwitteriónicos de unión a moléculas de cationes y agua. En la Figura 13 se presentan curvas representativas de fuerza-distancia de aproximación que muestran el paso característico asociado a la indentación mecánica de la SBLs.

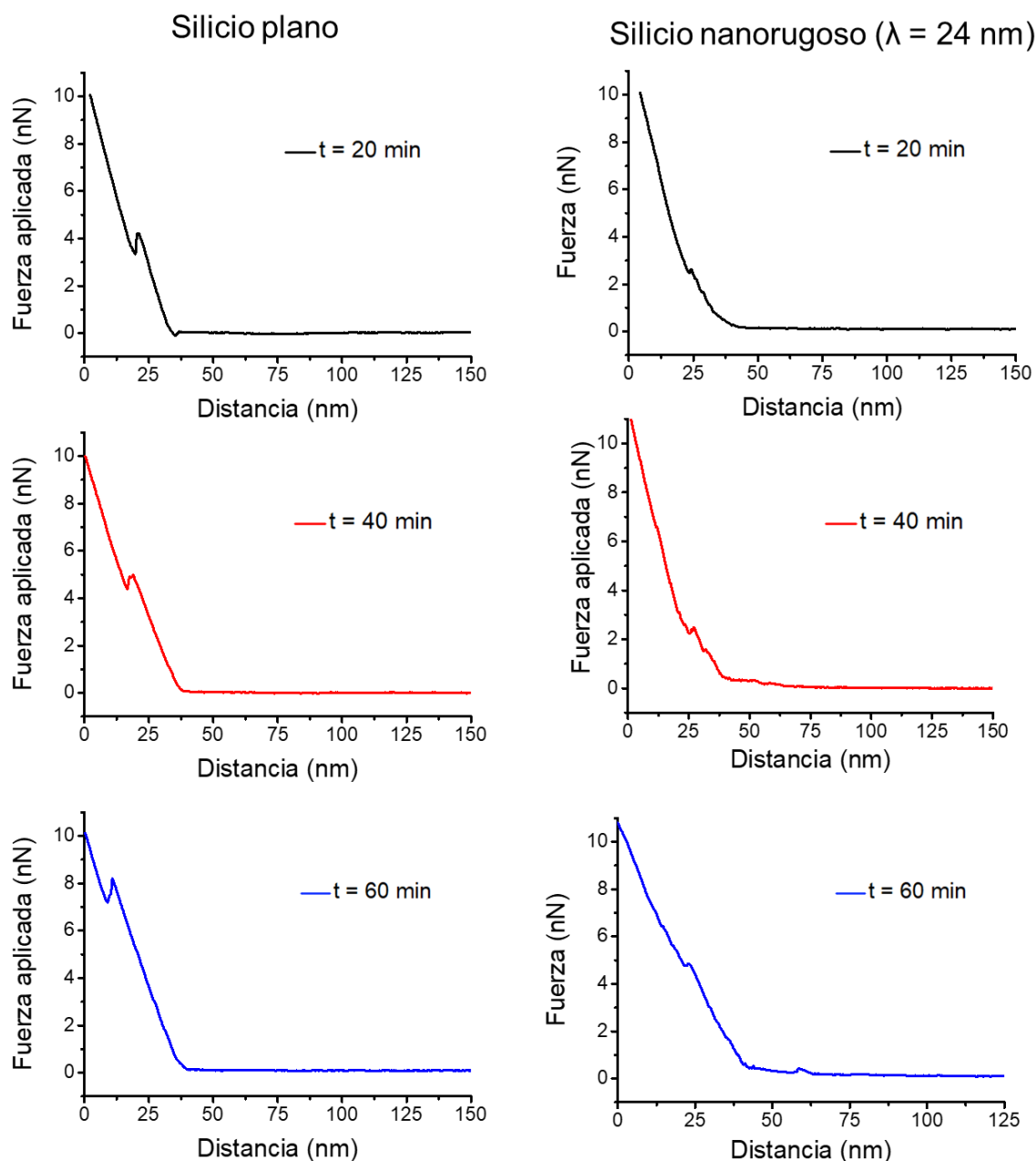


Figura 13. Curvas de carga fuerza-distancia representativas para las películas DPPC:COL 1:1 sobre silicio plano (izquierda) y silicio nanorugoso ($\lambda = 24$ nm) (derecha) para los tiempos de inmersión indicados en las gráficas.

No se pudieron deducir diferencias particulares entre el sustrato de silicio plano y el nanorugoso a partir de las curvas extraídas tanto en el centro como en el borde de los dominios de bicapa. En cambio, sí que se observa que los valores de fuerza de ruptura son más altos para el sustrato plano lo que se atribuye a un mejor empaquetamiento de la

película. Además, hay que destacar que se han obtenido valores de fuerza de ruptura más bajos para las superficies planas de silicio en comparación con los determinados para los sustratos de mica, (estos valores están recogidos en detalle en el capítulo 2-Preparación y caracterización de membranas celulares). Esto podría estar relacionado con una menor interacción de la molécula con el sustrato y con una peor interacción entre las cadenas lipídicas, es decir, peor empaquetamiento, en los dominios de la bicapa.

3. Conclusiones

Se ha realizado un estudio para conocer cómo afecta el empaquetamiento del DPPC y Colesterol sobre un sustrato de silicio plano y otro sustrato de silicio nanorugoso, es decir, mismo material en ambos casos (silicio) pero presentando diferente rugosidad, el sustrato de silicio plano con una RMS prácticamente cero y un sustrato nanorugoso que presenta unas ondulaciones debidas a un bombardeo de iones con una $\lambda = 24$ nm. Se ha obtenido que la rugosidad del sustrato juega un papel importante en el mecanismo de autoensamblaje y estabilización de las membranas lipídicas. Todas estas imágenes se han hecho con AFM de alta velocidad por lo tanto se ha podido observar a tiempo real como se iban autoensamblando las moléculas de DPPC y Colesterol hacia dominios de bicapa, obteniéndose para sustratos de silicio planos, dominios tipo islas y para los sustratos de silicio nanorugoso, dominios tipo vesículas.

Se ha observado mediante PM-IRRAS como iban variando las bandas del CH_2 y del CH_3 dentro de la cadena de fosfolípidos a tiempo real, por lo tanto, permite conocer como es el proceso de autoensamblaje.

No se pudieron deducir diferencias particulares de las curvas extraídas tanto en el centro como en el borde de los dominios de bicapa, ni en el silicio plano ni en el silicio

nanorugoso. Sin embargo, se han obtenido valores más bajos para las superficies lisas de silicio en comparación con los que podrían medirse para superficies de mica.

El AFM, se puede utilizar para proporcionar una visión más física de los mecanismos microscópicos involucrados en el descenso de la movilidad lipídica en superficies rugosas. El control de la rugosidad a la nanoescala nos abre un camino para el estudio de los lípidos y proteínas y la formación de sus dominios en los intermedios estructurales en los que se forman curvaturas.

4. Bibliografía

- (1) Aoki, P. H. B.; Alessio, P.; Rodríguez-Méndez, M. L.; De Saja Saez, J. A.; Constantino, C. J. L. Taking Advantage of Electrostatic Interactions to Grow Langmuir-Blodgett Films Containing Multilayers of the Phospholipid Dipalmitoylphosphatidylglycerol. *Langmuir* **2009**, *25* (22), 13062–13070.
- (2) Castellana, E. T.; Cremer, P. S. Solid Supported Lipid Bilayers: From Biophysical Studies to Sensor Design. *Surf. Sci. Rep.* **2006**, *61* (10), 429–444.
- (3) Vogel, V.; Sheetz, M. Local Force and Geometry Sensing Regulate Cell Functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7* (4), 265–275.
- (4) Zimmerberg, J.; Kozlov, M. M. How Proteins Produce Cellular Membrane Curvature. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7* (1), 9–19.
- (5) McMahon, H. T.; Gallop, J. L. Membrane Curvature and Mechanisms of Dynamic Cell Membrane Remodelling. *Nature* **2005**, *438* (7068), 590–596.
- (6) Furukawa, K.; Sumitomo, K.; Nakashima, H.; Kashimura, Y.; Torimitsu, K. Supported Lipid Bilayer Self-Spreading on a Nanostructured Silicon Surface.

- Langmuir* **2007**, *23* (2), 367–371.
- (7) Seifert, U. Configurations of Fluid Membranes and Vesicles. *Adv. Phys.* **1997**, *46* (1), 13–137.
- (8) Gallez, D.; Coakley, W. T. Interfacial Instability at Cell Membranes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1986**, *48* (3), 155–199.
- (9) Sanii, B.; Smith, A. M.; Butti, R.; Brozell, A. M.; Parikh, A. N. Bending Membranes on Demand: Fluid Phospholipid Bilayers on Topographically Deformable Substrates. *Nano Lett.* **2008**, *8* (3), 866–871.
- (10) Goksu, E. I.; Hoopes, M. I.; Nellis, B. A.; Xing, C.; Faller, R.; Frank, C. W.; Risbud, S. H.; Satcher, J. H.; Longo, M. L. Silica Xerogel/Aerogel-Supported Lipid Bilayers: Consequences of Surface Corrugation. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2010**, *1798* (4), 719–729.
- (11) Haracz, S.; Hilgendorff, M.; Rybka, J. D.; Giersig, M. Effect of Surfactant for Magnetic Properties of Iron Oxide Nanoparticles. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **2015**, *364*, 120–126.
- (12) Ali, A.; Zafar, H.; Zia, M.; Ul Haq, I.; Phull, A. R.; Ali, J. S.; Hussain, A. Synthesis, Characterization, Applications, and Challenges of Iron Oxide Nanoparticles. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **2016**, *9*, 49–67.
- (13) Schäffer, E.; Thiele, U. Dynamic Domain Formation in Membranes: Thickness-Modulation-Induced Phase Separation. *Eur. Phys. J. E* **2004**, *14* (2), 169–175.
- (14) Swain, P. S.; Andelman, D. Supported Membranes on Chemically Structured and Rough Surfaces. *Phys. Rev. E* **2001**, *63* (5), 51911.

- (15) Blachon, F.; Harb, F.; Munteanu, B.; Piednoir, A.; Fulcrand, R.; Charitat, T.; Fragneto, G.; Pierre-Louis, O.; Tinland, B.; Rieu, J.-P. Nanoroughness Strongly Impacts Lipid Mobility in Supported Membranes. *Langmuir* **2017**, *33* (9), 2444–2453.
- (16) Tayebi, N.; Polycarpou, A. A. Adhesion and Contact Modeling and Experiments in Microelectromechanical Systems Including Roughness Effects. *Microsyst. Technol.* **2006**, *12* (9), 854.
- (17) Dekkiche, F.; Corneci, M. C.; Trunfio-Sfarghiu, A.-M.; Munteanu, B.; Berthier, Y.; Kaabar, W.; Rieu, J.-P. Stability and Tribological Performances of Fluid Phospholipid Bilayers: Effect of Buffer and Ions. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2010**, *80* (2), 232–239.
- (18) Scheuring, S.; Dufrêne, Y. F. Atomic Force Microscopy: Probing the Spatial Organization, Interactions and Elasticity of Microbial Cell Envelopes at Molecular Resolution. *Mol. Microbiol.* **2010**, *75* (6), 1327–1336.
- (19) Ginzburg, V. V.; Balijepalli, S. Modeling the Thermodynamics of the Interaction of Nanoparticles with Cell Membranes. *Nano Lett.* **2007**, *7* (12), 3716–3722.
- (20) Verma, A.; Stellacci, F. Effect of Surface Properties on Nanoparticle-Cell Interactions. *Small* **2010**, *6* (1), 12–21.
- (21) Berquand, A.; Mingeot-Leclercq, M. P.; Dufrêne, Y. F. Real-Time Imaging of Drug-Membrane Interactions by Atomic Force Microscopy. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2004**, *1664* (2), 198–205.
- (22) Redondo-Morata, L.; Oncins, G.; Sanz, F. Force Spectroscopy Reveals the Effect of Different Ions in the Nanomechanical Behavior of Phospholipid Model

- Membranes: The Case of Potassium Cation. *Biophys. J.* **2012**, *102* (1), 66–74.
- (23) Dufrêne, Y. F.; Martínez-Martín, D.; Medalsy, I.; Alsteens, D.; Müller, D. J. Multiparametric Imaging of Biological Systems by Force-Distance Curve-Based AFM. *Nat. Methods* **2013**, *10* (9), 847–854.
- (24) Keller, A.; Facsko, S. Ion-Induced Nanoscale Ripple Patterns on Si Surfaces: Theory and Experiment. *Mater. (Basel, Switzerland)* **2010**, *3* (10), 4811–4841.
- (25) Ruiz-Rincón, S.; González-Orive, A.; De La Fuente, J. M.; Cea, P. Reversible Monolayer-Bilayer Transition in Supported Phospholipid LB Films under the Presence of Water: Morphological and Nanomechanical Behavior. *Langmuir* **2017**, *33* (30), 7538–7547.
- (26) Thissen, P.; Valtiner, M.; Grundmeier, G. Stability of Phosphonic Acid Self-Assembled Monolayers on Amorphous and Single-Crystalline Aluminum Oxide Surfaces in Aqueous Solution. *Langmuir* **2010**, *26* (1), 156–164.
- (27) Nussio, M. R.; Oncins, G.; Ridelis, I.; Szili, E.; Shapter, J. G.; Sanz, F.; Voelcker, N. H. Nanomechanical Characterization of Phospholipid Bilayer Islands on Flat and Porous Substrates: A Force Spectroscopy Study. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113* (30), 10339–10347.
- (28) Gumí-Audenis, B.; Costa, L.; Ferrer-Tasies, L.; Ratera, I.; Ventosa, N.; Sanz, F.; Giannotti, M. I. Pulling Lipid Tubes from Supported Bilayers Unveils the Underlying Substrate Contribution to the Membrane Mechanics. *Nanoscale* **2018**, *10* (30), 14763–14770.
- (29) 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. *Biophys. J.* **2005**, 89 (3), 1812–1826.

Capítulo 7.

Influencia del sustrato en la determinación del módulo de Young de películas blandas

1. Introducción. Mecanobiología

En los últimos años ha aparecido con mucha fuerza una nueva disciplina en la literatura científica: la mecanobiología. Esta es una ciencia multidisciplinar que estudia el comportamiento de los sistemas biológicos cuando se someten a estímulos mecánicos, habiéndose erigido como una nueva línea de investigación en el ámbito de la nanotecnología y de la biología.^{1,2}

Comprender como los sistemas biológicos responden a los estímulos mecánicos es esencial para ser capaces de describir y comprender las bases de muchos procesos que tienen lugar en dichos sistemas, ya que no solo hay que considerar las señales bioquímicas sino también las señales físicas. En este contexto, el estudio de las propiedades mecánicas representa una herramienta esencial para conocer en profundidad los mecanismos que operan en la materia biológica blanda, como células, tejidos y membranas.^{3,4} En el caso concreto de las células, se ha establecido una relación entre su elasticidad y su estado fisiológico y patológico.⁵⁻⁷ Así, se ha demostrado que los estímulos mecánicos juegan un papel muy importante en la diferenciación y desarrollo celular, ya que la carga mecánica provoca cambios fisiológicos e incluso patológicos que afectan a la proliferación celular y a los genes de la matriz extracelular. Además, existen muchos tipos de enfermedades relacionadas con efectos mecánicos, por ejemplo, la aterosclerosis, la fibrosis o el cáncer.⁸⁻¹¹

Se ha observado que las células de los tejidos biológicos están continuamente sometidas a estímulos físicos, entre los que se destaca la compresión. La importancia de estos estímulos mecánicos en el comportamiento de las células es un campo de estudio muy prometedor. Se ha comprobado que la naturaleza de estas fuerzas varía en función del estado de la célula, y así por ejemplo células cancerígenas responden a estos estímulos

de manera diferente a células sanas. Además, una célula es capaz de reaccionar frente a ese estímulo mecánico de diversos modos tales como cambiando su forma o apariencia.¹⁰ Asimismo, hay estudios que han observado que determinadas células madre tienden a diferenciarse en diferentes tipos celulares en función de la rigidez de su entorno. La apoptosis, o la muerte celular programada, y la división celular son funciones básicas del mantenimiento de los tejidos y se ha demostrado que también se ven afectadas por señales físicas.¹²

El interés por entender los procesos biológicos y el comportamiento mecánico de las células ha ido en relación con el creciente auge de fabricación de modelos más simples que simulen una membrana biológica, en vez de la utilización de sistemas reales, los cuales son mucho más complejos de estudiar. Atendiendo a los objetivos de esta tesis doctoral, en este capítulo nos vamos a centrar en membranas lipídicas soportadas, ya que son sistemas más sencillos que permiten estudiar las interacciones entre los componentes que forman la membrana y las interacciones de éstos con otros agentes externos como fármacos o nanopartículas.¹³⁻¹⁵ Además, se pueden caracterizar de una manera más sencilla mediante diferentes técnicas de superficie¹⁶ como la microscopía de fuerza atómica (AFM).

1.1 La microscopía de fuerza atómica (AFM) y el módulo de Young

La microscopía de fuerza atómica (AFM) se ha convertido en una técnica de caracterización de superficies muy útil para este tipo de modelos debido a la alta resolución que se puede alcanzar, especialmente en entornos líquidos con temperaturas controladas.^{17,18} Las imágenes de AFM de películas blandas pueden mostrar desde morfologías homogéneas hasta separación de fases entre los componentes,¹⁹⁻²¹ y pueden aportar información sobre las interacciones moleculares que tienen lugar entre los

componentes de la membrana.²²⁻²⁴ Además, es posible obtener imágenes de AFM con resolución molecular y sub-molecular de membranas lipídicas.²⁵⁻²⁷ También, con el modo dinámico de AFM de amplitud modulada (AM-AFM) se han podido estudiar las capas de hidratación que existen en la interfaz agua-lípido.²⁸ Mediante AFM es posible obtener propiedades nano-mecánicas de los materiales en la escala nanométrica.²⁹⁻³³ Así, mediante espectroscopia de fuerza AFM (AFM-FS) se determina la fuerza necesaria para romper la membrana, estando esta fuerza directamente relacionada con la interacción lateral entre las moléculas de lípidos;³⁴ por tanto, aporta información sobre la estabilidad mecánica de un modelo de membrana en un entorno líquido específico.³⁵ Además, se pueden extraer otros parámetros físicos relevantes como el módulo de Young de la muestra y la fuerza de adhesión.³⁶

En este capítulo nos vamos a centrar en el **módulo de Young**, que es un parámetro que caracteriza las propiedades de los materiales elásticos y depende de la dirección de la fuerza aplicada. Para entender mejor el concepto de módulo de Young, recordemos que, dado que la materia no es rígida, la fuerza por unidad de superficie sobre un sólido es la denominada tensión o esfuerzo, σ , (cuantificada en unidades de presión, por ejemplo, en Pascales o $\text{N}\cdot\text{m}^{-2}$) y la distorsión unitaria que resulta en el sólido se denomina deformación, ε , que es adimensional, ya que corresponde al cambio de longitud con respecto a la longitud inicial. Cuando se somete un sólido a un esfuerzo, dicho sólido sufre una deformación y si el sistema deformado recupera su forma inicial al desaparecer el esfuerzo, entonces se dice que estamos en la zona de comportamiento elástico del material. Si además la deformación producida es proporcional al esfuerzo aplicado, se dice que el comportamiento del material es elástico lineal. En este caso, la ley que relaciona el esfuerzo con la deformación producida se conoce como ley de Hooke.³⁷ El cociente entre la tensión y la deformación es el denominado el módulo de Young, E :

$$E = \frac{\delta\sigma}{\delta\varepsilon} \quad (1)$$

El módulo de Young es específico del material y no depende del número de capas que tenga el mismo. Cuanto mayor es el módulo de Young mayor es la rigidez del material. En la Figura 1, se ilustra la definición gráfica del concepto de módulo de Young.

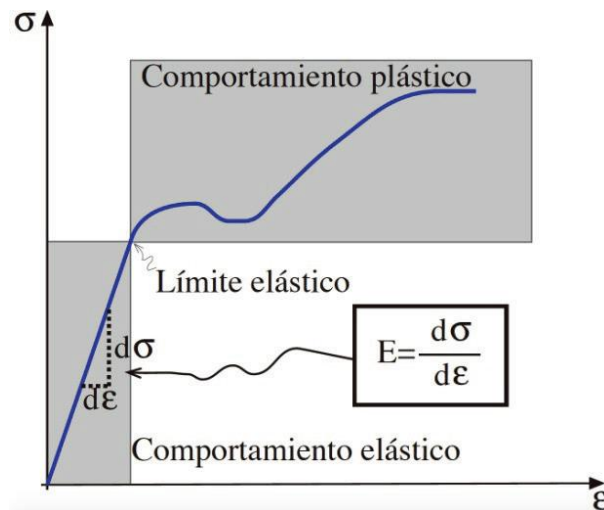


Figura 1. Definición gráfica del concepto de módulo de Young. Curva Tensión (σ) – Deformación (ε), para un material sometido a una carga de tracción.

Para comprender las propiedades mecánicas de un material, además de esta deformación axial o módulo de Young, hay que tener en cuenta la deformación transversal o el **coeficiente de Poisson** (ν) que es una constante elástica que corresponde al cociente entre el acortamiento de una longitud situada en un plano perpendicular a la dirección de la carga aplicada, $\varepsilon_{\text{trans}}$, y el alargamiento longitudinal producido, $\varepsilon_{\text{long}}$.³⁷

$$\nu = -\frac{\varepsilon_{\text{trans}}}{\varepsilon_{\text{long}}} \quad (2)$$

Mediante AFM pueden realizarse los denominados estudios de espectroscopía de fuerzas o AFM-FS, que como se ha comentado en capítulos previos se basan en la adquisición de un conjunto de curvas de fuerza-*indentación* que constituyen una matriz

de curvas de deflexión - desplazamiento de la muestra; estas matrices se analizan individualmente para permitir la reconstrucción espacial del mapa topográfico. Hemos de matizar aquí que el término *indentación* no está admitido todavía por la Real Academia Española (RAE) pero es un anglicismo frecuentemente utilizado en español, equivalente a términos castellanos como hendidura o incisión; no obstante, dada la extensión de esta terminología en la literatura científica en español se va a utilizar en este capítulo. Estos experimentos se interpretan mediante un modelo de mecánica de contacto apropiado para obtener el parámetro de módulo de Young efectivo de la muestra. Existen varios modelos teóricos disponibles en la literatura, aunque el de Hertz⁴⁰ o su versión más general de Sneddon,^{38,39} son los más utilizados en este contexto específico. Mientras que la teoría de Sneddon aborda el problema general de cualquier geometría de punta axisimétrica (esférica, paraboloidal, cónica...), la teoría de Hertz es más restringida, considerando solo el caso de una forma de punta paraboloidal. Sorprendentemente, el enfoque de Hertz puede considerarse una muy buena aproximación de una punta esférica en caso de que se realicen pequeñas indentaciones.⁴¹ Ambos modelos se basan en tres supuestos principales:⁴¹ 1) una muestra continua, 2) linealidad entre tensores y tensores de deformación y 3) un espesor de muestra infinito. Si bien la primera hipótesis significa que la naturaleza discreta real de la muestra no afecta las propiedades nanomecánicas, la segunda es crucial para relacionar las curvas de fuerza frente a la indentación solo con la propiedad elástica de la muestra, descartando cualquier contribución cuadrática. El tercer supuesto, en cambio, considera que el sustrato rígido sobre el que se deposita la muestra está demasiado lejos de la región de indentación como para afectar las propiedades nanomecánicas de la muestra. Si se revisa la literatura, encontramos que Dimitriadis y coautores⁴² han demostrado teóricamente que la contribución del sustrato al módulo de Young no es despreciable. Cuando la muestra se indenta con la punta del AFM, la fuerza

aplicada se propaga a través del espesor finito de la muestra hasta el sustrato rígido y rebota modificando la desviación de la punta, tal y como se muestra en la Figura 2. Si no se corrige, esto implica un artefacto en el valor del módulo de Young obtenido para la muestra sobreestimando el valor real. A este efecto se conoce como artefacto debido al sustrato o en inglés “*bottom effect*”.^{43,44} Recientemente, García y coautores⁴⁴ analizaron con detalle la teoría del efecto debido al sustrato, proporcionando una descripción general y aportando simulaciones del método de elementos finitos (FEM). Los mismos autores también publicaron una extensión de este fenómeno de muestras elásticas a viscoelásticas.⁴⁵ A pesar de que hay varias contribuciones teóricas³⁸⁻⁴⁰ las pruebas experimentales que muestran el efecto debido al sustrato y de la validez del enfoque de García son muy escasas en la literatura,⁴⁶⁻⁴⁸ y por ello en esta tesis hemos aportado una demostración experimental a la existencia de este efecto y a sus correcciones para obtener un valor correcto del módulo de Young en muestras blandas, en concreto, en un modelo de membrana celular.⁴⁹

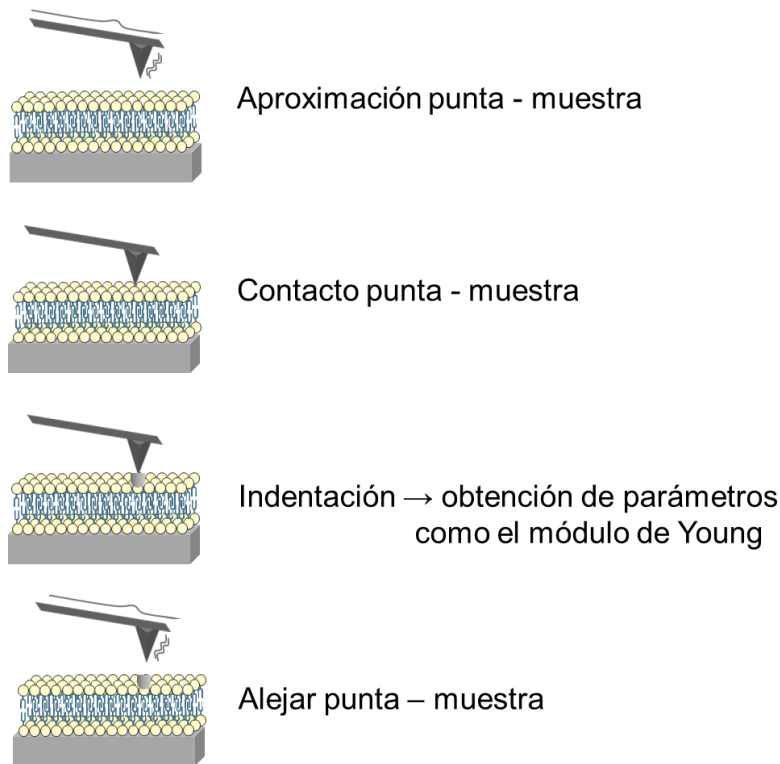


Figura 2. Esquema que muestra los pasos llevados a cabo en un experimento AFM-FS.

El objetivo de este capítulo es estudiar cómo influye la rigidez de un sustrato en la determinación del módulo de Young mediante curvas de fuerzas obtenidas con un microscopio de fuerza atómica. Para ello se van a investigar las propiedades nanomecánicas de películas blandas compuestas por un glicosfingolípido sintético (GSL), que muestra dos regiones de diferente espesor.

Se van a comparar dos modelos, el modelo de mecánica estándar, Sneddon, y la corrección de artefactos de García. Con el primer modelo se obtienen dos módulos de Young diferentes (lo que no tiene sentido físico) mientras que, con la corrección del sustrato acorde al modelo de García, se obtiene un único valor. Por lo tanto, se demuestra experimentalmente la existencia del artefacto debido al sustrato y se confirma la validez de la teoría de García para determinar el módulo de Young de la muestra de una manera correcta, sin la influencia del sustrato.

Finalmente, se proporcionan simulaciones FEM que muestran una buena concordancia con las curvas de fuerza-indentación experimentales, lo que confirma una vez más la solidez de la teoría del efecto del sustrato de García.

2. Resultados y discusión

Para poder poner en práctica la simulación de García y poder compararla con Sneddon, es necesario utilizar una película “blanda” para ello se va a emplear uno de los glicoesfingolípidos (GSL) sintéticos previamente descritos. En este caso se seleccionó el β -D glucopiranosido sin modificar en posición 6 (Figura 3). Se eligió este GSL dado que resulta de forma espontánea en películas de Langmuir-Schaefer con regiones de diferente espesor por lo que es un ejemplo idóneo para que, aplicando las correcciones oportunas, se obtenga el mismo módulo de Young, independientemente del espesor de la película.

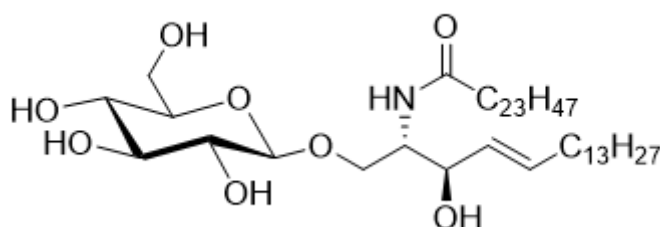


Figura 3. Estructura química de la molécula de GSL utilizada en este capítulo.

Como se puede observar en la estructura del GSL estudiado en este capítulo e ilustrado en la Figura 3, éste contiene dos cadenas hidrocarbonadas de diferente longitud que le confieren insolubilidad en agua y favorecen las interacciones laterales de van der Waals entre moléculas vecinas, estabilizando la película de Langmuir y ulteriormente, las películas de Langmuir-Schaefer. Para conocer el número de capas en la película LB es necesario conocer la longitud de la molécula de GSL; para ello, se realizó un cálculo

teórico utilizando el programa Spartan®08 V 1.0.0 y asumiendo una configuración *trans zig-zag* de las cadenas alquílicas, lo que resulta en una longitud de 3,3 nm, tal y como se observa en la Figura 4.

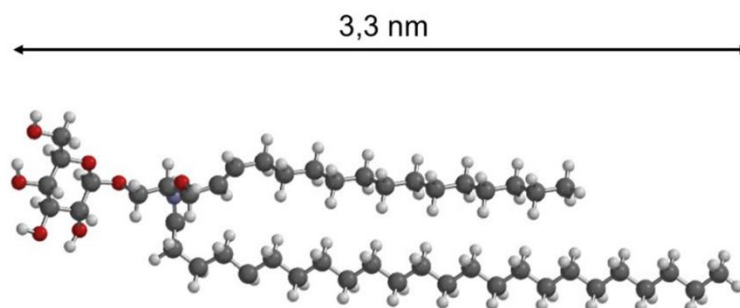


Figura 4. Cálculo teórico de la altura de una molécula de GSL utilizando el programa Spartan®08 V 1.0.0

Las películas de Langmuir-Schaefer (LS) del GSL estudiado se obtuvieron transfiriendo la película de Langmuir sobre un sustrato dispuesto de forma horizontal (paralelo a la superficie del agua) a una presión superficial de $8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. El sustrato empleado fue mica previamente exfoliada (para más información sobre el proceso de fabricación consultar el capítulo de materiales y métodos).

Los estudios de AFM de una película LS del GSL (Figura 5.a) revelan la presencia de regiones de la película de diferente espesor, como se aprecia en la Figura 5.b y c. que muestran la topografía obtenida y la correspondiente sección transversal de la película.

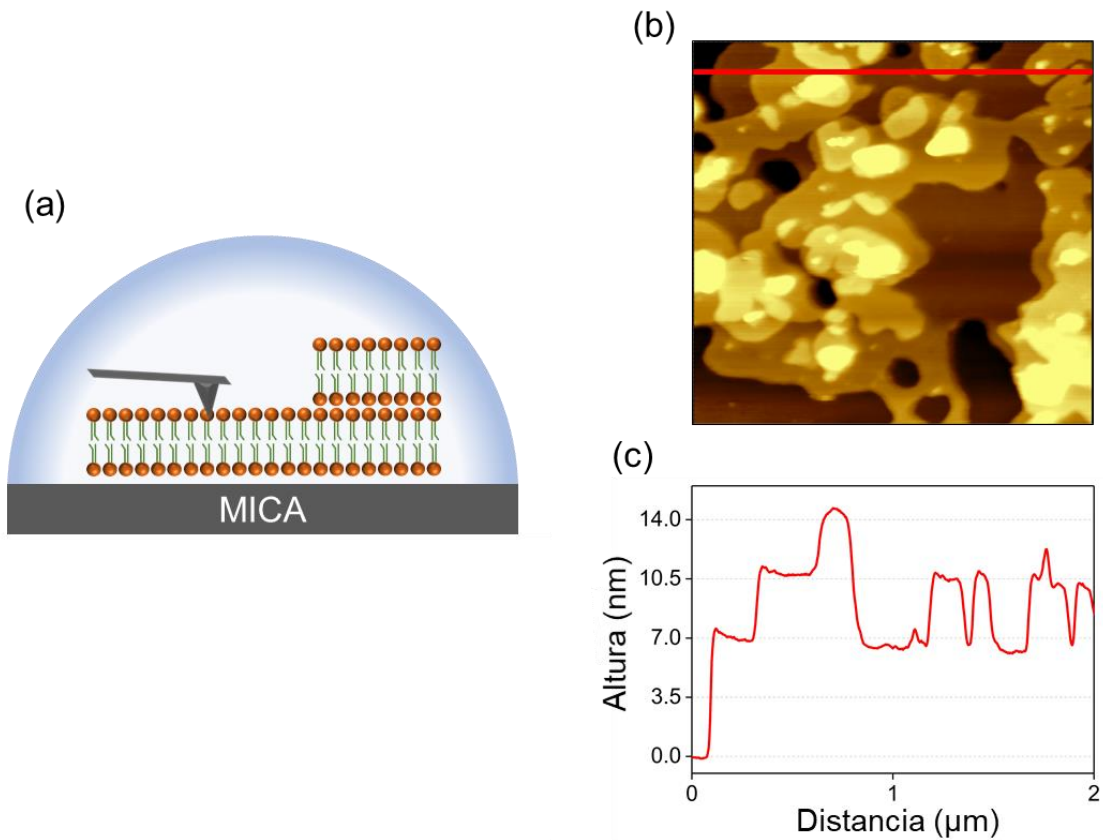


Figura 5. a) Esquema del experimento de AFM llevado a cabo en medio líquido donde se pueden distinguir las dos regiones de GSL formadas por 2 capas y 4 capas. b) Imagen AFM representativa de una región de $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ de GSL en HEPES 10 mM, NaCl 300 mM, MgCl₂ 20 mM (pH = 7,4), sobre un sustrato de mica. c) Sección transversal donde se aprecian tres regiones de diferentes alturas de aproximadamente 7 nm, 11 nm y 14 nm de altura, correspondientes a regiones de 2 capas, 3 capas y 4 capas, respectivamente.

Para averiguar si las cabezas polares de las moléculas de GSL están orientadas hacia afuera, es decir, expuestas al medio líquido, se midió el ángulo de contacto de la muestra obteniéndose un valor inferior a 10° , tal y como se muestra en la Figura 6, confirmando que la parte hidrofílica es la que está expuesta al exterior.



Figura 6. Imagen óptica representativa del ángulo de contacto en la parte superior del GSL. La medición del ángulo de contacto proporcionó un valor inferior a 10°.

La Figura 5.b muestra una imagen de AFM del GSL obtenida en HEPES 10 mM, NaCl 300 mM y MgCl₂ 20 mM (pH = 7,4). Este tampón se eligió para simular un pH fisiológico y para exponer la muestra a una fuerza iónica alta, con el fin de reducir la extensión de las interacciones electrostáticas que tiene lugar entre la punta y la muestra. En la imagen de AFM se distinguen tres regiones principales con alturas de aproximadamente 7, 11 y 14 nm. Teniendo en cuenta la altura de la molécula de GSL estimada por el programa Spartan®08 V 1.0.0 (3,3 nm), las alturas obtenidas de 7, 11 y 14 nm son consistentes con un espesor correspondiente a películas de 2 capas, 3 capas y 4 capas, respectivamente. La pequeña diferencia, aproximadamente medio nanómetro, entre el doble teórico de la longitud de la molécula (6,6 nm) y el grosor de la bicapa (aproximadamente 7 nm) podría deberse a la presencia de una fina capa líquida en la interfaz de mica,⁵⁰⁻⁵² o a las interacciones electrostáticas con la punta.⁵³ A continuación, solo se estudiarán las regiones de 2 y 4 capas (Figura 5.a), ya que son las más relevantes para la comprobación de que el espesor de la capa no influye en el valor obtenido de módulo de Young, ya que este parámetro como se ha comentado en la introducción es una propiedad intrínseca de cada material y no debe depender del número de capas o del espesor del mismo cuando se encuentra inmovilizado en una superficie.

Para estudiar las propiedades nanomecánicas del GSL, se realizó un experimento AFM-FS cuyo procedimiento se ilustra en la Figura 7.a.

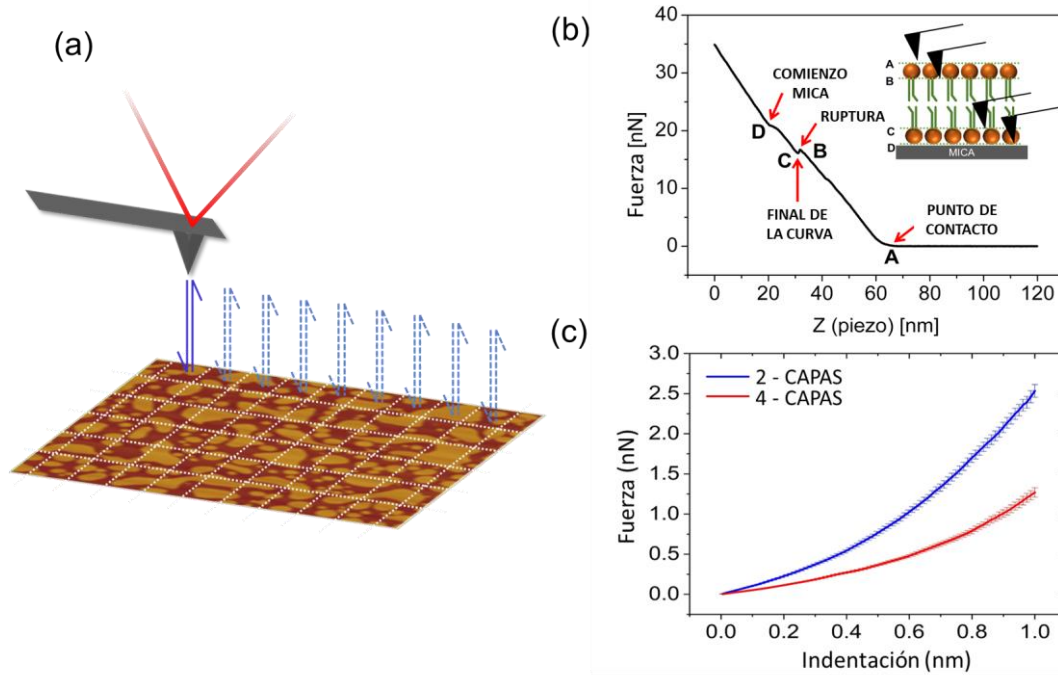


Figura 7. a) Representación del experimento de espectroscopia de fuerza mediante AFM donde se conforma una matriz de curvas de fuerza frente a distancia acercando y retirando la punta sobre la muestra. b) Curva representativa de fuerza-distancia, realizada en el GSL sobre mica en un medio líquido. Se destacan los cuatro puntos principales, de A a D: el punto A es el punto de contacto, el punto B proporciona la fuerza de ruptura, el punto C el salto y finalmente el punto D representa el contacto final con el sustrato de mica. c) Gráfica que muestra el promedio de curvas de fuerza-indentación obtenidas a partir de los datos experimentales. Los datos representados en azul corresponden a indentaciones en regiones de 2 capas (aprox. 7 nm) mientras que los datos representados en rojo corresponden a regiones de 4 capas (aprox. 14 nm).

Después de la inmersión de la muestra en el medio líquido, se registró una imagen AFM de $2 \times 2 \mu\text{m}^2$. Se realizaron curvas de fuerza sobre la película, acercando y retirando la punta a la muestra tal como se explica en la Figura 7.a. y así poder obtener sus propiedades nanomecánicas. En la Figura 7.b se proporciona una curva representativa de fuerza (eje y) frente a la distancia (eje x), de AFM obtenida en una región de bicapa en

medio líquido. La línea negra es el conjunto de datos que muestran todo el proceso. Algunos puntos son especialmente relevantes en esta curva. Empezando desde el punto más alejado del eje x de la figura 7.b, Z (piezo) ≈ 120 nm, correspondiente a una región sin interacción punta-muestra, con una fuerza insignificante operando entre la punta y la muestra. En Z (piezo) ≈ 65 nm, se alcanza el punto de contacto (punto A en la imagen), en ese momento, la punta de AFM comienza a indentar en la muestra, produciéndose un aumento en la fuerza registrada. Este aumento dura hasta que ocurre el evento de ruptura de la capa (punto B), donde se observa un salto en la curva fuerza-distancia; esto corresponde a la ruptura de la capa superior de las cabezas polares GSL en la interfaz sólido-líquido y la consecuente caída de la punta a través de las cadenas blandas de hidrocarburos del GSL hasta alcanzar las últimas cabezas polares en contacto con la mica (puntos BC). A continuación, se produce la indentación final hasta que la punta toca la mica y se puede distinguir el inicio del régimen de contacto de la mica, con indentación cero, (punto D). En particular, la distancia Z (piezo) entre el punto A y el punto D no es igual al espesor de la bicapa, aproximadamente 7 nm, lo que se debe a la desviación de la punta durante la indentación.⁵⁴

Una vez que se registraron las curvas de fuerza-distancia, se utilizó un código Python de nanomecánica adaptado a estas medidas realizado por el Dr. Stefano Chiodini del grupo de investigación Platón para poder extraer el módulo de Young de la muestra de las curvas experimentales de fuerza-indentación (se proporciona una descripción completa de este código en la sección materiales y métodos: código Python de nanomecánica). En este código, se debe seleccionar un modelo específico de mecánica de contacto, junto con una elección adecuada del punto de contacto.⁵⁵ Como primera aproximación, se aplicó el modelo de Sneddon para una geometría de punta paraboloidal:

$$F_{\text{SNEDDON}} = \frac{4}{3} E_{\text{eff}} \sqrt{R} \delta^{3/2} \quad (3)$$

donde E_{eff} , R y δ corresponden con el módulo de Young efectivo, el radio de la punta y la indentación, respectivamente. En particular, el módulo de Young efectivo, E_{eff} , se describe como:

$$\frac{1}{E_{\text{eff}}} = \frac{(1-\nu_t^2)}{E_t} + \frac{(1-\nu_s^2)}{E_s} \quad (4)$$

donde ν_t , ν_s , E_t y E_s corresponden al coeficiente de Poisson de la punta ($\nu_t = 0,3$), el coeficiente de Poisson de la muestra ($\nu_s = 0,5$),²⁹ el módulo de Young de la punta ($E_t = 170$ GPa) y el módulo de Young de la muestra (E_s), respectivamente.

Para poder aplicar el modelo de Sneddon, la ecuación (3) se basa en dos supuestos adicionales: i) no hay adherencia entre la punta de AFM y la muestra y ii) la punta tiene una geometría paraboloidal.

En el caso de nuestros experimentos, primero hay que comprobar que no hay adherencia entre la punta de AFM y la muestra. Así, en la Figura 8, donde se muestra una curva de deflexión frente al desplazamiento del piezoeléctrico, no se puede apreciar ninguna adherencia entre la punta y la muestra.

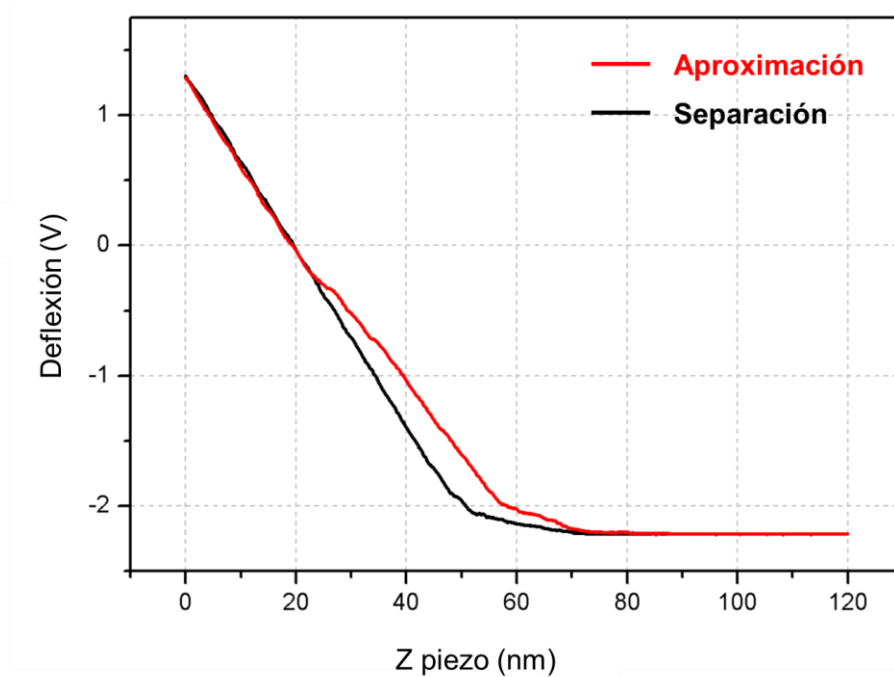


Figura 8. Curva de deflexión frente al desplazamiento Z del piezoeléctrico donde se muestra la aproximación (línea roja) y retirada (línea negra) observándose un desplazamiento de la región de no interacción en aproximadamente $-2V$.

Con respecto al segundo supuesto, inicialmente se supuso una geometría esférica para la punta debido a que su radio nominal se encontraba entre 2 y 12 nm (para más información del cálculo del radio inicial y final de la punta puede consultarse el capítulo de materiales y métodos, sección- código Pynthon de nanomecánica). En particular, en el caso de indentaciones que sean más pequeñas que el radio de la punta, la geometría de la punta esférica se puede aproximar mediante una paraboloidal; este tipo de geometría de la punta es la que se considerará a lo largo de este capítulo.

Dado que el modelo de Sneddon no corrige el artefacto debido al sustrato, cabe esperar que el valor del módulo de Young obtenido usando este modelo sea distinto para los dos diferentes espesores obtenidos en las películas de GSL, a pesar de que el material es el mismo. Para evitar este resultado obviamente incorrecto, el grupo de Ricardo García⁴⁴ propuso una corrección completa del artefacto debido al sustrato que, para la

misma geometría de la punta paraboloidal, genera la siguiente expresión de la mecánica de contacto fuerza-indentación:

$$F_{\text{GARCIA}} = F_{\text{SNEDDON}} \left[1 + \frac{1.133\sqrt{\delta R}}{h} + \frac{1.497\delta R}{h^2} + \frac{1.469\delta R\sqrt{\delta R}}{h^3} + \frac{0.755(\delta R)^2}{h^4} \right] \quad (5)$$

Como puede observarse, esta ecuación proporciona una corrección a la fórmula de Sneddon, compuesta por cuatro términos. Es importante subrayar que estos términos son una función de la relación entre el radio de contacto, $(\delta \cdot R)^{1/2}$, y el espesor, h , de la película blanda objeto de estudio.

En la Figura 7.c, se muestra el promedio de las curvas de fuerza frente a la indentación realizadas en las regiones de 2 y 4 capas, es decir, capas con una altura de 7 nm (curva azul) y 14 nm (curva roja), respectivamente. Ambas curvas se cortaron a 1 nm de indentación máxima para acomodar los datos al supuesto de punta con geometría paraboloidal y, al mismo tiempo, para evitar cualquier tipo de no linealidad (entre tensión y deformación) relacionada con el evento de ruptura que tiene lugar al aplicar suficiente fuerza sobre la membrana. A esta incisión máxima le corresponde una deformación máxima (incisión / espesor de la muestra) de aprox. 14%, por lo tanto, por debajo de lo que se considera el límite para una muestra puramente elástica, que es de un 20%.³ A pesar de que el material es el mismo, las dos curvas siguen comportamientos diferentes, presentando la curva azul (correspondiente a regiones de 2 capas) valores de fuerza más altos, para la misma indentación, con respecto a la curva roja (correspondiente a regiones de 4 capas). Se puede afirmar que esta observación evidencia el artefacto debido al sustrato, que es más pronunciado en la membrana de 7 nm de espesor debido a que existe una distancia más corta con el sustrato. Así, la presencia de regiones de diferente espesor del mismo material condiciona la magnitud del artefacto debido al sustrato al cambiar la

longitud de propagación de la fuerza de la punta aplicada, desde el punto de contacto (Figura 7.b, punto A), al sustrato de mica (Figura 7.b, punto D).

En la Figura 9 se proporciona un análisis más completo del efecto que tiene el sustrato en la determinación del módulo de Young para el sistema que se ha estado estudiando (Figura 9.a). El análisis de las curvas fuerza-indentación con el fin de determinar el módulo de Young de la muestra, se efectuó mediante el código Python de Nanomecánica (ver materiales y método-medida del radio de la punta, donde se asume una geometría de punta paraboloidal). La Figura 9.b muestra los histogramas de módulo de Young de la muestra correspondientes a las curvas de indentación de fuerza realizadas en regiones de 2 capas (datos azules) y regiones de 4 capas de espesor (datos rojos).

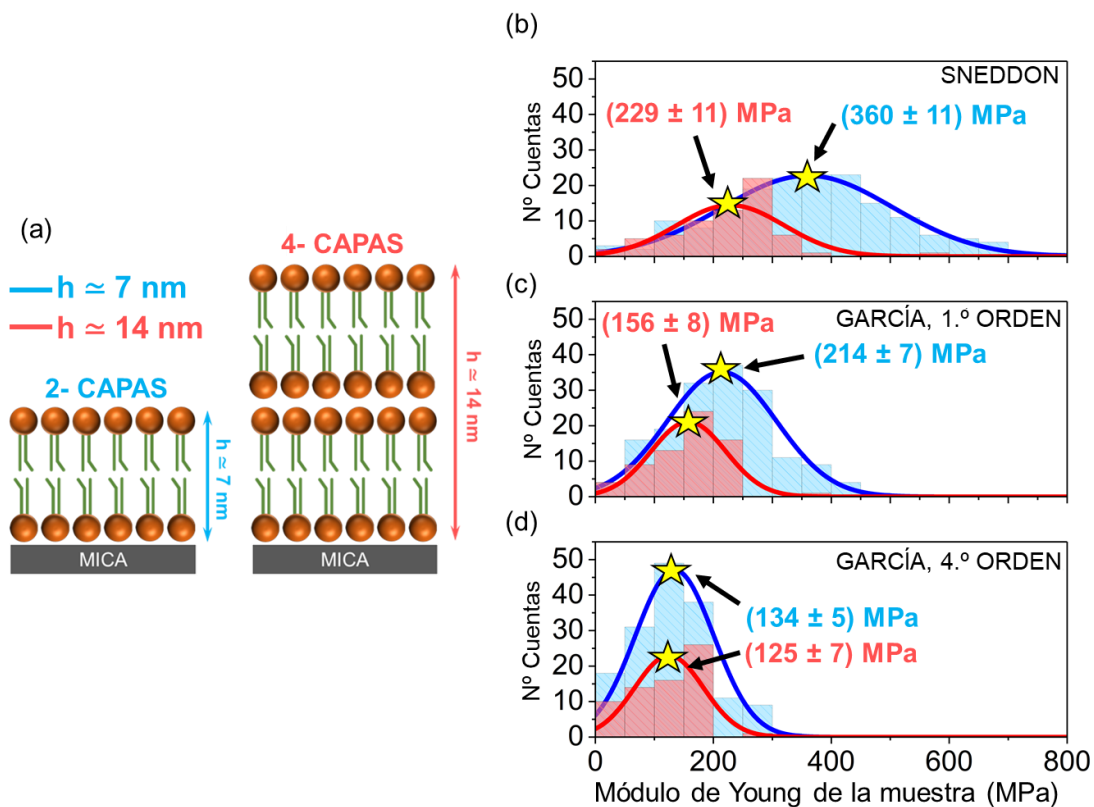


Figura 9.a) Representación del sistema estudiado compuesto por regiones de 2 capas (altura $h \approx 7$ nm) y regiones de 4 capas de GSL (altura $h \approx 14$ nm). b) Histograma del módulo

de Young obtenido por curvas de fuerza-distancia realizadas en regiones de 2 capas (datos azules) y 4 capas (datos rojos) utilizando la fórmula de Sneddon, Ecuación (3). c) Histograma de módulo de Young obtenido mediante la fórmula de corrección de primer orden de García, Ecuación (3). d) Histograma de módulo de Young obtenido con la fórmula de corrección de cuarto orden de García, Ecuación (5). En la Figura 9b-cd, las líneas azul y roja son ajustes gaussianos de los histogramas de 2 y 4 capas, respectivamente, mientras que las estrellas amarillas indican los valores medios de los histogramas.

Al ajustar las curvas fuerza frente a la indentación con la teoría de Sneddon, Ecuación (3), se obtienen dos módulos de Young claramente diferentes ya que con esta teoría no se corrige el efecto del sustrato, lo que manifiesta con claridad que la presencia del sustrato rígido no es despreciable en sistemas como el que aquí estamos abordando. La diferencia en el valor del módulo de Young para las regiones de 2 y 4 capas es de 131 ± 16 MPa, a pesar de que se trata del mismo material. Además, el módulo de Young obtenido para regiones de 7 nm de espesor es más alto que el módulo de Young para un área de 14 nm de espesor, lo que indica que el efecto del sustrato es más pronunciado en el caso de regiones más delgadas. Por el contrario, el ajuste con la fórmula completa de García, con la corrección de cuarto orden, Ecuación (5), proporciona el mismo valor de módulo de Young, con un valor medio de 130 MPa para las regiones de 2 capas y 4 capas (Figura 9.d). Este resultado está de acuerdo con la definición del módulo de Young como una propiedad intrínseca del material, por lo tanto, este parámetro es independiente del espesor de la muestra y se observa explícitamente que el artefacto debido al sustrato está completamente compensado por una corrección de cuarto orden dentro de la fórmula de García.

Para corroborar estos resultados y conclusiones, este análisis nanomecánico se realizó también para regiones de la película compatibles con tricapas de GSL, es decir,

para alturas de 11 nm de espesor, habiéndose obtenido resultados plenamente consistentes con las principales tendencias mostradas en la Figura 9. Hay que remarcar que solo las alturas correspondientes a 2 y 4 capas pueden considerarse equivalentes desde el punto de vista elástico, ya que exponen a la punta en el momento de la indentación la misma región molecular, es decir, las cabezas polares. En el caso de zonas de la película correspondientes a la presencia de 3 capas, la parte hidrofóbica es la que está expuesta al medio líquido. En la Tabla 1, se muestra un resumen de los valores del módulo de Young obtenidos para cada espesor y modelo de mecánica de contacto. Para el modelo de Sneddon, los datos de 3 capas siguen la misma tendencia que las regiones de 2 y 4 capas de espesor, es decir, cuanto más altura tiene la capa, menos relevante es el artefacto debido al sustrato y, por lo tanto, menor es el valor del módulo elástico. En particular, para la corrección de cuarto orden de García, se observa un cambio de esta tendencia, al menos en el valor medio del módulo de Young con regiones de 3 capas que muestran el módulo elástico más bajo. Esto podría deberse a que la región en contacto con la punta es ligeramente más suave, ya que está formada por cadenas hidrocarbonadas y no por cabezas polares.

Tabla 1. Valores de módulos de Young para regiones de 2 capas, 3 capas y 4 capas de espesor. La segunda columna muestra los módulos de Young obtenidos con el modelo de mecánica de contacto de Sneddon donde no se considera la corrección debido al sustrato. La tercera columna muestra los módulos elásticos obtenidos con la fórmula de García (Ecuación 5) con una corrección de primer orden y, por último, la cuarta columna muestra los módulos de Young obtenidos con la fórmula de García (Ecuación 5) con una corrección de cuarto orden.

	SNEDDON [MPa]	GARCÍA, 1°. ORDEN [MPa]	GARCÍA, 4°. ORDEN [MPa]
<i>2 capas</i>	360 ± 11	214 ± 7	134 ± 5
<i>3 capas</i>	239 ± 11	154 ± 7	123 ± 10
<i>4 capas</i>	229 ± 11	156 ± 8	125 ± 7

El valor del módulo de Young obtenido para el GSL (Figura 9.b) está en concordancia con los valores mostrados en la literatura para las moléculas de fosfolípidos que van desde 30 MPa a 300 MPa,^{26,29,32,56} con algunas discrepancias atribuibles a diferencias en la estructura química del material biológico y a la presencia de sales en el tampón utilizado.^{26,56}

También se realizó el análisis estadístico del módulo de Young de la muestra ajustando todas las curvas fuerza-indentación con la fórmula de García (Ecuación (5)) pero utilizando solo la corrección de 1^{er} orden. Como se muestra en la Figura 9.c, la corrección del artefacto debido al sustrato con la corrección de 1^{er} orden, produce dos valores más cercanos al módulo de Young con respecto al enfoque de Sneddon, con una diferencia de 58 MPa, pero aún no compensa completamente la rigidez que aporta el sustrato a la muestra en el cálculo relativo del módulo de Young. Para las correcciones de 2^o y 3^o orden de García se obtienen diferencias de 17 MPa y 15 MPa, confirmando una corrección progresiva proveniente de los cuatro términos de la Ecuación (5).

Todos estos resultados experimentales confirman que el uso de la corrección de artefactos por el sustrato rígido introducida por García, es necesaria para una correcta

determinación del módulo de Young para películas blandas que están soportadas sobre un sustrato rígido, de lo contrario los valores obtenidos para el módulo de Young pueden ser cuestionables.

Para verificar los resultados de la Figura 9, se realizaron simulaciones del método de elementos finitos (FEM) a través de una colaboración con el Dr. Pablo García del Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid (ICMM-CSIC). Estas simulaciones de FEM proporcionan el correcto comportamiento nanomecánico del material investigado y se corrobora que están de acuerdo con la teoría de García.⁴⁴ La Figura 10.a muestra la interfaz entre la punta de AFM y una región elástica finita de 2 capas (espesor de 7 nm) y el soporte rígido. Para una indentación máxima simulada de 1 nm, las tensiones de Von Mises⁵⁷ se extienden por todo el espesor de la capa elástica, debido a que el radio de contacto de la punta es relativamente amplio. Esta propagación de la tensión es la causa del artefacto debido al sustrato, ya que se conecta mecánicamente la punta con el sustrato. En la Figura 10.b, se comparan los datos de las curvas de fuerza-indentación obtenidos por simulaciones FEM (representados en la gráfica con símbolos) con los datos experimentales medios (línea continua en la gráfica) obteniendo una buena concordancia y demostrando la consistencia de dos de las hipótesis discutidas en la sección de introducción: la naturaleza continua y la linealidad de la muestra. Estos dos supuestos se incluyen explícitamente en el modelo FEM, pero no necesariamente se aplican a todos los materiales que se estudien. Sin embargo, la concordancia entre las simulaciones y los resultados experimentales que se muestran en la Figura 10.b respalda la validez del método de García.

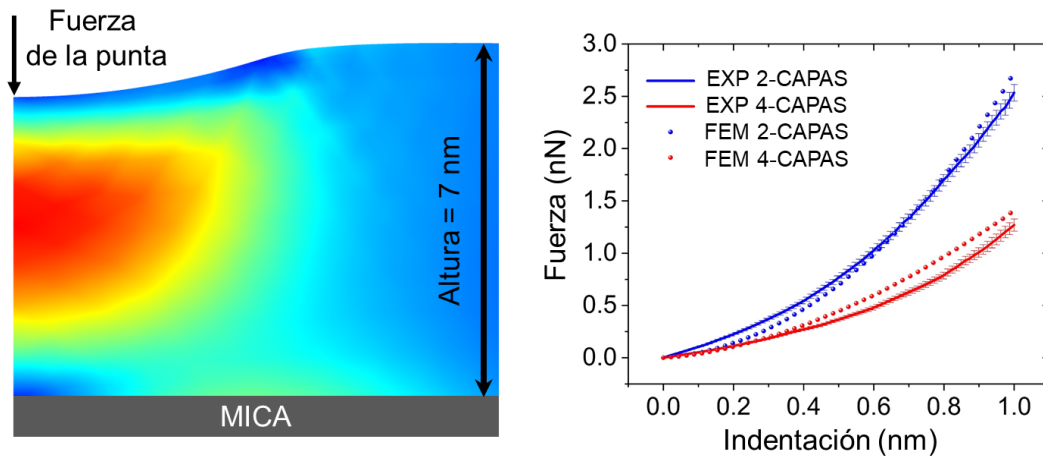


Figura 10.a) Sección transversal de una simulación FEM de la punta de AFM indentando una región de 2 capas (7 nm). El mapa de color representa la tensión de Von Mises simulada dentro de la muestra (rojo: tensión alta, azul: tensión pequeña), debido a la fuerza vertical aplicada por la punta esférica. b) Comparación de curvas de fuerza-indentación entre simulaciones FEM (símbolos) y datos experimentales medios (líneas continuas), para los dos espesores de capa diferentes (2 capas: datos azules, 4 capas: datos rojos).

Como se observa en la Figura 10.b existe una pequeña discrepancia entre los datos experimentales y los obtenidos con FEM principalmente en el caso de 4 capas (en rojo). Esta discrepancia podría deberse a varias razones: i) las simulaciones FEM no tienen en cuenta la viscosidad de la muestra, ya que solo se consideran propiedades elásticas, aunque se sabe que los fosfolípidos muestran comportamientos viscoelásticos^{32,58} por lo tanto, se necesitaría una descripción mecánica más completa, ii) las simulaciones FEM se basan en la elasticidad lineal que, además, podría ser solo una descripción de primer orden, descuidando las contribuciones no lineales, iii) la curva experimental de 4 capas (línea continua en color rojo) corresponde al promedio de 60 curvas de indentación, es decir, probablemente se necesitaría realizar una estadística mayor. Esto también podría ser en parte una razón para un peor ajuste, en el caso de 4 capas con respecto a una curva experimental de 2 capas, ya que de esta última se realizó una estadística más alta, de 180

curvas (debido a que el recubrimiento de las regiones de 4 capas es menor que las áreas de la muestra que están recubiertas por 2 capas).

Finalmente, siguiendo la Ecuación (5), conviene hacer hincapié en que la relación entre el radio de contacto, $(\delta \cdot R)^{1/2}$, y el espesor de la muestra h , es el parámetro clave para la evaluación de la relevancia del artefacto debido al sustrato para las propiedades nanomecánicas de AFM de una muestra soportada en un sustrato. En el ejemplo estudiado en este capítulo, debido a una indentación máxima de 1 nm y un radio de punta de 17 nm (ver capítulo materiales y métodos: cálculo de radio de la punta de AFM), la relación entre el radio de contacto y el espesor de la muestra es de aproximadamente 0,5, lo que se traducen un artefacto significativo debido al sustrato rígido. Esta conclusión también está respaldada por la simulación proporcionada en la Figura 10.a, donde la dimensión vertical de la región roja (zona de alta tensión) está en el mismo orden de magnitud que el radio de contacto, y las tensiones se pueden considerar como una relación mecánica entre la punta y la muestra planteando un artefacto importante debido al sustrato. Por lo tanto, estos resultados indican que la regla aceptada, de que una indentación máxima inferior al 10-20% del espesor de la muestra es suficiente para no considerar un artefacto el efecto producido por el sustrato no se puede aplicar para todas las muestras.

3. Conclusiones

En este capítulo se ha estudiado cómo influye la rigidez de un sustrato en la determinación del módulo de Young de una película blanda depositada sobre el mismo. Para ello, mediante la técnica de Langmuir-Schaefer se han obtenido películas de GSL que mostraban regiones de diferentes espesores sobre un sustrato de mica rígida y se analizaron sus propiedades mecánicas.

La aplicación de un modelo de mecánica de contacto estándar, como la teoría de Sneddon, produce un valor de módulo de Young dependiente del espesor debido al efecto del sustrato, lo que indica que esta hipótesis de trabajo no es válida ya que el valor del módulo de Young es característico del material y no de su espesor.

Se ha demostrado que la aplicación del modelo de García, con una corrección de 4º orden, resulta en un único valor de módulo de Young para la muestra, independiente del espesor de la película.

Además, estas observaciones se han validado mediante simulaciones del método de elementos finitos (FEM).

También se ha probado que si la indentación es del 10-20% del espesor de la muestra (en este caso aproximadamente 1 nm), no puede asegurarse que la contribución nanomecánica del sustrato sea despreciable. De hecho, el parámetro crucial para determinar la magnitud y relevancia del artefacto debido al sustrato es la relación entre el radio de contacto (y no sólo la indentación) y el espesor de la muestra.

La estructura química anfifílica del material estudiado en este capítulo es representativa de varios tipos de materiales biológicos, lo que abre el camino para futuras determinaciones de un valor correcto del módulo de Young tanto en membranas lipídicas soportadas como en otros tipos de muestras blandas.

4. Bibliografía

- (1) Roca-Cusachs, P .; Conte, V .; Trepap, X., N. Quantifying forces in cell biology. *Cell Biol.* **2017**, *19*, 742–751.
- (2) E.K. Paluch, C.M. Nelson, N. Biais, et al. Mechanotransduction: use the force(s). *BMC Biol.* **2015**, *13*, 47–61.
- (3) Krieg, M.; Fläschner, G.; Alsteens, D.; Gaub, B. M.; Roos, W. H.; Wuite, G. J. L.; Gaub, H. E.; Gerber, C.; Dufrêne, Y. F.; Müller, D. J. Atomic Force Microscopy-Based Mechanobiology. *Nat. Rev. Phys.* **2019**, *1* (1), 41–57.
- (4) Mandriota, N .; Friedsam, C .; Jones-Molina, JA; Tatem, KV; Ingber, DE; Sahin, O. Cellular nanoscale stiffness patterns governed by intracellular forces. *Nat. Mater.* **2019**, *18* (10), 1071–1077.
- (5) Lekka, M.; Laidler, P.; Gil, D.; Lekki, J.; Stachura, Z.; Hryniewicz, A. Z. Elasticity of Normal and Cancerous Human Bladder Cells Studied by Scanning Force Microscopy. *Eur. Biophys. J.* **1999**, *28* (4), 312–316.
- (6) Fuhrmann, A .; Staunton, JR; Nandakumar, V .; Banyai, N .; Davies, PCW; Ros, R. AFM stiffness nanotomography of normal, metaplastic and dysplastic human esophageal cells. *Phys. Biol.* **2011**, *8* (1), 015007-015007.
- (7) Plodinec, M .; Loparic, M .; Monnier, CA; Obermann, EC; Zanetti-Dallenbach, R .; Oertle, P .; Hyotyla, JT; Aebi, U .; Bentires-Alj, M .; Lim, RYH; Schoenenberger, C.-A. The nanomechanical signature of breast cancer. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7* (11), 757-765.
- (8) Wootton, D. M.; Ku, D. N. Fluid Mechanics of Vascular Systems, Diseases, and

- Thrombosis. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **1999**, *1* (1), 299–329.
- (9) Hinz, B. Mechanical Aspects of Lung Fibrosis: A Spotlight on the Myofibroblast. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2012**, *9* (3), 137–147.
- (10) Cross, S. E.; Jin, Y.-S.; Rao, J.; Gimzewski, J. K. Nanomechanical Analysis of Cells from Cancer Patients. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2* (12), 780–783.
- (11) Faria, E. C.; Ma, N.; Gazi, E.; Gardner, P.; Brown, M.; Clarke, N. W.; Snook, R. D. Measurement of Elastic Properties of Prostate Cancer Cells Using AFM. *Analyst* **2008**, *133* (11), 1498–1500.
- (12) Oh, H. Y.; Lee, E. J.; Yoon, S.; Chung, B. H.; Cho, K. S.; Hong, S. J. Cholesterol Level of Lipid Raft Microdomains Regulates Apoptotic Cell Death in Prostate Cancer Cells through EGFR-Mediated Akt and ERK Signal Transduction. *Prostate* **2007**, *67* (10), 1061–1069.
- (13) Gumí-Audenis, B. ; Giannotti, MI, Caracterización estructural y mecánica de membranas modelo soportadas por AFM en membranas lipídicas biomiméticas: fundamentos, aplicaciones y comercialización, Kök, FN; Arslan Yildiz, A. ; Inci, F., E. S. I. **2019**.
- (14) Roiter, Y.; Ornatska, M.; Rammohan, A. R.; Balakrishnan, J.; Heine, D. R.; Minko, S. Interaction of Nanoparticles with Lipid Membrane. *Nano Lett.* **2008**, *8* (3), 941–944.
- (15) Lee, K.; Zhang, L. ; Yi, Y. ; Wang, X. ; Yu, Y. Rupture of Lipid Membranes Induced by Amphiphilic Janus Nanoparticles. *ACS Nano* **2018**, *12* (4), 3646–3657.

- (16) Gumí-Audenis, B .; Costa, L .; Redondo-Morata, L .; Milhiet, P.-E .; Sanz, F .; Felici, R .; Giannotti, MI; Carlà, F. In-plane molecular organization of hydrated single lipid bilayers: DPPC:cholesterol. *Nanoescale* **2018**, *10* (1), 87–92.
- (17) Chiodini, S .; Reinares-Fisac, D .; Espinosa, FM; Gutiérrez-Puebla, E .; Monge, A .; Gándara, F .; García, R. Self-organization of complete organic monolayers via sequential post-deposition annealing. *Sci. Repts* **2017**, *7* (1), 11088-11094.
- (18) Zuttion, F .; Redondo-Morata, L .; Marchesi, A .; Casuso, I., Imágenes de microscopio de fuerza atómica de alta resolución y alta velocidad. En Imágenes a nanoescala: métodos y protocolos, Lyubchenko, YL, Ed. Springer New York: Nueva York, N.; **2018**.
- (19) Haro, M.; Giner, B.; Lafuente, C.; López, M. C.; Royo, F. M.; Cea, P. Proton Sponge and Fatty Acid Interactions at the Air-Water Interface. Thermodynamic, Spectroscopic, and Microscopic Study. *Langmuir* **2005**, *21* (7), 2796–2803.
- (20) Villares, A .; Martín, S .; Giner, I .; Díaz, J .; Lydon, DP; Bajo, PJ; Cea, P. The Use of Scanning Polarization Force Microscopy to Study the Miscibility of a Molecular Wire Candidate and an Insulating Fatty Acid in Mixed LB Films. *Soft Matter* **2008**, *4* (7), 1508-1514.
- (21) Ruiz-Rincón, S.; González-Orive, A.; De La Fuente, J. M.; Cea, P. Reversible Monolayer-Bilayer Transition in Supported Phospholipid LB Films under the Presence of Water: Morphological and Nanomechanical Behavior. *Langmuir* **2017**, *33* (30), 7538–7547.
- (22) Gumí-Audenis, B .; Sanz, F .; Giannotti, M. Impact of Galactosylceramide on the nanomechanical properties lipid bilayer models: AFM-force spectroscopy study.

- Soft Mater.* **2015**, *11* (27), 5447-5454.
- (23) Gumí-Audenis, B .; Costa, L .; Carlá, F .; Comin, F .; Sanz, F .; Giannotti, M. Structure and Nanomechanics of Model Membranes by Atomic Force Microscopy and Spectroscopy: Insights into the Role of Cholesterol and Sphingolipids *Membranes* **2016**, *6* (4), 58-77.
- (24) Redondo-Morata, L.; Giannotti, M. I.; Sanz, F. Influence of Cholesterol on the Phase Transition of Lipid Bilayers: A Temperature-Controlled Force Spectroscopy Study. *Langmuir* **2012**, *28* (35), 12851–12860.
- (25) Asakawa, H.; Fukuma, T. The Molecular-Scale Arrangement and Mechanical Strength of Phospholipid/Cholesterol Mixed Bilayers Investigated by Frequency Modulation Atomic Force Microscopy in Liquid. *Nanotechnology* **2009**, *20* (26), 264008.
- (26) Trewby, W .; Faraudo, J .; Voitchovsky, K. Long-lived ionic nano-domains can modulate the stiffness of soft interfaces. *Nanoescale* **2019**, *11* (10), 4376-4384.
- (27) Fukuma, T .; Higgins, MJ; Jarvis, S. Direct imaging of lipid-ion network formation under physiological conditions by frequency modulation atomic force microscopy. *Phys. Rev. Lett* **2007**, *98* (10), 106101-106101 (4).
- (28) Fukuma, T .; Higgins, MJ; Jarvis, SP, B. J. Direct imaging of individual intrinsic hydration layers on lipid bilayers at Angstrom resolution. *Biophys. J.* **2007**, *92* (10), 3603-3609.
- (29) Picas, L .; Rico, F .; Scheuring, S., B. J. Direct measurement of the mechanical properties of lipid phases in supported bilayers. *Biophys. J.* **2012**, *102* (1), L01-L03.

- (30) Amo, CA; Perrino, AP; Payam, AF; García, R. Mapping Elastic Properties of Heterogeneous Materials in Liquid with Angstrom-Scale Resolution. *ACS Nano* **2017**, *11* (9), 8650-8659.
- (31) Kocun, M .; Labuda, A .; Meinhold, W .; Revenko, I .; Proksch, R. Fast, High Resolution, and Wide Modulus Range Nanomechanical Mapping with Bimodal Tapping Mode. *ACS Nano* **2017**, *11* (10), 10097-10105.
- (32) Al-Rekabi, Z .; Contera, S. Multifrequency AFM reveals lipid membrane mechanical properties and the effect of cholesterol in modulating viscoelasticity *Proc. Natl. Acad. Sci. United States* **2018**, *115* (11), 2658-2663.
- (33) Rother, J .; Nöding, H .; Mey, I .; Janshoff, A. Atomic force microscopy-based microrheology reveals significant differences in the viscoelastic response between malign and benign cell lines. *Open Biology*. **2014**, *4* (5), 140046–140046.
- (34) F. Dufrêne, Y.; Boland, T.; W. Schneider, J.; R. Barger, W.; U. Lee, G. Characterization of the Physical Properties of Model Biomembranes at the Nanometer Scale with the Atomic Force Microscope. *Faraday Discuss.* **1999**, *111* (0), 79–94.
- (35) Garcia-Manyes, S.; Sanz, F. Nanomechanics of Lipid Bilayers by Force Spectroscopy with AFM: A Perspective. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2010**, *1798* (4), 741–749.
- (36) Li, JK; Sullan, RMA; Zou, S. Atomic force microscopy force mapping in the study of supported lipid bilayers. *Langmuir* **2011**, *27* (4), 1308-1313.
- (37) Mosca, G. Tipler.P. *Mecánica.Oscilaciones y Ondas.Termodinámica. Volumen 1;*

2005.

- (38) Sneddon, The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *International Journal. Eng. Sci.* **1965**, 3 (1), 47–57.
- (39) Harding, JW; Sneddon,. *Proc. Cambridge Philos. Soc* **2008**, 41 (1), 16-26.
- (40) Hertz, H., "Über die Berührung Fester Elastischer Körper". *Journal für die reine und Angew. Math.* **1882**, 1882, 156.
- (41) Popov, LV; Heb, M .; Willert, E. *Manual de Mecánica de Contacto. Soluciones Exactas de Problemas de Contacto Axisimétricos.*; **2019**.
- (42) Dimitriadis, EK; Horkay, F .; Maresca, J .; Kachar, B .; Chadwick, R.
Determination of elastic moduli of thin layers of soft material using the atomic force microscope. *Biophys. J.* **2002**, 82 (5), 2798-2810.
- (43) Gavara, N .; Chadwick, R. Determination of the elastic moduli of thin samples and adherent cells using conical atomic force microscope tips. *Nat.Nanotechnol.* **2012**, 7, 733.
- (44) García, PD; García, R. Determination of the Elastic Moduli of a Single Cell Cultured on a Rigid Support by Force Microscopy. *Biophys. J.* **2018**, 114 (12), 2923-2932.
- (45) García, PD; García, R. Determination of the viscoelastic properties of a single cell cultured on a rigid support by force microscopy *Nanoscale* **2018**, 10 (42), 19799-19809.
- (46) Pequeño.; Zhang, P .; Li, J .; Wang, Y .; Wei, Y .; Hu, J .; Zhou, X .; Xu, B .; Li,

- B. Configurable multi-state non-volatile memory behaviors in Ti₃C₂ nanosheets. *Nanoescape* **2019**, *11* (11), 4707–4711.
- (47) Doss, BL; Rahmani Eliato, K .; Lin, K.-h .; Ros, R. Quantitative mechanical analysis of indentations on layered, soft elastic materials. *Soft Mater.* **2019**, *15* (8), 1776-1784.
- (48) Perrino, AP; García, R. How soft is a single protein? The stress–strain curve of antibody pentamers with 5 pN and 50 pm resolutions. *Nanoescape* **2016**, *8* (17), 9151-9158.
- (49) Chiodini, S., Ruiz-Rincón, S., Garcia, P. D.et al.. Bottom Effect in Atomic Force Microscopy Nanomechanics. *Small* **2020** *16*(35), 2000269.
- (50) Tero, R. Substrate Effects on the Formation Process, Structure and Physicochemical Properties of Supported Lipid Bilayers. *Materiales* **2012**, *5* (12), 2658-2680.
- (51) Richter, RP; Brisson, A. Following the formation of supported lipid bilayers on mica: a study combining AFM, QCM-D, and ellipsometry. *Biophys. J.* **2005**, *88* (5), 3422-3433.
- (52) Johnson, SJ; Bayerl, TM; McDermott, DC; Adam, GW; Rennie, AR; Thomas, RK; Sackmann, E. Structure of an adsorbed dimyristoylphosphatidylcholine bilayer measured with specular reflection of neutrons. *Biophys. J.* **1991**, *59* (2), 289-294.
- (53) Müller, DJ; Engel, A. The height of biomolecules measured with the atomic force microscope depends on electrostatic interactions. *Biophys. J.* **1997**, *73* (3), 1633-1644.

- (54) Redondo-Morata, L .; Giannotti, MI; Sanz, F. Structural impact of cations on lipid bilayer models: nanomechanical properties by AFM-force spectroscopy. *Mol. Membr. Biol.* **2014**, *31* (1), 17-28.
- (55) Gavara, N. Combined strategies for optimal detection of the contact point in AFM force-indentation curves obtained on thin samples and adherent cells. *Scientific Reports.* **2016**, *6*, 21267-21280.
- (56) Voïtchovsky, K .; Antoranz Contera, S .; Kamihira, M .; Watts, A .; Ryan, J. Differential stiffness and lipid mobility in the leaflets of purple membranes *Biophys. J.* **2006**, *90* (6), 2075–2085.
- (57) Timoshenko, S. *Resistencia de Materiales. Parte 1. Teoría y Problemas Elementales.* Nueva York: Van Nostrand Reinhold.; **1980**.
- (58) Espinosa, G .; López-Montero, I .; Monroy, F .; Langevin, D. Shear rheology of lipid monolayers and insights on membrane fluidity. *Proceedings of the National Academy of the United States of America.* **2011**, *108* (15), 6008.

ANEXOS

Abreviaturas

AFM: microscopio de fuerzas atómicas

AM-AFM: AFM de amplitud modulada

FS-AFM: AFM de Espectroscopia de fuerzas

AMF: campo magnético alterno

Ac4ManNAz: N-azidoacetylmannosamine-tetraacetylated

DPPC: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina

CA: Ángulo de contacto

CO: Ciclooctino

COL: Colesterol

π -A: Presión superficial versus área por molécula

FEM: Método de elementos finitos

GSL: Glicoesfingolípido

LB: Langmuir-Blodgett

LS: Langmuir-Schaefer

MNP: nanopartícula magnética

PBS: Buffer fosfato salino

PEG: Polietilenglicol

PMAO: Poly (maleic anhydride-alt-1-octadecene)

QCM: Microbalanza de cuarzo.

SAR: tasa de absorción específica

SPAAC: Cicloadición azida-alquino promovida por tensión anular.

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS
PUBLICADOS

Reversible Monolayer–Bilayer Transition in Supported Phospholipid LB Films under the Presence of Water: Morphological and Nanomechanical Behavior

Silvia Ruiz-Rincón,^{†,‡} Alejandro González-Orive,^{†,‡} Jesús M. de la Fuente,^{*,§,||} and Pilar Cea^{*,†,‡,⊥}

[†]Instituto de Nanociencia de Aragón (INA) and [‡]Laboratorio de Microscopias Avanzadas (LMA), Campus Rio Ebro, Universidad de Zaragoza, C/Mariano Esquillor, s/n, 50018 Zaragoza, Spain

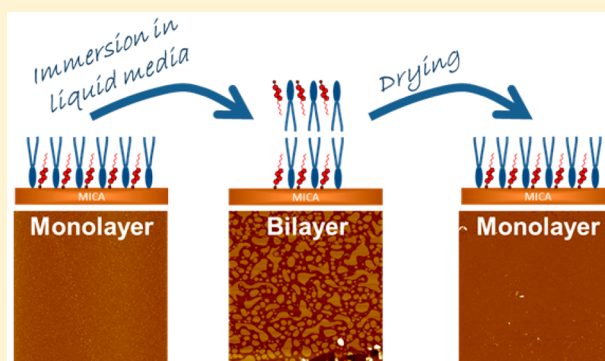
[§]Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón (ICMA), Universidad de Zaragoza-CSIC, 50009 Zaragoza, Spain

^{||}Networking Biomedical Research Center of Bioengineering, Biomaterials, and Nanomedicine (CIBER-BBN), Zaragoza, Spain

[⊥]Departamento de Química Física, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, 50009, Zaragoza, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: Mixed monolayer Langmuir–Blodgett (LB) films of 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) and cholesterol (Chol) in the 1:1 ratio have been prepared onto solid mica substrates. Upon immersion in water or in an aqueous HEPES solution (pH 7.4) the monolayer LB films were spontaneously converted into well-organized bilayers leaving free mica areas. The process has been demonstrated to be reversible upon removal of the aqueous solution, resulting in remarkably free of defects monolayers that are homogeneously distributed onto the mica. In addition, the nanomechanical properties exhibited by the as-formed bilayers have been determined by means of AFM breakthrough force studies. The bilayers formed by immersion of the monolayer in an aqueous media exhibit nanomechanical properties and stability under compression analogous to those of DPPC:Chol supported bilayers obtained by other methods previously described in the literature. Consequently, the hydration of a monolayer LB film has been revealed as an easy method to produce well-ordered bilayers that mimic the cell membrane and that could be used as model cell membranes.



INTRODUCTION

Biological membranes play an essential role in cellular processes (e.g., biosynthesis, detoxification, metabolism, signaling, sorting, cell–cell interactions, motility, pathogen attack, trafficking of lymphocytes, inflammatory response, etc.). Thus, cells are known to naturally perform their function under the effect of a complex combination of forces acting on the biomembrane.¹ Understanding the chemical composition and distribution of the membrane components as well as the forces acting between these membrane constituents is of vital importance to understand the mechanisms behind the above-mentioned processes. However, investigating the membrane *in vivo* is difficult since the membrane is a rather complex system.² In an attempt to obtain a better understanding of the structural organization, mechanical properties, and the functions of biomembranes,^{3–7} model cell membrane systems including liposomes and vesicles,^{8–10} insoluble Langmuir monolayers,^{11–14} and supported lipid bilayers^{5,15–18} have been widely studied, which has additionally been boosted by the emergence of a multitude of surface characterization techniques.^{19–22} Among these techniques, Atomic Force Microscopy (AFM)^{23–26} is of particular importance in this

field since AFM enables the study of the morphological structure, physical properties as adhesion, or biomolecular interactions. Also significant is the AFM-based Force Spectroscopy (AFM-FS),^{27,28} which allows to study the local properties of the mimic membranes in a quantitative way with the possibility of controlling the environmental conditions.

In this contribution, we have chosen a mixture of a phospholipid, namely, 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, or DPPC, and cholesterol in a 1:1 molar ratio. On the one hand, DPPC is a fundamental constituent of cell membranes, it represents the major component in lung surfactants and is often used as the main phospholipid to prepare liposomes for a wide range of applications, due to its neutral charge and inertness.²⁹ On the other hand, cholesterol (hence, forward abbreviated as Chol) plays an important role in the cell membrane³⁰ since it is an active component in the modulation of the fluidity of the cell membrane³¹ and in the phase transition of lipid bilayers;²⁷ Chol also increases the

Received: April 12, 2017

Revised: July 9, 2017

Published: July 10, 2017

structural order of phospholipid chains in the fluid-phase^{32,33} having an opposite effect on phospholipids in the gel phase;^{34–36} additionally, Chol regulates the mechanism that controls the membrane phospholipid asymmetry.³⁷ In this contribution, the DPPC/Chol 1:1 mixture has been assembled into a Langmuir film and subsequently transferred onto a mica solid support as a monolayer film. The advantage of a monolayer, particularly when compared to a bilayer, lies in its controllability. Thus, the monolayer packing and arrangement can be carefully manipulated, allowing the ability to define molecular density by varying the area per molecule by means of a Langmuir film balance. In contrast, the deposition of the second layer by the Langmuir–Blodgett (LB) or Langmuir–Schaefer (LS) techniques often results, particularly in DPPC films, in local collapses and inhomogeneities of the bilayer structure,³⁸ which makes it inappropriate for its use as a model cell membrane. It is also known that fully hydrated, supported lipid bilayers fabricated from phospholipid vesicles are stable; however, these systems are quickly destroyed upon exposure to air^{39–41} and several attempts have been made in order to tether the phospholipids onto the solid support such as the inclusion of short organic linkers^{42,43} or polymers.^{44–46} However, for certain applications, these procedures introduce an additional degree of uncertainty in the behavior of these systems compared to the cell membrane. Thus, the presence of linkers could have a significant effect on the lateral mobility of the constituent phospholipids in the mimic membrane.⁴⁷ In this paper, we report the reversible formation of a bilayer membrane by immersion of a monolayer LB film into an aqueous solution. The as-obtained bilayers are very homogeneous and their morphological and nanomechanical behavior is comprehensively studied in this contribution. Monolayers regenerated after drying the bilayers are remarkably free of defects and show the same surface density as the original monolayer. These systems could be used as model cell membranes to study the effect of viruses,⁴⁸ drugs,⁴⁹ nanoparticles,^{14,22} cytotoxicity,⁵⁰ and so on on the cell membrane.

■ EXPERIMENTAL SECTION

1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC, 99.9%), and cholesterol (Chol, 99.9%) were purchased from Sigma-Aldrich, and no further treatment was carried out. A KSV trough with dimensions 580 × 145 mm², which was housed in a constant temperature (20 ± 1 °C) clean room, was employed to prepare the Langmuir films and, subsequently, the Langmuir–Blodgett films. A Wilhelmy paper plate pressure sensor was used to measure the surface pressure (π) of the monolayers. The subphase was pure water (Millipore Milli-Q, resistivity 18.2 M Ω ·cm). 750 μ L of a 10^{−4} M DPPC/Chol 1:1 solution in chloroform (purchased from LAB-SCAN analytical sciences and used as received; purity HPLC grade >99%) were spread onto the aqueous surface by using a Hamilton microsyringe. The spreading solvent was allowed to completely evaporate over a period of at least 15 min before compression of the monolayer commenced at a constant sweeping speed of 1.93 × 10^{−2} nm²·molecule^{−1}·min^{−1}. Under these experimental conditions, the isotherms were highly reproducible. Langmuir films were transferred onto freshly cleaved mica substrates at a surface pressure of 35 mN·m^{−1} by withdrawing a freshly cleaved mica substrate from the aqueous subphase at a speed of 1 mm·min^{−1}. The chosen surface pressure of transference mimics the lateral pressure in biological membranes⁵¹ and is also in good agreement with previous literature on these types of films.^{52,53} Contact angle experiments were performed with a commercial optical tensiometer Theta Lite from Attension.

Atomic Force Microscopy (AFM) imaging was carried out by means of a Multimode 8 microscope equipped with a Nanoscope V

control unit from Bruker at a scan rate of 1.0–1.2 Hz, using Tapping and Peak-Force modes. AFM data were collected using RFESP (75–100 kHz and 1–5 N·m^{−1}, from Bruker) and ScanAsyst-Air-HR (130–160 kHz and 0.4–0.6 N·m^{−1}, from Bruker) tips for the images recorded in air. In the case of liquid measurements, SNL-C (40–75 kHz and 0.24 N·m^{−1}, from Bruker) and ScanAsyst-Fluid (100–200 kHz and 0.7 N·m^{−1}, from Bruker) tips were used. Images were typically recorded with scan rates of 1 Hz·line^{−1}, 512 lines, and force range of 0.2–2 nN. The time required to complete a 512 × 512-line AFM image is above 8 min. The immersion time when half the image was recorded was the one reported through the paper for the indicated immersion times. Differences in height for the as-prepared monolayer and bilayer domains were determined by performing section analysis. Images and force curves (F_z) carried out in liquid environment, that is, in a 10 mM HEPES solution or in water, were acquired using V-shaped Si₃N₄ cantilevers with a nominal spring constant of 0.24 and 0.58 N·m^{−1} and a tip radius in the 8–20 nm range. Individual spring constants were calibrated using the equipartition theorem, thermal noise procedure,⁵⁴ while the tip radii were determined by deconvoluting the tip shape after scanning a titanium roughness standard (Bruker)⁵⁵ using Nanoscope Analysis Software. In all the experiments, the piezoelectric was extended and retracted along the *z*-axis at a rate of 0.5 μ m·s^{−1}. These AFM measurements were conducted in the 20–22 °C temperature range, which is below the main phase transition temperature, that is, melting temperature (T_m), reported for DPPC pure monolayers (48–51 °C)⁵⁶ and bilayers (first transition at 44–52 °C and second transition at 52–59 °C),⁵⁷ as well as for a DPPC/Chol 1:1 bilayer (42–45 °C).^{27,58} After immersion of the LB films either in HEPES 10 mM or in Milli-Q water for 60 min, the samples were allowed to dry in air overnight and subsequently measured to study the reformation of the monolayer. F_z curves were carried out at different locations on the DPPC/Chol 1:1 domains in order to avoid the influence of plastic deformations. Likewise, different measurements with distinct cantilever-DPPC/Chol 1:1 surface combinations were carried out to assess the reproducibility of the as-obtained data. More than 150 F_z curves were recorded for each immersion time in a 10 mM HEPES solution. Bearing and depth statistical analysis was carried out by means of Nanoscope off-line v. 1.40 and Gwyddion v. 2.41 package softwares. AFM images were reduced to binary images by thresholding with the depth value corresponding to the highest point of the peaks detected in the depth histograms. Thus, the bearing analysis tool allows obtaining the percentage of projected area occupied by features exhibiting depth values smaller than or equal to the threshold one.^{59,60}

■ RESULTS AND DISCUSSION

DPPC/Chol 1:1 monolayer LB films were transferred at 35 mN·m^{−1} by withdrawing a mica substrate, which was initially immersed in the water subphase. As a result, tightly packed, highly homogeneous, free of pores or holes as well as free of three-dimensional defects monolayers were obtained. Our results are in excellent agreement with previous observations on Langmuir and Langmuir–Blodgett films of DPPC and Chol.⁵² Further details about the Langmuir isotherms and characterization of the LB films of DPPC/Chol 1:1 as prepared in this work can be found in the [Supporting Information \(SI\)](#).

Figure 1a1 shows a representative AFM image of a DPPC/Chol 1:1 monolayer LB film onto a mica substrate that exhibits a homogeneous surface. The thickness of the monolayer was determined by scratching the film (Figure 1a2) with the AFM tip applying a force of 100 nN.⁶¹ According to the obtained results, the monolayer exhibits a thickness of (2.4 ± 0.1) nm (Figure 1a3), which is in very good agreement with the formation of a monolayer, as reported elsewhere,⁶² as well as with theoretical molecular models (Spartan 08 V1.0.0 indicates a length of 2.8 nm for DPPC) assuming a tilt angle of the DPPC molecules of 30° from the surface normal.⁶³ In addition,

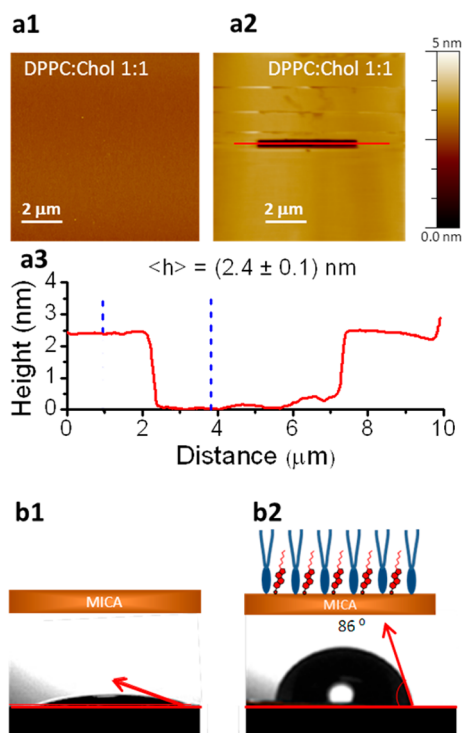


Figure 1. (a1) AFM image of a DPPC/Chol 1:1 monolayer LB film transferred onto a mica substrate at a surface pressure of $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. (a2) AFM image in which the monolayer was scratched with the AFM tip to determine the monolayer thickness. The height scale on the right of a2 also applies to a1. (a3) Section profile exhibiting a monolayer thickness of $(2.4 \pm 0.1) \text{ nm}$. (b1) Contact angle of a drop of water onto a bare mica substrate and (b2) contact angle of a drop of water onto a DPPC/Chol 1:1 monolayer LB film; the cartoon shows the orientation of the polar groups of DPPC (blue) and Chol (red) toward the mica surface and the alkyl chains toward the air (adapted with permission from ref 52. Copyright 2013 ACS).

the contact angle of a drop of water onto a mica substrate is lower than 10° , while the contact angle of a drop of water onto a monolayer LB film of DPPC/Chol 1:1 deposited onto a mica substrate is around 86° (Figure 1b2). This result is indicative of a much less hydrophilic surface that results from the formation of a monolayer in which the hydrophilic parts of the phospholipid and cholesterol are in contact with the mica substrate and the hydrophobic chains are oriented toward the air, as shown in Figure 1b2. It is also worth mentioning that DPPC/Chol 1:1 films exhibit a high degree of order in the alkyl chains with a *trans*-zigzag conformation, as confirmed by FTIR experiments (see SI).

The stability and integrity of the monolayer LB film in an aqueous media was studied after its exposure to a liquid environment. The study was performed both in pure water and in a 10 mM HEPES buffer solution, whose pH (7.4, adjusted with NaOH) and low ionic strength mimic the physiological conditions in a cell membrane. In both cases it was observed that the molecules in the tightly packed monolayer undergo a self-assembly process to turn into a bilayer. Intermediate organization levels were observed depending on the immersion time in the liquid media. The results shown in the following paragraphs refer to the HEPES buffer, although they are analogous to those recorded in water.

The temporal sequence of AFM images for the DPPC/Chol monolayer immersed in a HEPES buffer solution is shown in

Figure 2, where noticeable structural changes can be observed and are more clearly detectable in the cross section profiles of the sample. The different heights of the domains visible in the AFM images (Figure 2) are in good agreement with a transition from an initial monolayer, to the formation of a partial bilayer (from an initial lying-down to an incomplete arising vertical arrangement of the molecules in the upper layer), and finally a complete bilayer, as shown in the bottom scheme in Figure 2. In fact, the cross-section profile for an immersion time of 60 min accounts for the thickness of well-defined bilayer domains surrounded by regions of bare mica. These results can be interpreted as follows: in the DPPC/Chol 1:1 monolayer the hydrophobic alkyl chains are pointing upward in contact with air, while the zwitterionic headgroups are oriented toward the negatively charged mica surface, Figure 1b2. When this monolayer is immersed into an aqueous media, the hydrophobic tails will tend to avoid contact with the aqueous environment by forming bilayer islands, creating thus an inner hydrophobic core. A similar behavior was reported by Schwarz et al.⁶⁴ who observed that when a pure DPPC monolayer on mica was in contact with pure Milli-Q water, a phospholipid bilayer was formed. Interestingly, this phenomenon was not observed when the monolayer was scanned in *n*-decane. These observations further confirm that the instability generated at the aqueous solution–hydrophobic tails interface results in a driving force for the restructuring of the monolayer into a bilayer.

The depth histograms obtained for DPPC/Chol 1:1 LB film onto a mica substrate at different immersion times are shown in Figure 3 to account for the height difference occurred during the spontaneous transition from the monolayer to the bilayer. By the very beginning of the experiment (black line in the histogram) no significant changes in the morphology and thickness of the film can be observed. Therefore, the height value distribution for very short immersion times mainly reflects the surface roughness of the highly homogeneous monolayer. In contrast, the depth histogram for the immersion time of 20 min (red graph in Figure 3) exhibits a large dispersion of height data. This can be explained in terms of the simultaneous concurrence of (i) bare mica areas; (ii) monolayer regions; (iii) bilayer patches exhibiting a nearly lying down configuration; (iv) and even the first steps of the transition from a nearly lying down to a progressively increasing standing up configuration in the arising upper leaflet. Additionally, molecules located at the border of the larger bilayer domains, and especially those taking part of smaller islands, exhibit a differential molecule average coordination number in comparison to those present in the core of the membrane and also show more rounded geometric features with the aim to expose their polar head-groups to the aqueous solution.⁶⁵ The combination of these multiple scenarios results in a large dispersion of depth values as observed in Figure 3. On the other hand, the DPPC/Chol domain coverage after 20 min of immersion into the aqueous media renders an approximate 54% of the projected area (assessed by bearing analysis of representative AFM images, Figure S3 in the SI). The depth histogram corresponding to an immersion time of 45 min clearly shows a maximum at 4.9 associated with an incomplete lying-down molecule arrangement above the underlying monolayer, which corresponds to the approximate 24% of the projected area, as deduced from the bearing analysis depicted in Figure S4 in the SI.^{59,60} The depth histogram for an immersion time of 45 min also shows a maximum at 5.4 nm that

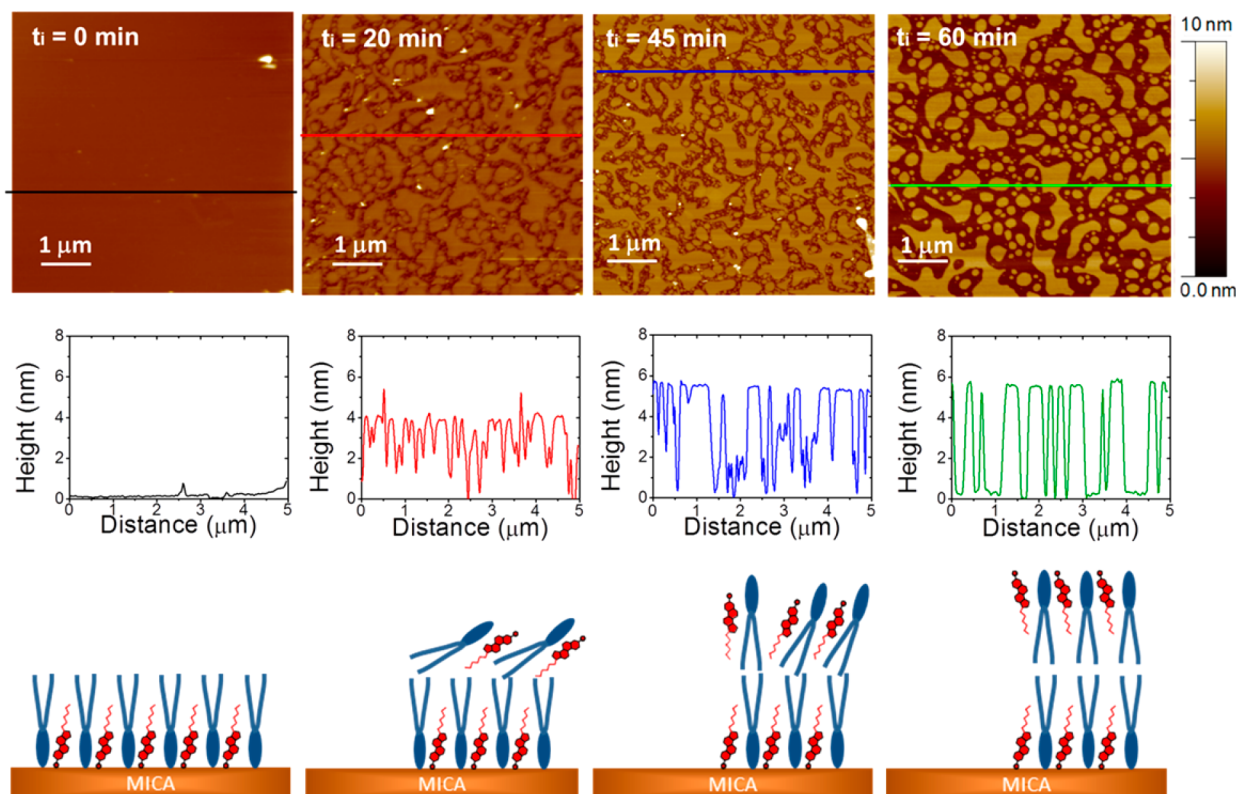


Figure 2. AFM $5.0 \times 5.0 \mu\text{m}^2$ images and below their representative cross section analysis for a DPPC/Chol 1:1 monolayer immersed in $50 \mu\text{L}$ of a 10 mM HEPES solution (pH 7.4) showing the transition from a monolayer to a bilayer upon the indicated immersion times. The bottom scheme exhibits, from left to right, a model for the transition from a monolayer to a bilayer. The scheme also includes intermediate steps in which the upper layer shows a lying down configuration of the molecules at low immersion times (e.g., $t_i = 20$ min) followed by a gradual tilt of the molecules in the upper layer upon increasing immersion times (e.g., $t_i = 45$ min) until an arising vertical assembly of the upper layer is achieved ($t_i = 60$ min).

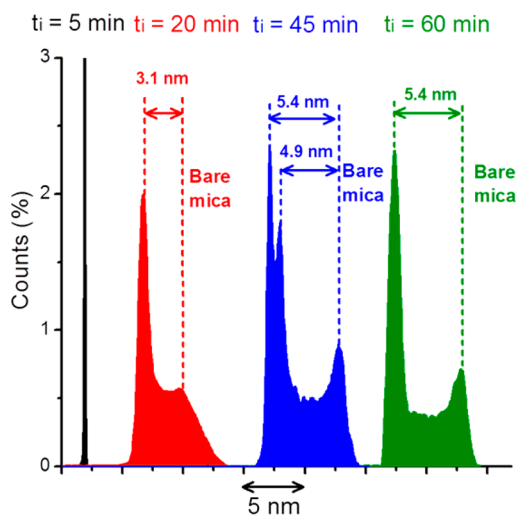


Figure 3. Depth histograms showing the distribution of height values in a DPPC/Chol 1:1 monolayer in a 10 mM HEPES solution for the indicated incubation times. These histograms were obtained from the $5.0 \times 5.0 \mu\text{m}^2$ AFM images depicted in Figure 2 (the depth histograms have been shifted in the x -axis for clarifying purposes). The average heights for each case, $\langle h \rangle$, measured vs the depth value corresponding to the unveiled bare mica, marked with dashed lines, are also indicated in the inset labels.

corresponds to an arising vertical assembly of the upper layer (ca. 25% of the projected area, Figure S4 in the SI), respectively. The area percentage of the bilayer domains

registered for the DPPC/Chol 1:1 LB film for 45 min is very close to 50% (Figure S4 in the SI). After longer exposure times to the HEPES solution, namely, 60 min, the height of a complete bilayer is observed, with a maximum in the depth histogram at 5.4 nm (Figure 3). The percentage of surface area registered for the DPPC/Chol 1:1 LB film is about 47% for an incubation time of 60 min, after which no further changes are observed (Figure S5 in the SI). These results indicate that as the immersion time increases, the amount of DPPC/Chol molecules which incorporates to the arising upper leaflet grows continually until a bilayer is formed, maximizing thus the alkyl-alkyl chain van der Waals interactions and evolving progressively from a nearly lying-down, higher tilt angles, and lower heights, to a tightly packed standing-up arrangement, lower tilt angles and higher heights. The monolayer to bilayer transition is schematized in Figure 2 (bottom cartoon). Such a reorganization mechanism, in which the alkyl chains interactions between neighbor molecules are maximized, is well-known to occur for instance in self-assembled monolayers of thiol derivatives,⁶⁶ and also in biomaterials that tend to form mono and bilayer fibrous aggregates.^{67,68} A similar effect, that is, formation of a phospholipid monolayer from a supported lipid bilayer, has already been reported for different combinations of lipids and substrates.^{69–73} In general, this phenomenon has been mainly attributed to the known instability exhibited by supported phospholipid bilayers exposed at the air interface, since air is expected to be more hydrophobic than aqueous solutions. This instability originates when the air reaches the bilayer giving rise to a disorganization

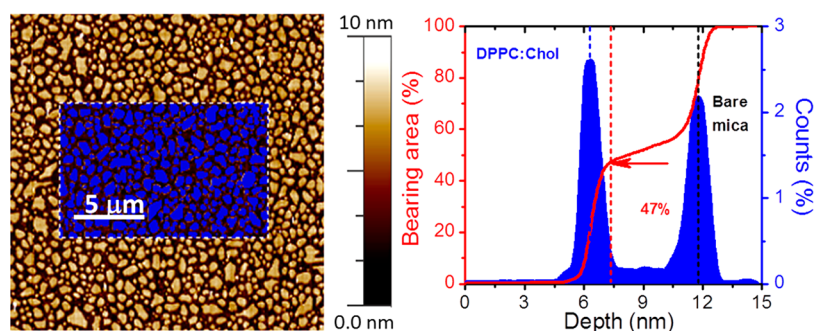


Figure 4. Left: $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ AFM image of a monolayer LB film of DPPC/Chol 1:1 after immersion for 60 min in a 10 mM HEPES solution with the mask in blue unveiling molecule-free mica areas (once the depth threshold corresponding to the height of the lipid bilayer was selected, all the events/pixels in the image with lower heights than the one selected, that is, bare mica, are not masked and, consequently, unveiled). Right: depth histogram showing the distribution of height data at different depths referred to a reference point, i.e., the highest pixel. The red line (bearing analysis) indicates the relative projected area covered at each depth value depicted as a blue mask in the topographic image corresponding to the white-dashed boxed area in the AFM image. The peak in the histogram marked with a black-dashed vertical line is attributed to the unveiled bare mica substrate while the red arrow accounts for the selected height threshold corresponding to the average height of the measured bilayer domains.

of the bilayer structure.⁷⁰ Accordingly, an unstable hydrophilic–hydrophobic interface is created as a consequence of the contact between the zwitterionic phospholipid head-groups and the air. Indeed, it is quite challenging to obtain stable supported phospholipid bilayers in air. Recently, Gomila and co-workers^{42,81} have succeeded in preparing air-stable dioleoylphosphatidylcholine (DOPC)/Chol bilayers by using the spin coating technique. Upon the slow evaporation of the solvent at room temperature, the inner leaflet in the DPPC/Chol bilayer is supposed to remain bound to the underlying mica surface while the DPPC and Chol molecules present in the upper leaflet progressively start to fulfill the surrounding bare mica areas bringing about an upside-down DPPC/Chol monolayer.

Additionally, the topographic features of bilayers formed from the immersion of monolayer LB films in an aqueous solution (depicted in Figure 2) extend monotonously to the whole sample, with the rare occurrence of multilayered domains or large naked mica areas. In addition, the bilayer domains are regularly distributed all over the substrate, exhibiting a significant low density of defects and pinholes (Figure 4). Consequently, the as-prepared DPPC/Chol 1:1 modified mica surfaces account for the direct patterning at molecule length scale of hydrophilic surfaces with micrometer-sized supported lipid/cholesterol bilayers in aqueous phases. In this regard, recent reviews^{69,74} have extensively addressed both the formation and characterization of patterned supported lipid monolayers/bilayers as well as temporal membrane substructures, which may contribute to understand complex molecular sorting processes and to localize selected membrane functions of interest in biomedical applications.

Adhesion images recorded by means of an AFM illustrate the adhesion effect caused by the interaction between the AFM tip and the sample.^{28,75} In the monolayer LB films of DPPC/Chol 1:1 as prepared in this work, the tip is expected to interact with the hydrophobic chains of the DPPC and cholesterol. In contrast, in bilayers the tip is thought to interact with the hydrophilic section of the DPPC and Chol. Thus, since the tip–sample interaction has a different nature depending on whether the tip contacts a monolayer, an incomplete upper layer or a bilayer, a differential adhesion mapping associated with the topographic image is expected. This phenomenon is illustrated in the histograms shown in Figure 5, where the distribution of the corresponding adhesion values can be

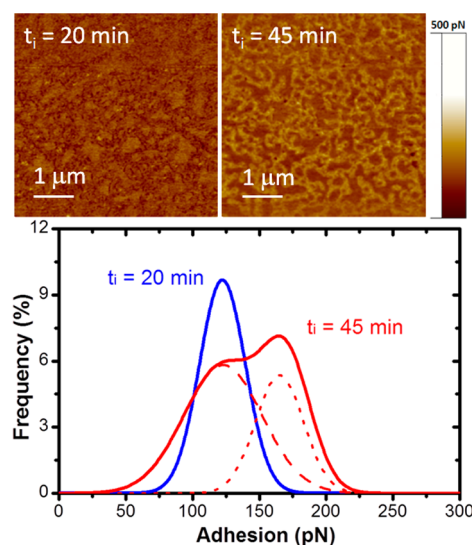


Figure 5. AFM $5.0 \times 5.0 \mu\text{m}^2$ adhesion images of a DPPC/Chol 1:1 in $50 \mu\text{L}$ of 10 mM HEPES solution (pH 7.4) for the indicated immersion times: $t_i = 20$ min and $t_i = 45$ min. The adhesion histograms exhibit a Gaussian distribution corresponding mainly to the monolayer (blue line) and a bimodal distribution in the case of the bilayer (red line). The latter can be deconvoluted in two different contributions at 122 (dashed line) and 166 pN (dotted line).

observed.^{75,76} Thus, the blue histogram is attributable to both the monolayer and to an incomplete lying-down phospholipid arrangement above the monolayer. This histogram reveals a Gaussian distribution with a maximum value at 122 pN. In contrast, the red histogram is mostly attributable to a bilayer exhibiting a bimodal distribution with two maxima located at 122 and 166 pN, which correspond to the contributions of the remaining monolayer/incomplete upper layer zones (dashed deconvoluted line) and the bilayer regions (dotted deconvoluted line), respectively.

An identical study of the above-depicted experiments was performed in Milli-Q water, obtaining exactly the same results. In order to determine the reversibility of the monolayer–bilayer formation upon the elimination of the aqueous media, experiments were performed both in a 10 mM HEPES solution, Figure S6 in the SI, and in pure Milli-Q water concluding the reversibility of the process in both cases. However, the presence

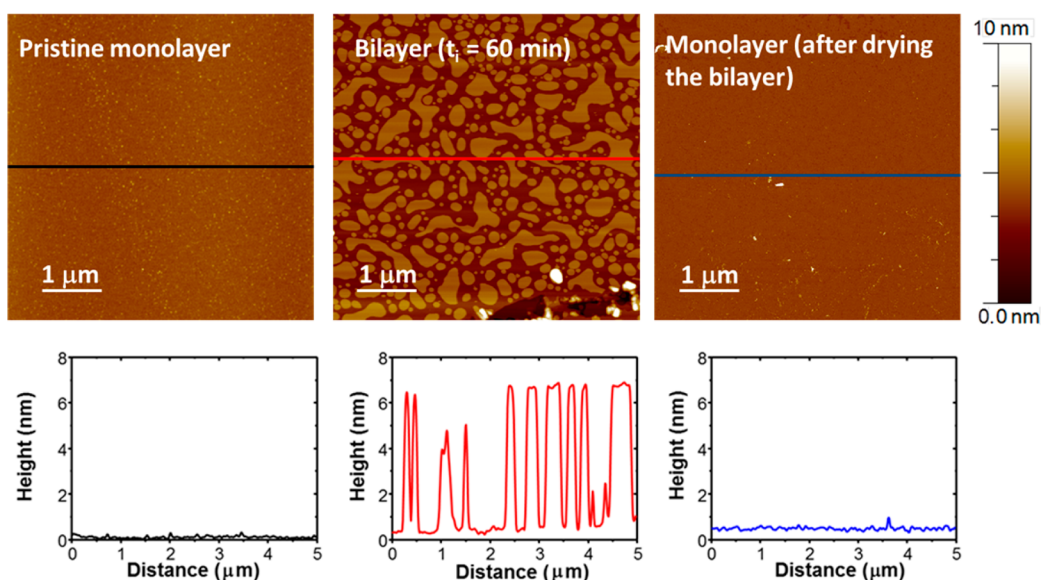


Figure 6. AFM topographic images corresponding to a pristine DPPC/Chol 1:1 monolayer LB film; the bilayer formed after 60 min of immersion of the monolayer into pure water; and regeneration of a monolayer after water was dried from the bilayer. Additionally, the cross-section figures are included.

of remaining salt crystals caused by the evaporation of the buffer HEPES generally does not result in clean AFM topographic images. Thus, for clarity reasons, Figure 6 shows the AFM image of a monolayer recorded after the evaporation of Milli-Q water at room temperature and it is compared with that of a pristine monolayer and a bilayer. As described above, after immersion of the monolayer LB film in water, the reassembly of the initial monolayer into bilayer domains occurs, which also results in uncovered mica areas. Interestingly, the average height registered for the bilayer domains in Milli-Q water rises to 6 nm, i.e. slightly higher than that obtained by immersion in a 10 mM HEPES solution, namely 5.4 nm (Figures 2 and 3). This effect has already been observed by Garcia-Manyes et al.^{77,78} for pure lipid bilayers and also studied by Monte Carlo simulations.⁷⁹ These experimental and theoretical studies concluded that the presence of salts and also an increase in the ionic strength result in lower repulsive electrostatic interactions (and cation bridging) between the zwitterionic polar heads of the phospholipid as well as enhanced van der Waals interactions between hydrophobic chains. As a consequence these two effects result in a tighter packing of the phospholipid molecules which may be also related to a thinning of the bilayer.⁸⁰ Most importantly, after the drying process of the bilayer, the initial characteristic topographic features corresponding to the monolayer are restored. Monolayers resulting from the drying process of bilayers immersed in pure water are remarkably free of defects and cover the whole mica substrate exhibiting the same surface density as the pristine monolayer. The RMS (root-mean-square) roughness value for the pristine monolayer (0.07 ± 0.01 nm) and the RMS roughness value for the restored monolayer from Milli-Q water (0.12 ± 0.02 nm) are similar and only a slight increase in the film roughness is observed after the restoration of the monolayer. In contrast to the homogeneous surface observed for the restored monolayer from Milli-Q water (Figure 6), the reformed monolayer obtained after immersion in HEPES 10 mM exhibits remaining salt crystals and some additional defects and pinholes as can be observed in Figure S6. These defects would correspond to limits between DPPC/Chol

domains, previously dissolved and then precipitated phospholipid molecules, buffer impurities, and maybe, to scarcely locally distributed phase segregation patches. The RMS roughness of the monolayers restored from HEPES is also higher (0.21 ± 0.04 nm, excluding remaining salt crystals from the RMS analysis) than that observed from monolayers restored from pure Milli-Q water.

The nanomechanical properties exhibited by the initial monolayers and the as-formed bilayers in physiological conditions have been determined by means of AFM breakthrough force, which has been used before^{41,57,58} to characterize the mechanical response of phospholipid membranes under compression. Briefly, the breakthrough force (F_b) accounts for the maximum force value that these membranes are capable to resist before being ruptured by the AFM tip. Consequently, F_b has been widely associated with the magnitude of the lateral interaction force arising between neighboring molecules, that is, van der Waals interactions between alkyl chains as well as cation and water molecule-binding zwitterionic head-groups interactions. This AFM-FS approach, aimed at quantifying the elastic/plastic properties exhibited by biomimetic phospholipid monolayers and bilayers, was primarily stated by Schneider et al.⁸¹ Later, AFM-FS was extensively explored by Garcia-Manyes et al.⁵⁷ and Asakawa and Fukuma⁸² as a representative fingerprint of the mechanical resistance and stability shown by phospholipid membranes. The F_b values are noticeably dependent on pH, temperature, ionic strength, cation nature, and membrane composition. In particular, it has been reported that increasing contents of cholesterol molecules in phospholipid-based membranes are translated into higher F_b , both in the ordered gel/liquid and in the disordered liquid phases.^{27,58} In this regard, significant contributions addressing the characteristic features exhibited by AFM force–distance curves registered for supported phospholipid-based bilayers under different experimental conditions have been published previously.^{78,83} Force-curve graphs versus the piezoelectric displacement for DPPC/Chol 1:1 LB films were performed at increasing times of immersion for which the bilayer is partially or totally formed. These results are illustrated in Figure 7. In

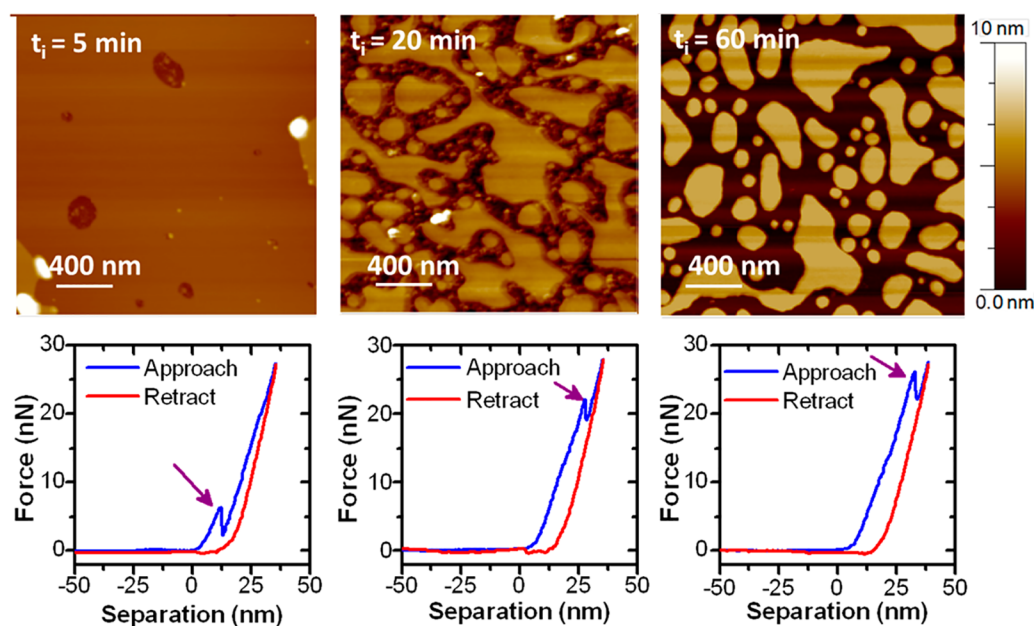


Figure 7. Top: $2.0 \times 2.0 \mu\text{m}^2$ AFM images corresponding to a DPPC/Chol 1:1 LB film for the indicated immersion times in $50 \mu\text{L}$ of 10 mM HEPES (pH 7.4) at different immersion times. Bottom: representative loading force vs separation curves for the films as indicated in the AFM images above. Purple arrows indicate the detected F_b at every immersion time.

this figure it can be seen that the cantilever tip approaches the bilayer up to set a maximum loading force (blue line). Subsequently, the piezoelectric is retracted (red line). The lipid layers are elastically deformed by the AFM probe until its sharp conical tip ruptures dramatically the lipid layer getting into contact with the underlying rigid mica substrate. This is translated into a significant jump in the repulsive force-curve slope, that is, the aforementioned breakthrough force, which resembles unambiguously the onset of the plastic regime.⁵⁷ Additionally, the width of this jump in the corrected loading force-indentation (δ) curves resembles the thickness of the layer.^{77,81,84} For immersion times below 5 min, the jump (purple arrow in Figure 7) observed in the force curve graph illustrates the penetration through the mixed monolayer. In contrast, for immersion times above 5 min, the resulting force curves exhibit a discontinuous jump at higher loading forces, which can be attributed to the successive rupture of the upper leaflet and the subsequent underlying monolayer. F_b values result in higher figures as immersion time increases as a consequence of the progressive self-assembly of the phospholipid and cholesterol molecules in a more dense and compact arrangement in the upper layer. Accordingly, the registered increase in the F_b values accounts for a significant rise in the strength of the lateral forces existing between adjacent molecules. This fact is unambiguously a consequence of the gradual incorporation of a growing amount of DPPC and Chol molecules to the arising upper leaflet. In turn, this effect results in a progressively denser and more tightly packed structure in the bilayer patches as immersion time is increased. Then, the loading force required to indent the bilayer patches is higher for larger immersion times up to a certain threshold corresponding to the completed transition from monolayer to bilayer. Representative loading force-piezoelectric displacement curves for different immersion times are depicted in Figure S7 in the SI. The assessment of the nanomechanical properties exhibited by the DPPC/Chol monolayer before and after being exposed to aqueous solutions are currently ongoing with the aim to

unveil possible differences in its elastic behavior related to different levels of molecule packing density.

These results are summarized in Figure 8 and Table I, and are in very good agreement with those previously reported

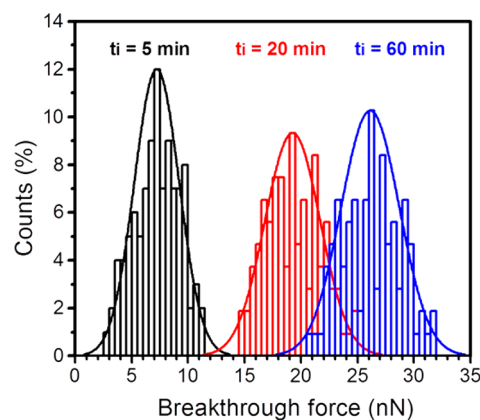


Figure 8. Histograms showing the breakthrough force (F_b) value distribution for $t = 5$ min (black line), $t = 20$ min (red), and $t = 60$ min (blue). Gaussian fits of the data provide an average F_b of 7.2 ± 1.9 nN for $t = 5$ min, 19.3 ± 2.4 nN for $t = 20$ min, and 26.1 ± 2.6 nN for $t = 60$ min.

Table I. Mean Breakthrough Force for a DPPC/Chol 1:1 LB Film on Mica at the Indicated Immersion Times in a HEPES Buffer Solution

immersion time of a DPPC/Chol 1:1 LB film in HEPES solution	breakthrough force (nN)
$t_i = 5$ min	7.2 ± 1.9
$t_i = 20$ min	19.3 ± 2.4
$t_i = 60$ min	26.1 ± 2.6

elsewhere by Sanz and co-workers^{27,58} and also by Asakawa and Fukuma.⁸² Therefore, it can be concluded that for long

immersion times, the DPPC/Chol bilayer domains formed in a 10 mM HEPES buffer solution (pH 7.4) from the monolayer exhibit nanomechanical properties and stability under compression, which are analogue to those of DPPC/Chol supported bilayers obtained by other different fabrication methods.^{27,57,58,82}

CONCLUSIONS

This paper reports the spontaneous arrangement of a monolayer Langmuir–Blodgett film when it is immersed into an aqueous media to form bilayer-domain structures leaving free mica areas in between. In addition, it has been demonstrated that this process is fully reversible after drying the film resulting in the observation of well-ordered monolayers. This reversible interfacial phenomenon, which involves the formation of ordered bilayers from monolayers could be used in model cell membranes, with these observations providing a framework for understanding the stability and predominant forces in immobilized mono and bilayer model cell membranes. In addition, hydration of well-ordered monolayer LB films has been revealed as an easy method to produce also well-ordered bilayers, free of three-dimensional defects, that mimic the cell membrane and that could be used as model cell membranes to study the interaction of the membrane with drugs, nanoparticles, and so on. Further investigations of the reported monolayer transition are being carried out in our laboratories using buffer solutions containing several important ions in biological systems as well as employing other major phospholipids in biological membranes.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b01268.

Additional information and supporting figures (PDF).

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: jmfuente@unizar.es.

*E-mail: pilarcea@unizar.es.

ORCID

Pilar Cea: 0000-0002-4729-9578

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support from DGA/Fondos Feder (construyendo Europa desde Aragón) is acknowledged by research group PLATON (E-54) and NAP (E-93).

REFERENCES

- (1) Vogel, V.; Sheetz, M. Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 265–275.
- (2) Kucik, D. F.; Elson, E. L.; Sheetz, M. P. Weak dependence of mobility of membrane protein aggregates on aggregate size supports a viscous model of retardation of diffusion. *Biophys. J.* **1999**, *76*, 314–322.

- (3) Tanaka, M.; Sackmann, E. Polymer-supported membranes as models of the cell surface. *Nature* **2005**, *437*, 656–663.

- (4) Castellana, E. T.; Cremer, P. S. Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design. *Surf. Sci. Rep.* **2006**, *61*, 429–444.

- (5) Martin, D. *Nanobiotechnology of Biomimetic Membranes*; Springer Science & Business Media, 2007.

- (6) Peetla, C.; Stine, A.; Labhasetwar, V. Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery. *Mol. Pharmaceutics* **2009**, *6*, 1264–1276.

- (7) Pomorski, T. G.; Nylander, T.; Cárdenas, M. Model cell membranes: Discerning lipid and protein contributions in shaping the cell. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2014**, *205*, 207–220.

- (8) Sessa, G.; Weissmann, G. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *J. Lipid Res.* **1968**, *9*, 310–318.

- (9) Rodriguez, N.; Heuvingh, J.; Pincet, F.; Cribier, S. Indirect evidence of submicroscopic pores in giant unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2005**, *1724*, 281–287.

- (10) Okumura, Y.; Zhang, H.; Sugiyama, T.; Iwata, Y. Electroformation of giant vesicles on a non-electroconductive substrate. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1490–1491.

- (11) Keller, S. L. Miscibility transitions and lateral compressibility in liquid phases of lipid monolayers. *Langmuir* **2003**, *19*, 1451–1456.

- (12) Brezesinski, G.; Möhwald, H. Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2003**, *100–102*, 563–584.

- (13) Fernández-Botello, A.; Comelles, F.; Alsina, M. A.; Cea, P.; Reig, F. A monolayer study on interactions of docetaxel with model lipid membranes. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 13834–13841.

- (14) Girón, J. V. M.; Vico, R. V.; Maggio, B.; Zelaya, E.; Rubert, A.; Benítez, G.; Carro, P.; Salvarezza, R. C.; Vela, M. E. Role of the capping agent in the interaction of hydrophilic Ag nanoparticles with DMPC as a model biomembrane. *Environ. Sci.: Nano* **2016**, *3*, 462–472.

- (15) Sackmann, E. Supported membranes: scientific and practical applications. *Science* **1996**, *271*, 43–48.

- (16) Aoki, P. H. B.; Alessio, P.; Rodríguez-Méndez, M. L.; De Saja Saez, J. A.; Constantino, C. J. L. Taking advantage of electrostatic interactions to grow Langmuir–Blodgett films containing multilayers of the phospholipid dipalmitoylphosphatidylglycerol. *Langmuir* **2009**, *25*, 13062–13070.

- (17) Lipkowski, J. Building biomimetic membrane at a gold electrode surface. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 13874–13887.

- (18) Lima, L. M. C.; Giannotti, M. I.; Redondo-Morata, L.; Vale, M. L. C.; Marques, E. F.; Sanz, F. Morphological and nanomechanical behavior of supported lipid bilayers on addition of cationic surfactants. *Langmuir* **2013**, *29*, 9352–9361.

- (19) Livanec, P. W.; Dunn, R. C. Single-molecule probes of lipid membrane structure. *Langmuir* **2008**, *24*, 14066–14073.

- (20) El Kirat, K.; Morandat, S.; Dufrene, Y. F. Nanoscale analysis of supported lipid bilayers using atomic force microscopy. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2010**, *1798*, 750–765.

- (21) Jiang, Y.-W.; Guo, H.-Y.; Chen, Z.; Yu, Z.-W.; Wang, Z.; Wu, F.-G. In situ visualization of lipid raft domains by fluorescent glycol chitosan derivatives. *Langmuir* **2016**, *32*, 6739–6745.

- (22) Yousefi, N.; Wargenau, A.; Tufenkji, N. Toward more free-floating model cell membranes: method, development and application to their interaction with nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 14339–14348.

- (23) Scheuring, S.; Dufrene, Y. F. Atomic force microscopy: probing the spatial organization, interactions and elasticity of microbial cell envelopes at molecular resolution. *Mol. Microbiol.* **2010**, *75*, 1327–1336.

- (24) Ginzburg, V. V.; Balijepalli, S. Modeling the Thermodynamics of the Interaction of Nanoparticles with Cell Membranes. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3716–3722.

- (25) Verma, A.; Stellacci, F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small* **2010**, *6*, 12–21.

- (26) Berquand, A.; Mingeot-Leclercq, M.-P.; Dufrière, Y. F. Real-time imaging of drug-membrane interactions by atomic force microscopy. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2004**, *1664*, 198–205.
- (27) Redondo-Morata, L.; Giannotti, M. I.; Sanz, F. Influence of cholesterol on the phase transition of lipid bilayers: a temperature-controlled force spectroscopy study. *Langmuir* **2012**, *28*, 12851–12860.
- (28) Dufrière, Y. F.; Martínez-Martín, D.; Medalsy, I.; Alsteens, D.; Müller, D. J. Multiparametric imaging of biological systems by force-distance curve-based AFM. *Nat. Methods* **2013**, *10*, 847–854.
- (29) Toimil, P.; Prieto, G.; Miñones, J., Jr.; Sarmiento, F. A comparative study of F-DPPC/DPPC mixed monolayers. Influence of subphase temperature on F-DPPC and DPPC monolayers. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 13323–13332.
- (30) Krause, M. R.; Regen, S. L. The structural role of cholesterol in cell membranes: from condensed bilayers to lipid rafts. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 3512–3521.
- (31) Kim, K.; Kim, C.; Byun, Y. Preparation of a dipalmitoylphosphatidylcholine/cholesterol Langmuir–Blodgett monolayer that suppresses protein adsorption. *Langmuir* **2001**, *17*, 5066–5070.
- (32) Vist, M. R.; Davis, J. H. Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: deuterium nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry. *Biochemistry* **1990**, *29*, 451–464.
- (33) Miyoshi, T.; Kato, S. Detailed analysis of the surface area and elasticity in the saturated 1,2-Diacylphosphatidylcholine/Cholesterol binary monolayer system. *Langmuir* **2015**, *31*, 9086–9096.
- (34) Hung, W.-C.; Lee, M.-T.; Chen, F.-Y.; Huang, H. W. The condensing effect of cholesterol in lipid bilayers. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 3960–3967.
- (35) Róg, T.; Pasenkiewicz-Gierula, M.; Vattulainen, I.; Karttunen, M. Ordering effects of cholesterol and its analogues. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2009**, *1788*, 97–121.
- (36) Reis, O.; Winter, R.; Zerda, T. W. The effect of high external pressure on DPPC-cholesterol multilamellar vesicles: a pressure-tuning Fourier transform infrared spectroscopy study. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1996**, *1279*, 5–16.
- (37) Arashiki, N.; Saito, M.; Koshino, I.; Kamata, K.; Hale, J.; Mohandas, N.; Manno, S.; Takakuwa, Y. An unrecognized function of cholesterol: regulating the mechanism controlling membrane phospholipid asymmetry. *Biochemistry* **2016**, *55*, 3504–3513.
- (38) Lee, Y.-L.; Lin, J.-Y.; Chang, C.-H. Thermodynamic characteristics and Langmuir–Blodgett deposition behavior of mixed DPPA/DPPC monolayers at air/liquid interfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *296*, 647–654.
- (39) Cremer, P. S.; Boxer, S. G. Formation and spreading of lipid bilayers on planar glass supports. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 2554–2559.
- (40) Holden, M. A.; Jung, S.-Y.; Yang, T.; Castellana, E. T.; Cremer, P. S. Creating fluid air-stable solid supported lipid bilayers. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6512–6513.
- (41) Dols-Perez, A.; Fumagalli, L.; Simonsen, A. C.; Gomila, G. Ultrathin spin-coated dioleoylphosphatidylcholine lipid layers in dry conditions: a combined atomic force microscopy and nanomechanical study. *Langmuir* **2011**, *27*, 13165–13172.
- (42) Krysiński, P.; Żebrowska, A.; Michota, A.; Bukowska, J.; Becucci, L.; Moncelli, M. R. Tethered mono- and bilayer lipid membranes on Au and Hg. *Langmuir* **2001**, *17*, 3852–3857.
- (43) Schiller, S. M.; Naumann, R.; Lovejoy, K.; Kunz, H.; Knoll, W. Archaea analogue thiolipids for tethered bilayer lipid membranes on ultrasmooth gold surfaces. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 208–211.
- (44) Munro, J. C.; Frank, C. W. In situ formation and characterization of poly(ethylene glycol)-supported lipid bilayers on gold surfaces. *Langmuir* **2004**, *20*, 10567–10575.
- (45) Albertorio, F.; Diaz, A. J.; Yang, T.; Chapa, V. A.; Kataoka, S.; Castellana, E. T.; Cremer, P. S. Fluid and air-stable lipopolymer membranes for biosensor applications. *Langmuir* **2005**, *21*, 7476–7482.
- (46) Wallin, M.; Choi, J.-H.; Kim, S. O.; Cho, N.-J.; Andersson, M. Peptide-induced formation of a tethered lipid bilayer membrane on mesoporous silica. *Eur. Biophys. J.* **2015**, *44*, 27–36.
- (47) Przybylo, M.; Sýkora, J.; Humpolíčková, J.; Benda, A.; Zan, A.; Hof, M. Lipid diffusion in giant unilamellar vesicles is more than 2 times faster than in supported phospholipid bilayers under identical conditions. *Langmuir* **2006**, *22*, 9096–9099.
- (48) Matsubara, T.; Shibata, R.; Sato, T. Binding of hemagglutinin and influenza virus to a peptide-conjugated lipid membrane. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 468.
- (49) Kell, D. B. What would be the observable consequences if phospholipid bilayer diffusion of drugs into cells is negligible? *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, *36*, 15–21.
- (50) Jing, B.; Lan, N.; Qiu, J.; Zhu, Y. M. Interaction of ionic liquids with a lipid bilayer: a biophysical study of ionic liquid cytotoxicity. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 2781–2789.
- (51) Marsh, D. Lateral pressure in membranes. *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembr.* **1996**, *1286*, 183–223.
- (52) Jurak, M. Thermodynamic aspects of cholesterol effect on properties of phospholipid monolayers: Langmuir and Langmuir–Blodgett monolayer study. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 3496–3502.
- (53) Wydro, P.; Knapczyk, S.; Łapczyńska, M. Variations in the condensing effect of cholesterol on saturated versus unsaturated phosphatidylcholines at low and high sterol concentration. *Langmuir* **2011**, *27*, 5433–5444.
- (54) Proksch, R.; Schäffer, T. E.; Cleveland, J. P.; Callahan, R. C.; Viani, M. B. Finite optical spot size and position corrections in thermal spring constant calibration. *Nanotechnology* **2004**, *15*, 1344–1350.
- (55) Eskelsen, J. R.; Qi, Y.; Schneider-Pollack, S.; Schmitt, S.; Hipps, K. W.; Mazur, U. Correlating elastic properties and molecular organization of an ionic organic nanostructure. *Nanoscale* **2014**, *6*, 316–327.
- (56) Oncins, G.; Picas, L.; Hernández-Borrell, J.; García-Manyes, S.; Sanz, F. Thermal response of Langmuir–Blodgett films of dipalmitoylphosphatidylcholine studied by atomic force microscopy and force spectroscopy. *Biophys. J.* **2007**, *93*, 2713–2725.
- (57) García-Manyes, S.; Oncins, G.; Sanz, F. Effect of ion-binding and chemical phospholipid structure on the nanomechanics of lipid bilayers studied by force spectroscopy. *Biophys. J.* **2005**, *89*, 1812–1826.
- (58) García-Manyes, S.; Redondo-Morata, L.; Oncins, G.; Sanz, F. Nanomechanics of lipid bilayers: heads or tails? *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12874–12886.
- (59) Heriot, S. Y.; Zhang, H.-L.; Evans, S. D.; Richardson, T. H. Multilayers of 4-methylbenzenethiol functionalized gold nanoparticles fabricated by Langmuir–Blodgett and Langmuir–Schaefer deposition. *Colloids Surf., A* **2006**, *278*, 98–105.
- (60) Haro, M.; Giner, B.; Lafuente, C.; López, M. C.; Royo, F. M.; Cea, P. Proton sponge and fatty acid interactions at the air-water interface. Thermodynamic, spectroscopic, and microscopic study. *Langmuir* **2005**, *21*, 2796–2803.
- (61) Anariba, F.; DuVall, S. H.; McCreery, R. L. Mono- and multilayer formation by diazonium reduction on carbon surfaces monitored with atomic force microscopy “scratching”. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3837–3844.
- (62) Hane, F.; Moores, B.; Amrein, M.; Leonenko, Z. Effect of SP-C on surface potential distribution in pulmonary surfactant: Atomic force microscopy and Kelvin probe force microscopy study. *Ultramicroscopy* **2009**, *109*, 968–973.
- (63) Yang, X. M.; Xiao, D.; Xiao, S. J.; Wei, Y. Domain structures of phospholipid monolayer Langmuir–Blodgett films determined by atomic force microscopy. *Appl. Phys. A: Solids Surf.* **1994**, *59*, 139–143.
- (64) Ebeling, D.; Hölscher, H.; Fuchs, H.; Anczykowski, B.; Schwarz, U. D. Imaging of biomaterials in liquids: a comparison between conventional and Q-controlled amplitude modulation (“tapping mode”) atomic force microscopy. *Nanotechnology* **2006**, *17*, S221–S226.
- (65) Melzak, K. A.; Lázaro, G. R.; Hernández-Machado, A.; Pagonabarraga, I.; Cárdenas Díaz de Espada, J. M.; Toca-Herrera, J.

L. AFM measurements and lipid rearrangements: evidence from red blood cell shape changes. *Soft Matter* **2012**, *8*, 7716–7726.

(66) Xu, S.; Cruchon-Dupeyrat, S. J. N.; Garno, J. C.; Liu, G.-Y.; Jennings, G. K.; Yong, T.-H.; Laibinis, P. E. In situ studies of thiol self-assembly on gold from solution using atomic force microscopy. *J. Chem. Phys.* **1998**, *108*, 5002–5012.

(67) Weroński, K. J.; Cea, P.; Diez-Peréz, I.; Antonia Busquets, M.; Prat, J.; Girona, V. Time-Lapse atomic force microscopy observations of the morphology, growth rate, and spontaneous alignment of nanofibers containing a peptide-amphiphile from the hepatitis G virus(NS3 protein). *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 620–625.

(68) Ivanov, G. R.; Polevska, Z. First observation of 3D aggregates in a single-component Langmuir film below the equilibrium spreading pressure. *MATEC Web Conf.* **2017**, *98*, 01003.

(69) Czolkos, I.; Jesorka, A.; Orwar, O. Molecular phospholipid films on solid supports. *Soft Matter* **2011**, *7*, 4562–4576.

(70) Oberts, B. P.; Blanchard, G. J. Formation of air-stable supported lipid monolayers and bilayers. *Langmuir* **2009**, *25*, 2962–2970.

(71) Kunze, A.; Sjövall, P.; Kasemo, B.; Svedhem, S. In situ preparation and modification of supported lipid layers by lipid transfer from vesicles studied by QCM-D and TOF-SIMS. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2450–2451.

(72) Ryu, Y.-S.; Wittenberg, N. J.; Suh, J.-H.; Lee, S.-W.; Sohn, Y.; Oh, S.-H.; Parikh, A. N.; Lee, S.-D. Continuity of monolayer-bilayer junctions for localization of lipid raft microdomains in model membranes. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 26823.

(73) Dols-Perez, A.; Fumagalli, L.; Gomila, G. Structural and nanomechanical effects of cholesterol in binary and ternary spin-coated single lipid bilayers in dry conditions. *Colloids Surf., B* **2014**, *116*, 295–302.

(74) Oliver, A. E.; Parikh, A. N. Templating membrane assembly, structure, and dynamics using engineered interfaces. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2010**, *1798*, 839–850.

(75) Berger, C. E. H.; van der Werf, K. O.; Kooyman, R. P. H.; de Grooth, B. G.; Greve, J. Functional group imaging by adhesion AFM applied to lipid monolayers. *Langmuir* **1995**, *11*, 4188–4192.

(76) Dufrière, Y. F.; Boland, T.; Schneider, J. W.; Barger, W. R. J.; Lee, G. U. Characterization of the physical properties of model biomembranes at the nanometer scale with the atomic force microscope. *Faraday Discuss.* **1999**, *111*, 79–94.

(77) 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. *Electrochim. Acta* **2006**, *51*, 5029–5036.

(78) Garcia-Manyes, S.; Sanz, F. Nanomechanics of lipid bilayers by force spectroscopy with AFM: A perspective. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2010**, *1798*, 741–749.

(79) Kotulska, M.; Kubica, K. Structural and energetic model of the mechanisms for reduced self-diffusion in a lipid bilayer with increasing ionic strength. *Phys. Rev. E: Stat., Nonlinear, Soft Matter Phys.* **2005**, *72*, 061903.

(80) Aroti, A.; Leontidis, E.; Dubois, M.; Zemb, T. Effects of monovalent anions of the Hofmeister series on DPPC lipid bilayers Part I: swelling and in-plane equations of state. *Biophys. J.* **2007**, *93*, 1580–1590.

(81) Schneider, J.; Dufrière, Y. F.; Barger, W. R., Jr.; Lee, G. U. Atomic force microscope image contrast mechanisms on supported lipid bilayers. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 1107–1118.

(82) Asakawa, H.; Fukuma, T. The molecular-scale arrangement and mechanical strength of phospholipid/cholesterol mixed bilayers investigated by frequency modulation atomic force microscopy in liquid. *Nanotechnology* **2009**, *20*, 264008.

(83) Redondo-Morata, L.; Oncins, G.; Sanz, F. Force Spectroscopy Reveals the Effect of Different Ions in the Nanomechanical Behavior of Phospholipid Model Membranes: The Case of Potassium Cation. *Biophys. J.* **2012**, *102*, 66–74.

(84) Matyszewska, D.; Bilewicz, R.; Su, Z.; Abbasi, F.; Leitch, J. J.; Lipkowski, J. PM-IRRAS studies of DMPC bilayers supported on

Au(111) electrodes modified with hydrophilic monolayers of thioglucose. *Langmuir* **2016**, *32*, 1791–1798.



Altering model cell membranes by means of localized magnetic heating

Silvia Ruiz-Rincón^{a,b,c,1}, Alejandro González-Orive^{d,1}, Valeria Grazú^{c,e}, Raluca M. Fratila^{c,e,*}, Jesús M. de la Fuente^{c,e}, Pilar Cea^{a,b,c,f,*}

^a Instituto de Nanociencia de Aragón (INA), Campus Río Ebro, Universidad de Zaragoza, C/Mariano Esquillor, s/n, 50018 Zaragoza, Spain

^b Laboratorio de Microscopías Avanzadas (LMA), Campus Río Ebro, Universidad de Zaragoza, C/Mariano Esquillor, s/n, 50018 Zaragoza, Spain

^c Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón (ICMA), Universidad de Zaragoza-CSIC, C/Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza, Spain

^d Technical and Macromolecular Chemistry, University of Paderborn, Warburger Strasse 100, 33098 Paderborn, Germany

^e Networking Biomedical Research Centre of Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Spain

^f Departamento de Química Física, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, 50009, Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Model cell membrane
Langmuir-Blodgett films
Magnetic nanoparticles
Alternating magnetic field

ABSTRACT

Isolated iron oxide magnetic nanoparticles (MNPs), 12 nm in diameter, coated with oleic acid molecules as capping agents have been deposited by the Langmuir-Blodgett (LB) method onto a model cell membrane incorporating 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) and Cholesterol (Chol) in the 1:1 ratio, which was also fabricated by the LB technique. Atomic Force Microscopy (AFM) experiments showed that the application of an alternating magnetic field results in the embedding of the MNPs through the phospholipid layer. These experimental results reveal that the heating of individual MNPs may induce a local increase in the fluidity of the film with a large control of the spatial and temporal specificity.

1. Introduction

Magnetic nanoparticles (MNPs), and in particular those composed by ferrimagnetic iron oxides (mainly magnetite and maghemite) are relevant materials for the development of biomedical applications [1,2]. One of the most interesting features of MNPs is their ability to dissipate heat when exposed to an alternating magnetic field (AMF), which has been extensively investigated in terms of heating mechanisms and heat generation efficiency [3–6]. Small monodomain MNPs can transform the energy absorbed from an AMF into heat based on two main mechanisms: (i) Néel relaxation, related to the change in the direction of the magnetic moments of the crystal lattice, and (ii) Brown relaxation, caused by the rotation of the whole particle and frictional losses with the surrounding medium. The heating efficiency of the MNPs in suspension is measured in terms of the specific absorption rate (SAR = the magnetic energy transformed into heat per unit of time and mass). SAR values depend not only on the properties of the AMF (field amplitude, frequency) and the intrinsic properties of the MNPs (size, crystallinity, anisotropy) but also on their environment (viscosity of the medium, MNP aggregation state, etc.). Thus, heat generation should be different in suspension and in biological scenarios in which the particles cannot move freely, for instance when they are immobilized on the cell membrane. In this case, heat generation will be due mainly to Néel

relaxation since Brownian relaxation will be minimized or even suppressed [7,8]. We are particularly interested in studying the effect of the heat generated by MNPs immobilized on cell membranes. We hypothesize that immobilized MNPs could act as “nanoheaters” and induce a localized heating that could modify the fluidity of the membrane in the vicinity of the MNPs, which in turn could be used as a tool for fundamental membrane biophysics studies. In this contribution, we report the effect of the localized heating of a model cell membrane using 12-nm iron oxide MNPs, which are known to display prevalence for the Néel relaxation mechanism [3,9,10] and therefore should still be able to generate a very controlled and localized heating when immobilized on the cell membrane.

Cell membrane models (liposomes and vesicles [11–13], insoluble Langmuir monolayers [14–17], and supported lipid bilayers [18–22]) are known to correctly model biological membranes to a great extent, simplifying the intrinsic complexity of natural membranes so that the relation between features of individual components, on one hand, and membrane organization and processes, on the other, can be investigated. Moreover, immobilization of these models onto different surfaces (e.g. flat mica for detailed surface characterization, porous silicon substrates for the membrane permeability studies, etc.) allows following reactions and changes on the surface of the model membrane with molecular resolution by means of atomic force microscopy, AFM

* Corresponding authors.

E-mail address: pilarcea@unizar.es (P. Cea).

¹ These authors contributed equally to this work.

[23–28]. This technique can probe the local properties of thin solid films with the possibility of controlling the environmental conditions (liquid environment, temperature variations, etc.) providing high spatial [29], force and time resolution [30]. AFM imaging of soft multilayered films has provided a comprehensive understanding of molecular interactions among the film components [22,31–34]. For these reasons, in this contribution layers mimicking the cell membrane composed of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) and Cholesterol (Chol) in the 1:1 ratio have been fabricated using the Langmuir-Blodgett technique (LB). On the one hand, the choice of DPPC is motivated by the abundance of phosphatidylcholines in the eukaryote membrane composition and their widespread use in membrane mimetics [16,35–40]. In particular, DPPC has been employed as a model lipid for erythrocyte membranes [41]. It is also known that in the human erythrocyte membrane phosphatidylcholine is predominantly found in the outer leaflet of bilayer membranes with a proportion in this leaflet as high as 76–78% [42]. On the other hand, Chol plays a fundamental role in the cell membrane [43] given that Chol is modulates the fluidity of the cell membrane [44] and the phase transition of lipid bilayers [27]; Chol also increases the structural order of phospholipid chains in the fluid-phase [45,46], having an opposite effect on phospholipids in the gel phase [47–49]. Importantly, previous work in our laboratory demonstrated that a monolayer incorporating DPPC:Chol in the 1:1 ratio results in very homogeneous and flat films, exhibiting a very low roughness (root mean square roughness of 0.07 ± 0.01 nm) [22]. This homogeneous and flat surface makes the DPPC:Chol 1:1 film an ideal system to detect by AFM any change on the surface topography of the membrane [50] induced by external agents. For these reasons, MNPs were subsequently deposited on top of this model cell membrane by the LB method, which results in an unaltered DPPC:Chol monolayer exhibiting a rather low coverage of isolated nanoparticles onto the DPPC:Chol layer. In this paper, it is shown that the application of an alternating magnetic field results in penetration of the MNPs through the layer, which has been interpreted in terms of a change of the fluidity of the lipid layer in the surroundings of the MNPs.

Fig. 1 shows a graphical scheme that summarizes the key steps of the fabrication and characterization of a model cell membrane of DPPC:Chol 1:1, the deposition of the MNPs on the model cell membrane and the effect of an alternating magnetic field onto the mica/DPPC:Chol/MNPs system.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of MNPs coated with oleic acid

Iron(III) acetylacetonate, 1,2-hexadecanediol, oleic acid, oleylamine, benzyl ether, Tiron (1,2-dihydroxybenzen-3,5-disulfonic acid), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC, 99.9%), and cholesterol (Chol, 99.9%) were purchased from Sigma-Aldrich. Chloroform stabilized with ethanol (Reag. Ph. Eur.), absolute ethanol (99.8% vol.), nitric acid and hydrochloric acid were acquired from Panreac. Iron standard solution was purchased from Acros. All commercially available reagents were used as supplied.

Iron oxide magnetic nanoparticles of 12 nm in diameter were synthesised by thermal decomposition of iron acetylacetonate, as previously reported in our group [51,52]. We followed the so-called “seed-mediated” growth protocol in which 6-nm iron oxide MNPs were used as “seeds” to promote the growth of 12-nm MNPs. Briefly, $\text{Fe}(\text{acac})_3$ (0.71 g, 2.01 mmol), 1,2-hexadecanediol (2.58 g, 9.98 mmol), oleic acid (2 mL, 5.65 mmol) and oleylamine (2 mL, 4.22 mmol) were solubilized in benzyl ether (40 mL) in a three-neck glass flask equipped with mechanical stirring, temperature probe and water condenser. The mixture was degassed and flushed three times with nitrogen and then heated to 200 °C (at a speed of 3 °C min⁻¹) and maintained at this temperature for 2 h to promote nucleation. The temperature was further increased to 305 °C at a heating rate of 10 °C min⁻¹ and

maintained for 2 h. The mixture was then allowed to cool down to room temperature, and then the nanoparticles were precipitated with ethanol, collected with a magnet and redispersed in hexane; this procedure was repeated three times and then the nanoparticles were re-dispersed in a mixture of hexane, oleic acid and oleylamine. To obtain 12 nm nanoparticles, 40 mg of the 6 nm seeds in hexane were added to a mixture containing $\text{Fe}(\text{acac})_3$ (1.42 g, 4.02 mmol), 1,2-hexadecanediol (5.16 g, 19.97 mmol), oleic acid (1 mL, 3.12 mmol), oleylamine (1 mL, 3.06 mmol), and 40 mL of benzyl ether. The mixture was heated to 100 °C (3 °C min⁻¹) and maintained for 30 min to evaporate the hexane, then heated to 200 °C (3 °C min⁻¹) and kept at this temperature for 1 h. The temperature was further increased to 305 °C at a heating rate of 10 °C min⁻¹ and maintained for 1 h. The mixture was then allowed to cool down to room temperature, and the nanoparticles were washed as indicated above and stored at 4 °C in a mixture of hexane, oleic acid and oleylamine.

The iron concentrations of the nanoparticle dispersions were calculated using a spectrophotometric method. Samples were prepared by dilution of 5 or 10 µL of the nanoparticle dispersion in hexane to a final volume of 50 µL. Samples were incubated with 100 µL of aqua regia solution (HCl:HNO₃ 3:1) at 60 °C for 15 min in order to remove the organic coating. Subsequently, 350 µL of Milli-Q water were added and 50 µL of the final total volume of each solution were transferred to a well plate. 100 µL of 0.2 M Na₃PO₄ (pH = 9.7) and 60 µL of a solution consisting of 50 µL of a 4 M KOH and a 10 µL of 0.25 M Tiron (1,2-dihydroxybenzen-3,5-disulfonic acid) mixture were added. The samples were maintained at room temperature for 15–20 min. Finally, sample absorbance was measured at 480 nm on a Multiskan Go spectrophotometer (Thermo Scientific). A similar protocol was followed using six standard solutions of well-known iron(III) concentrations (0, 100, 200, 400, 600 and 800 µg mL⁻¹) in order to obtain a calibration curve. Each sample was analysed by triplicate. Standard solutions were fitted to a calibration curve and the sample absorption value was interpolated in order to determine the iron concentration.

2.2. Characterization of magnetic nanoparticles

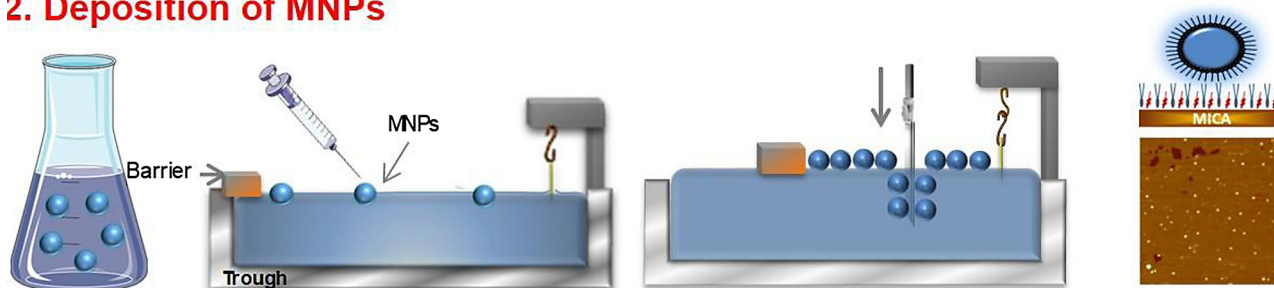
Transmission electron microscopy (TEM) images were recorded by means of a Tecnai T20 microscope (FEI) operating at 200 kV. A single drop (10 µL) of a solution (0.1 mg Fe mL⁻¹) of the different nanoparticles was placed onto a copper grid coated with a carbon film (Electron Microscopy Sciences). The grid was left to dry in air for several hours at room temperature. Particle size distribution was evaluated from several micrographs using an automatic image analyser (ImageJ). A total of 200 particles were selected for analysis, which resulted in a stable size distribution statistic. A thermal gravimetric analysis (TGA) of the MNPs was performed using a TA STD 2960 simultaneous DTA-DTGA instrument in air at a heating rate of 10 °C min⁻¹. The TGA result shown in Figure S1 in the Supporting Information (SI) evidences no loss of material for these MNPs for temperatures below 200 °C.

The Specific Absorption Rate (SAR) of the MNPs transferred to water was measured using a DM100 Series equipment from nB nanoScale Biomagnetics at an iron concentration of 1 mg mL⁻¹ and using a field amplitude of $H = 20.1$ kA m⁻¹, and a frequency of 836 kHz. Due to technical restrictions of our hyperthermia equipment (the fiber optic temperature probe coating is not compatible with organic solvents), the measurement of SAR values is only possible using aqueous solvents. Therefore, the value herein reported corresponds to MNPs having the same inorganic iron oxide core and the same oleic acid surface ligand shell, but additionally coated with an amphiphilic polymer, poly(maleic anhydride-alt-1-octadecene), PMAO, following the protocol described in ref. [51].

1. Fabrication of DPPC:Cholesterol 1:1 monolayers



2. Deposition of MNPs



3. Application of an alternating magnetic field

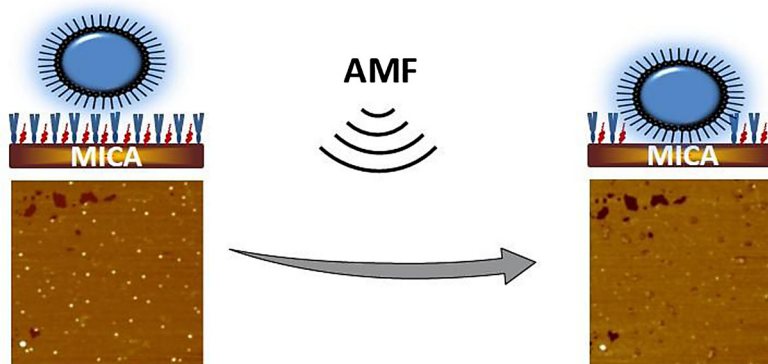


Fig. 1. Cartoon showing the steps followed in the present work to analyze the effect of an alternating magnetic field on model cell membranes. DPPC: 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; Chol: cholesterol; MNPs: magnetic nanoparticles; AMF: alternating magnetic field.

2.3. Films preparation

A KSV trough with dimensions $580 \times 145 \text{ mm}^2$ was employed to fabricate the Langmuir monolayers and, subsequently, the Langmuir–Blodgett films. The surface pressure (π) of the monolayers was determined using a Wilhelmy paper plate pressure sensor. The subphase was pure water (Millipore Milli-Q, resistivity $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$). The trough was housed in a constant temperature clean room ($20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$). 10^{-4} M solutions of DPPC and Chol in chloroform were mixed in a 1:1 ratio; $750 \text{ }\mu\text{L}$ of this mixed solution were spread drop by drop onto the aqueous surface by means of a Hamilton microsyringe. The spreading solvent was allowed to completely evaporate (over a period of at least 15 min). Afterwards, the compression of the monolayer started at a constant sweeping speed of $1.93 \times 10^{-2} \text{ nm}^2 \text{ molecule}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Langmuir films were transferred onto $1 \times 1 \text{ cm}^2$ freshly cleaved mica substrates (for the subsequent AFM analysis) at a surface pressure of 35 mN m^{-1} by withdrawing a freshly cleaved mica substrate from the aqueous subphase; the withdrawing speed was 1 mm min^{-1} and the films were transferred by using the vertical dipping method. These have

been probed recently as optimal conditions to obtain homogeneous LB monolayers of DPPC and Chol [22]. A Langmuir–Blodgett film incorporating MNPs was deposited onto the DPPC:Chol 1:1 LB monolayer. Prior to the deposition, the MNPs prepared as described above were washed three times with ethanol to remove the excess of oleic acid and oleylamine. After the last washing step, the MNPs were dispersed in hexane at a concentration of $0.04 \text{ mgFe mL}^{-1}$. $1200 \text{ }\mu\text{L}$ of this MNPs dispersion were spread drop by drop onto the aqueous surface by using a Hamilton microsyringe. The spreading solvent was allowed to completely evaporate over a period of at least 40 min before compression of the monolayer at a constant sweeping speed of 6 mm min^{-1} . Langmuir films were transferred onto the DPPC:Chol 1:1-modified mica substrates at a surface pressure of 15 mN m^{-1} and an immersion speed of the substrate of 1 mm min^{-1} by using the vertical dipping method. After immersion of the substrate the water surface was carefully cleaned and the substrate was withdrawn. The time and conditions required for the transference of the MNPs from the air-water interface to the DPPC:Chol 1:1 monolayer do not result in any observable rearrangement of the underlying monolayer. The transfer ratio of the

MNPs is rather low (< 0.1) and this results in a low surface density of MNPs on the model membrane, which allows a comprehensive analysis of each particle as shown in the results and discussion section.

2.4. Characterization of the films

Atomic Force Microscopy (AFM) images of the samples were recorded by using a Multimode 8 microscope which is equipped with a Nanoscope V control unit from Bruker (Tapping™ and Peak-Force Tapping™ modes). RFESP (75–100 kHz, and 1–5 $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$, from Bruker) and ScanAsyst-Air-HR (130–160 kHz, and 0.4–0.6 $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$, from Bruker) tips were used to record the AFM images. These images were registered in air with scan rates of 1 $\text{Hz}\cdot\text{line}^{-1}$, 512 lines, and force ranging 0.2–2 nN. Patterned mica substrates were used in order to explore exactly the same area of the film before and after the application of a magnetic field (see details below and in Figure S2). Differences in height for the as-prepared monolayer and MNPs before and after hyperthermia were determined by performing a section analysis. The as-measured heights of more than 150 MNPs were recorded for statistical purposes. Bearing and depth statistical analysis were carried out by means of Nanoscope off-line v. 1.40 and Gwyddion v. 2.41 package softwares. AFM images were reduced to binary images by thresholding with the depth value corresponding to the highest point of the peaks detected in the depth histograms. The bearing analysis tool allows the determination of the percentage of the projected area occupied by features exhibiting depth values smaller than or equal to the threshold one. Thus, the histogram for the estimation of the MNP surface coverage (ratio of sample area occupied by particles to total sample area) has been obtained from the data acquired by using the masking application included in the Gwyddion v.2.47 software which allows to precisely estimate the surface area percentage over a certain height threshold (phospholipid layer) [53]. This has been made for a whole set of representative $1.0 \times 1.0\ \mu\text{m}^2$ AFM images corresponding to different areas belonging to distinct samples prepared in an analogue way for statistical purposes.

Hyperthermia experiments of the LB films incorporating the MNPs were performed using a DM100 Series equipment from nB nanoScale Biomagnetics. In order to carry out the hyperthermia experiments, samples were placed in a test tube in air media (see Figure S3). Experiments were carried out at 836 kHz with an applied magnetic field of $20.1\ \text{kA}\cdot\text{m}^{-1}$ for 90 min.

3. Results and discussion

The synthesis of iron oxide magnetic nanoparticles coated with oleic acid molecules as capping agents has been addressed following a previously established methodology [51,52]. Briefly, monodisperse spherical iron oxide nanoparticles, with an average diameter of 12 nm as

determined from transmission electron microscopy (TEM) images (Fig. 2.a), were synthesised using a “seed-mediated” growth method (see Materials and Methods section). The amount of oleic acid coating the MNPs was estimated from the thermogravimetric analysis (TGA) of the samples, resulting in approximately 1170 oleic acid molecules per MNP (Figure S1). The specific absorption rate (SAR) of the MNPs was found to be of $500\ \text{W}\cdot\text{g}_{\text{Fe}}^{-1}$ (for more details, see Materials and Methods section).

In a recent contribution, our group reported the formation of a homogeneous Langmuir-Blodgett monolayer of DPPC:Chol 1:1 onto a freshly cleaved mica surface, whose thickness was 2.4 nm [22]. In this work, we used the same experimental conditions to deposit a monolayer of DPPC:Chol 1:1 onto mica. At this surface pressure of transference the monolayer exhibits a Young modulus of $K_s = 342\ \text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ [22], i.e., it is in a liquid condensed state [54], and results in highly homogeneous films [22] (adequate to evaluate the embedding of the MNPs in the lipid membrane as reported here). Langmuir films of the above described MNPs were also fabricated (see Figure S4 in the supporting information where a surface pressure vs. area per molecule isotherm is shown; the shape of such an isotherm is in good agreement with other isotherms previously reported for similar nanoparticles [55] (although the larger areas here obtained might be due to the presence of residual surfactants from the synthesis of the NPs). The Langmuir film containing the MNPs was transferred on top of a DPPC:Chol 1:1 monolayer that was previously deposited onto mica. The optimum surface pressure of transference for the MNPs was $15\ \text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ for which the area per MNP is $709\ \text{nm}^2$, larger than the theoretical value of $\sim 211\ \text{nm}^2$ estimated for a spherical MNP with a diameter of $\sim 16.4\ \text{nm}$ ($\sim 12\ \text{nm}$ for the core and $\sim 4.4\ \text{nm}$ more due to the shell - 2.2 nm per oleic acid molecule). Importantly, at this surface pressure a homogeneous distribution of individual MNPs on top of the model cell membrane is obtained as shown in Fig. 2.b. The MNPs immobilized onto the monolayer result in a very low surface coverage (ca. 7% of the total area is covered by the MNPs, Fig. 2.c), with randomly distributed MNPs which are 6–30 nm in width and 2–6 nm in height. This low surface coverage permits a detailed and individual study of the effect of the applied magnetic field on each particle.

Fig. 3.a and Fig. 3.b show a representative $5 \times 5\ \mu\text{m}^2$ AFM image of a mica/DPPC:Chol/MNPs surface before and after the application of an AMF. For illustrative purposes Fig. 3.d and Fig. 3.e show representative $2 \times 2\ \mu\text{m}^2$ images of a mica/DPPC:Chol/MNPs surface before and after the application of an AMF (836 kHz, $20.1\ \text{kA}\cdot\text{m}^{-1}$ for 90 min). Figs. 3.a and d exhibit the presence of the MNPs randomly distributed over the DPPC:Chol monolayer. The formation of very homogeneous and essentially raft, defect, and pinhole-free DPPC:Chol 1:1 monolayers has been probed [22]. However, some partial dissolution of a very reduced amount of DPPC and Chol molecules initially tightly packed in the LB

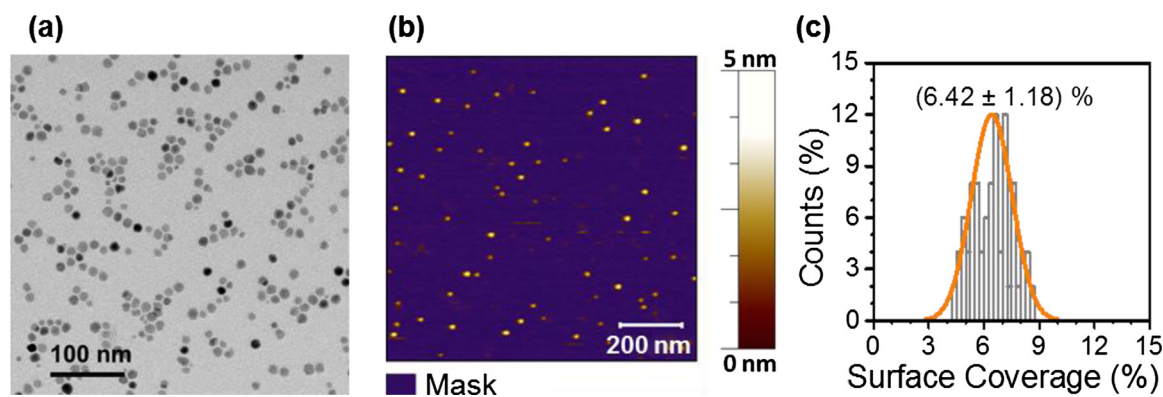


Fig. 2. (a) TEM image of MNPs as prepared. (b) $1.0 \times 1.0\ \mu\text{m}^2$ AFM image of mica/DPPC:Chol 1:1/MNPs with the mask in blue unveiling free-nanoparticle DPPC:Chol areas. (c) Histogram showing the average percentage of MNPs-covered substrate area. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

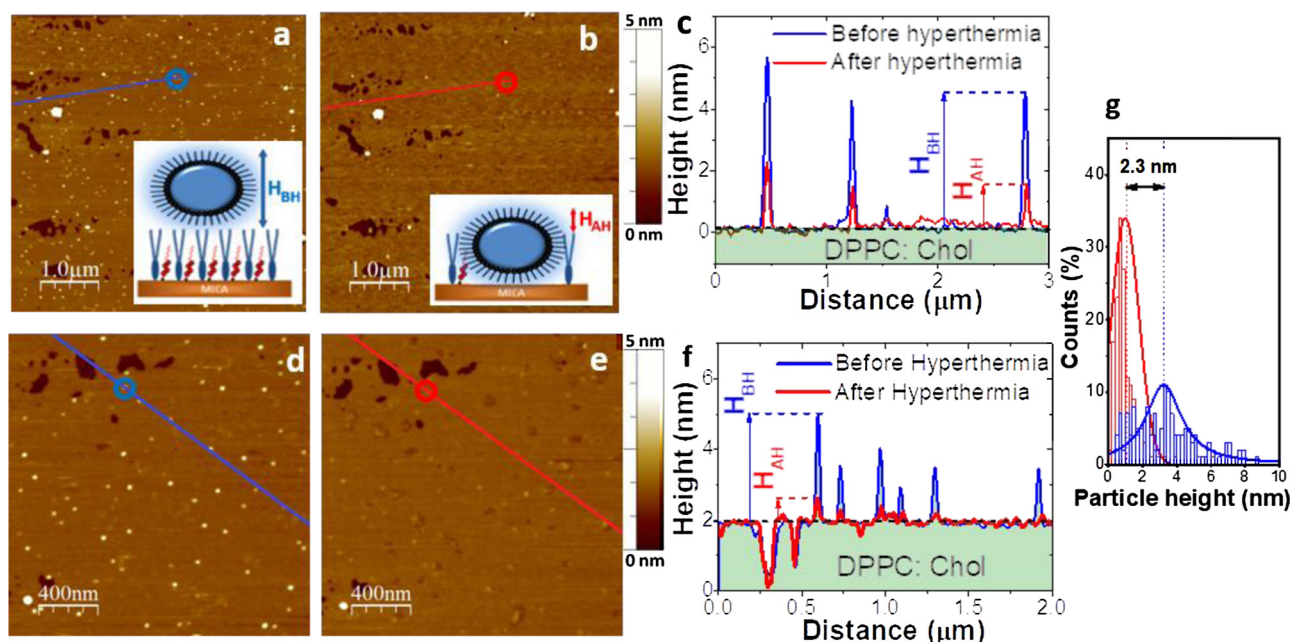


Fig. 3. (a) Representative $5.0 \times 5.0 \mu\text{m}^2$ AFM image of a pristine mica/DPPC: Chol 1:1/MNPs. (b) $5.0 \times 5.0 \mu\text{m}^2$ AFM image of mica/DPPC: Chol 1:1/MNPs (same area as (a)) after the application of an external alternating magnetic field with a frequency of 836 kHz and a magnetic field amplitude of $20.1 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ for $t = 90$ min. (c) Cross section profiles corresponding to the blue line in (a) for the pristine system and the same cross section profile after the application of the alternating magnetic field height (red line). (d) Representative $2.0 \times 2.0 \mu\text{m}^2$ AFM image of a pristine mica/DPPC:Chol 1:1/MNPs. (e) $2.0 \times 2.0 \mu\text{m}^2$ AFM image of the mica/DPPC:Chol 1:1/MNPs (same area as d) after the application of an external alternating magnetic field with a frequency of 836 kHz and a magnetic field amplitude of $20.1 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ for 90 min. (f) Cross section profiles corresponding to the blue line in (a) for the pristine system and the same cross section profile after the application of the alternating magnetic field height (red line). (g) Height value histograms obtained from taking cross sections of the same MNPs before (blue) and after hyperthermia (red) obtained from $5.0 \times 5.0 \mu\text{m}^2$ images. The result of subtracting the average value of the MNPs height before and after hyperthermia is 2.3 nm (i.e. $H_{\text{BH}} - H_{\text{AH}}$ in the cartoon). An identical result is obtained from $2.0 \times 2.0 \mu\text{m}^2$ images. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

film when the DPPC:Chol monolayer is exposed to the MNPs-containing subphase has been observed. Thus, some nearly monomolecular-high defects in the phospholipid layer can also be distinguished on the left side in Fig. 3.a and top left of Fig. 3.d. The depth of the resulting defects in the film (measured by carrying out cross section profiles through them) is 2.1 ± 0.3 nm, which is very close to the value provided by Ruiz et al. [22], i.e. 2.4 nm for the thickness of the monolayer. This value is also in agreement with a model in which DPPC molecules are arranged in a nearly standing-up configuration (tilt angle of ca. 19° versus the surface normal). By taking cross section profiles of mica/DPPC:Chol/MNPs systems, the height of the adsorbed MNPs with respect to the DPPC:Chol 1:1 surface can be measured and recorded for statistical purposes. An illustrative example is shown in Fig. 3.c (and the equivalent for the $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ image in Fig. 3.f), where the height of a representative MNP has been labelled as H_{BH} (height before application of the alternating magnetic field) and identified with a blue circle in Fig. 3.a. The lower height of the MNPs in the AFM images compared to the size of the MNPs as determined from TEM images is attributable to the well-known flattening effect of metal nanoparticles when they are immobilized onto a solid support [56–58] due to the tendency of NPs to minimize their surface energy by maximizing the contact with the surface. [59] Fig. 3.b shows the same area for the mica/DPPC:Chol/MNPs systems as the one presented in Fig. 3.a but after applying the AMF. Significant differences in the AFM images before and after the application of the magnetic field are observed. Thus, by taking cross section profiles, it can be concluded that the height value exhibited by the MNPs has significantly decreased after the application of the AMF. This phenomenon can be clearly seen in Fig. 3.c and Fig. 3.f where exactly the same profile lines, obtained from AFM images of the same area recorded before and after applying the alternating magnetic field, are plotted together. In particular, the height corresponding to exactly the same individual MNP, labelled as H_{BH} in Fig. 3.a, has been

identified in Fig. 3.b with a red circle and in Fig. 3.c as H_{AH} (height after application of the AMF). Accordingly, average values corresponding to the height value distributions obtained for over 150 individual MNPs shown as height histograms are depicted in Fig. 3.g. Importantly, the difference between the average height of the MNPs (measured vs. the DPPC:Chol 1:1 surface) before and after the magnetic hyperthermia treatment is similar to the one measured for the height of the DPPC:Chol monolayer (vs. the underlying MNPs-free mica substrate). This result indicates that each of the individual MNPs distributed onto the monolayer surface gets embedded into the DPPC:Chol 1:1 monolayer when the external AMF is applied. Indeed, the average root mean square (RMS) roughness values measured for different areas before and after the application of the magnetic field exhibit a significant drop: from the initial value of 0.2 nm to the 0.1 nm obtained after applying the AMF, see Figure S5. We tentatively attribute this embedding phenomenon to a change in the DPPC:Chol monolayer packing induced by the local annealing induced by the hyperthermia, with this embedding of the MNPs resulting in a change of the rheological properties of the monolayer, in agreement with previous observations in Langmuir films composed by the ternary mixture of DPPC, Chol and silica nanoparticles [60]. A graphical scheme showing the proposed model for the embedding of the MNPs into the DPPC:Chol 1:1 monolayer and the evolution of their height values after hyperthermia is depicted in the inset of Figs. 3.a and 3.b.

Control experiments have been performed in order to undoubtedly attribute the observed phenomenon to the localized heating induced by magnetic hyperthermia. First, reference measurements - before and after applying an alternating magnetic field - of the DPPC:Chol 1:1 monolayer without the MNPs have been performed (see Figure S6). No change in the morphology of DPPC:Chol 1:1 monolayer due to the application of the alternating magnetic field has been observed. This experiment probes that the observations described in this contribution

for the mica/DPPC:Chol 1:1 monolayer/MNPs after the application of the magnetic field are attributable to the effect of the AMF on the MNPs and not to any effect on the model cell membrane on its own. Secondly, measurements of the height values exhibited by the MNPs deposited onto the DPPC:Chol 1:1 monolayers have been carried out after a global thermal annealing (without any AMF) at 40 and 60 °C (see Figure S7) for which no embedding of the MNPs in the monolayer has been observed. Therefore, the annealing of the entire membrane does result in a global increase of the fluidity of the whole membrane that, in contrast with a local heating, does not result in penetration of the MNPs. This result is in excellent agreement with the contribution of Santhosh et al. reporting the effect of iron oxide magnetic nanoparticles on the fluidity and phase transition of liposomal membranes; this work revealed that global heating does not significantly alter the lipid ordering and fluidity of the membrane [61]. These experimental evidences further confirm that the local heating of the MNPs resulting after the application of an external alternating magnetic field is the responsible for the embedding of the nanoparticles in the monolayer.

There are several literature reports showing that a localized heating takes place in the close surroundings of the MNPs upon exposure to an AMF, without giving rise to an increase of the global temperature of the medium. For instance, using temperature-sensitive polymers modified with fluorescent labels, Polo-Corrales and Rinaldi reported temperatures in the vicinity of the MNPs 15 °C higher than the global temperature of the medium [62]. Moreover, in other studies a direct correlation between the local heating and the distance from the nanoparticle surface could be established as discussed in the following examples. Riedinger et al. [63] incorporated fluorescent dyes at different distances from the MNP surface via thermo-labile azo bonds linked to poly(ethylene glycol) (PEG) spacers of different molecular weights, thus enabling the measurement of the local temperature as a function of the distance. These authors showed that the temperature rise decreased exponentially with the increase in the molecular weight of the PEG. Huang et al. [64] used MNPs functionalized with temperature-sensitive fluorescent dyes to target the plasma membrane of cells expressing TRPV1 (a temperature-sensitive ion channel that is activated at 42 °C). An increase of approximately 5 °C in the temperature of the MNP surface was observed after the application of the AMF. This localized heating was sufficient to trigger the activation of the TRPV1 calcium channels *in vitro*. AMFs have also been used by these authors [65] to heat superparamagnetic NPs located on neuronal membranes probing the activation of neurons by a thermal effect. Recently, a heater/thermometer nanoplatform was used to demonstrate a quasi-instantaneous onset of temperature gradient from the nanoheater to the medium [66]. We also described a molecular local thermal probe based on the thermal denaturation of double-stranded DNA [52]. In that contribution, 12 nm iron oxide MNPs similar to the ones described in this work were coated with an amphiphilic polymer, poly(maleic anhydride-alt-1-octadecene), PMAO, functionalized with DNA and hybridized with complementary DNA strands of three different lengths (thus “sensing” different temperatures), each bearing a different fluorophore. Using this system, we simultaneously determined the local temperature increase at three distances from the MNP surface. A clear correlation was observed, showing a decrease in the local temperature with the increase in the length of the DNA strand (for distances of 5, 5.3 and 5.6 nm from the MNP surface, the corresponding local temperature increase values were of 8.3, 7.8 and 6.1 °C, respectively, for a global temperature of the medium of 30 °C). Taking into account that the melting temperature reported for a DPPC/Chol 1:1 bilayer is in the 39 – 47 °C range, [27,67] an increase (from the room temperature: ca. 27 °C) of ca. 12 °C in the vicinity of the MNP to reach the melting point of the layer is required. Although the hydrophobic MNPs used in the present study (having only a ca. 2-nm thick oleic acid coating) do not incorporate a reporter molecule that would enable a more accurate assessment of the local temperature increase, by analogy with our previous observations we estimate the temperature reached in the close

vicinity of the MNP surface to be higher compared to the one previously reported for the DNA-functionalized MNPs. Such a local heating of individual MNPs may induce a local increase in the fluidity of the film and promote the penetration of the MNPs in the membrane.

4. Conclusions

The set of experiments reported in this contribution indicate that excitation-relaxation mechanisms related to the MNPs deposited onto the model cell membrane give rise to a localized enhancement of the temperature in the immediate environment of each individual MNP. As a consequence, the incorporation/embedding of MNPs into the DPPC:Chol 1:1 monolayer occurs probably due to an increase in the membrane fluidity arising from the locally induced thermal rise. This phenomenon is straightforwardly translated into a decrease in the height values of the measured MNPs which is necessarily in the order of the DPPC:Chol monolayer thickness.

To the best of our knowledge, there are no similar literature observations to date using MNPs immobilized on model cell membranes. This contribution may serve as a proof of concept that demonstrates the possibility of using an AMF to induce changes in the membrane fluidity, promoted by the MNP “hotspot” effect. More studies are needed in order to gain a deeper understanding of the effect of the localized heating on model cell membranes. Such studies are of fundamental importance for future applications concerning the remote control of the cellular membrane using localized magnetic hyperthermia. Studies concerning the immobilization of water-soluble MNPs both on model cell membranes and on the membrane of living cells and the effect of the application of an alternating magnetic field on the cell viability and on the (model) cell membrane biophysical properties are currently underway in our laboratory. “This contribution may serve as a proof of concept that demonstrates the possibility of using an AMF to induce changes in the membrane fluidity, promoted by the MNP “hotspot” effect. More studies are needed in order to gain a deeper understanding of the effect of the localized heating on model cell membranes. Such studies are of fundamental importance for future applications concerning the remote control of the cellular membrane using localized magnetic hyperthermia. Studies concerning the immobilization of water-soluble MNPs both on model cell membranes and on the membrane of living cells and the effect of the application of an alternating magnetic field on the cell viability and on the (model) cell membrane biophysical properties are currently underway in our laboratory.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgments

We are grateful for financial assistance from the European MagicCellGene Project (M-ERA.NET COFUND call 2016, funded by Ministerio de Ciencia e Innovación from Spain in the framework of projects PCIN-2017-127 and PCIN-2017-060) and Spanish MINECO (PGC2018-096016-B-I00 to R.M.F). R.M.F. also acknowledges financial support from European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No. 657215 and from Ministerio de Economía y Competitividad and FSE/Agencia Estatal de Investigación (Ramón y Cajal subprogram RYC-2015-17640). Authors also acknowledge support from DGA and Fondos Feder for funding Platon (E31_20R) and Bionanosurf (E15_17R) research groups.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the

online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111315>.

References

- [1] J. Mosayebi, M. Kiyasatfar, S. Laurent, Synthesis, functionalization, and design of magnetic nanoparticles for theranostic applications, *Adv. Healthc. Mater.* 6 (2017) 1700306.
- [2] M. Colombo, S. Carregal-Romero, M.F. Casula, L. Gutiérrez, M.P. Morales, I.B. Böhm, J.T. Heverhagen, D. Prosperi, W.J. Parak, Biological applications of magnetic nanoparticles, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 4306–4334.
- [3] S. Dutz, R. Hergt, Magnetic particle hyperthermia—a promising tumour therapy? *Nanotechnology* 25 (2014) 452001.
- [4] M.I. Obaidat, B. Issa, Y. Haik, Magnetic properties of magnetic nanoparticles for efficient hyperthermia, *Nanomaterials* 5 (2015) 63–89.
- [5] L. Maldonado-Camargo, I. Torres-Díaz, A. Chiu-Lam, M. Hernández, C. Rinaldi, Estimating the contribution of Brownian and Néel relaxation in a magnetic fluid through dynamic magnetic susceptibility measurements, *J. Magn. Magn. Mater.* 412 (2016) 223–233.
- [6] S. Tong, C.A. Quinto, L. Zhang, P. Mohindra, G. Bao, Size-dependent heating of magnetic iron oxide nanoparticles, *ACS Nano* 11 (2017) 6808–6816.
- [7] R. Di Corato, A. Espinosa, L. Lartigue, M. Tharaud, S. Chat, T. Pellegrino, C. Ménager, F. Gazeau, C. Wilhelm, Magnetic hyperthermia efficiency in the cellular environment for different nanoparticle designs, *Biomaterials* 24 (2014) 64100–64111.
- [8] L. Asín, G. Stepien, M. Moros, R. Fratila, J.M. M.; de la Fuente, Magnetic Nanoparticles for Cancer treatment Using Magnetic Hyperthermia, CRC Press/Taylor and Francis, 2018.
- [9] S. Dutz, R. Hergt, Magnetic nanoparticle heating and heat transfer on a microscale: basic principles, realities and physical limitations of hyperthermia for tumour therapy, *Int. J. Hyperthermia* 29 (2013) 790–800.
- [10] D. Cabrera, A. Coene, J. Leliart, E.J. Artés-Ibáñez, L. Dupré, N.D. Telling, F.J. Teran, Dynamical magnetic response of iron oxide nanoparticles inside live cells, *ACS Nano* 12 (2018) 2741–2752.
- [11] G. Sessa, G. Weissmann, Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes, *J. Lipid Res.* 9 (1968) 310–318.
- [12] N. Rodríguez, J. Heuvingh, F. Pincet, S. Cribier, Indirect evidence of submicroscopic pores in giant unilamellar vesicles, *Biochim. Biophys. Acta* 1724 (2005) 281–287.
- [13] Y. Okumura, H. Zhang, T. Sugiyama, Y. Iwata, Electroformation of giant vesicles on a non-electroconductive substrate, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 1490–1491.
- [14] S.L. Keller, Miscibility transitions and lateral compressibility in liquid phases of lipid monolayers, *Langmuir* 19 (2003) 1451–1456.
- [15] G. Brezesinski, H. Möhwald, Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces, *Adv. Colloid Interface Sci.* 100–102 (2003) 563–584.
- [16] A. Fernández-Botello, F. Comelles, M.A. Alsina, P. Cea, F. Reig, A monolayer study on interactions of docetaxel with model lipid membranes, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 13834–13841.
- [17] J.V.M. Girón, R.V. Vico, B. Maggio, E. Zelaya, A. Rubert, G. Benítez, P. Carro, R.C. Salvarezza, M.E. Vela, Role of the capping agent in the interaction of hydrophilic Ag nanoparticles with DMPC as a model biomembrane, *Environ. Sci. Nano* 3 (2016) 462–472.
- [18] E. Sackmann, Supported membranes: scientific and practical applications, *Science* 271 (1996) 43–48.
- [19] A.P. Girard-Egrot, L.J. Blum, Langmuir-blodgett technique for synthesis of biomimetic lipid membranes, *Nanobiotechnology of Biomimetic Membranes* Vol. 1 Springer, Boston, MA, 2007, pp. 23–74 Chapter 2.
- [20] J. Lipkowski, Building biomimetic membrane at a gold electrode surface, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12 (2010) 13874–13887.
- [21] L.M.C. Lima, M.I. Giannotti, L. Redondo-Morata, M.L.C. Vale, E.F. Marques, F. Sanz, Morphological and nanomechanical behavior of supported lipid bilayers on addition of cationic surfactants, *Langmuir* 29 (2013) 9352–9361.
- [22] S. Ruiz-Rincón, A. González-Orive, J. de la Fuente, P. Cea, Reversible monolayer–bilayer transition in supported phospholipid LB films under the presence of water: morphological and nanomechanical behavior, *Langmuir* 33 (2017) 7538–7547.
- [23] S. Scheuring, Y.F. Dufrene, Atomic force microscopy: probing the spatial organization, interactions and elasticity of microbial cell envelopes at molecular resolution, *Mol. Microbiol.* 75 (2010) 1327–1336.
- [24] V.V. Ginzburg, S. Balijepalli, Modeling the thermodynamics of the interaction of nanoparticles with cell membranes, *Nano Lett.* 7 (2007) 3716–3722.
- [25] A. Verma, F. Stellacci, Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions, *Small* 6 (2010) 12–21.
- [26] A. Berquand, M.-P. Mingéot-Leclercq, Y.F. Dufrene, Real-time imaging of drug-membrane interactions by atomic force microscopy, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1664 (2004) 198–205.
- [27] L. Redondo-Morata, M.I. Giannotti, F. Sanz, Influence of cholesterol on the phase transition of lipid bilayers: a temperature-controlled force spectroscopy study, *Langmuir* 28 (2012) 12851–12860.
- [28] Y.F. Dufrene, D. Martínez-Martín, I. Medalsy, D. Alsteens, D.J. Müller, Multiparametric imaging of biological systems by force-distance curve-based AFM, *Nat. Methods* 10 (2013) 847–854.
- [29] S. Chiodini, D. Reinarés-Fisac, F.M. Espinosa, E. Gutierrez-Puebla, A. Monge, F. Gandara, R. Garcia, Angstrom-resolved metal-organic framework-liquid interfaces, *Sci. Rep.* 7 (2017) 11088–11094.
- [30] F. Zuttion, L. Redondo-Morata, A. Marchesi, I. Casuso, High-Resolution and High-speed atomic force microscopy, *Nanoscale Imaging: Methods and Protocols*, Springer New York, New York, NY, 2018, pp. 181–200.
- [31] M. Haro, B. Giner, C. Lafuente, M.C. Lopez, F.M. Royo, P. Cea, Proton sponge and fatty acid interactions at the air-water interface. Thermodynamic, spectroscopic, and microscopic study, *Langmuir* 21 (2005) 2796–2803.
- [32] A. Villares, S. Martin, I. Giner, J. Diaz, D.P. Lydon, P.J. Low, P. Cea, The use of scanning polarization force microscopy to study the miscibility of a molecular wire candidate and an insulating fatty acid in mixed LB films, *Soft Matter* 4 (2008) 1508–1514.
- [33] L. Redondo-Morata, M.I. Giannotti, F. Sanz, AFM-based force-clamp monitors lipid bilayer failure kinetics, *Langmuir* 28 (2012) 6403–6410.
- [34] B. Gumí-Audenis, F. Sanz, M.I. Giannotti, Impact of galactosylceramides on the nanomechanical properties of lipid bilayer models: an AFM-force spectroscopy study, *Soft Matter* 11 (2015) 5447–5454.
- [35] P. Toimil, G. Prieto, J.J. Miñones, F. Sarmiento, A comparative study of F-DPPC/DPPC mixed monolayers. Influence of subphase temperature on F-DPPC and DPPC monolayers, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12 (2010) 13323–13332.
- [36] M. Jurak, Thermodynamic aspects of cholesterol effect on properties of phospholipid monolayers: langmuir and Langmir-Blodgett monolayer study, *J. Phys. Chem. B* 117 (2013) 3496–3502.
- [37] P. Niga, P.M. Hansson-Mille, A. Swerin, P.M. Claesson, J. Schoelkopf, P.A.C. Gane, E. Bergendal, A. Tummino, R.A. Campbell, C. Magnus Johnson, Interactions between model cell membranes and the neuroactive drug propofol, *J. Colloid Interf. Sci.* 526 (2018) 230–243.
- [38] H. Pick, A.C. Alves, H. Vogel, Single-vesicle assays using liposomes and cell-derived vesicles: from modeling complex membrane processes to synthetic biological and biomedical applications, *Chem. Rev.* 118 (2018) 8598–8654.
- [39] C.M.N. Mendonça, D.T. Balogh, S.C. Barbosa, T.E. Sintra, S.P.M. Ventura, L.F.G. Martins, P. Morgado, E.J.M. Filipe, J.A.P. Coutinho, O.N. Oliveira, A. Barros-Timmons, Understanding the interactions of imidazolium-based ionic liquids with cell membrane models, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 20 (2018) 29764–29777.
- [40] H. Nakamura, K. Sezawa, M. Hata, S. Ohsaki, S. Watano, Direct translocation of nanoparticles across a model cell membrane by nanoparticle-induced local enhancement of membrane potential, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 21 (2019) 18830–18838.
- [41] R.N.M. Weijer, Lipid composition of cell membranes and its relevance in type 2 diabetes mellitus, *Curr. Diabetes Rev.* (2012) 390–400.
- [42] A.J. Verkleij, R.F.A. Zwaal, B. Roelofs, P. Comfurius, D. Kastelijn, Vandeeene, Ll, Asymmetric distribution of phospholipids in human red-cell membrane: combined study using phospholipases and freeze etch electron microscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 323 (1973) 178–193.
- [43] M.R. Krause, S.L. Regen, The structural role of cholesterol in cell membranes: from condensed bilayers to lipid rafts, *Acc. Chem. Res.* 47 (2014) 3512–3521.
- [44] K. Kim, C. Kim, Y. Byun, Preparation of a dipalmitoylphosphatidylcholine/cholesterol Langmuir–Blodgett monolayer that suppresses protein adsorption, *Langmuir* 17 (2001) 5066–5070.
- [45] M.R. Vist, J.H. Davis, Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: deuterium nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry, *Biochemistry* 29 (1990) 451–464.
- [46] T. Miyoshi, S. Kato, Detailed analysis of the surface area and elasticity in the saturated 1,2-Diacylphosphatidylcholine/Cholesterol binary monolayer system, *Langmuir* 31 (2015) 9086–9096.
- [47] W.-C. Hung, M.-T. Lee, F.-Y. Chen, H.W. Huang, The condensing effect of cholesterol in lipid bilayers, *Biophys. J.* 92 (2007) 3960–3967.
- [48] T. Róg, M. Pasenkiewicz-Gierula, I. Vattulainen, M. Karttunen, Ordering effects of cholesterol and its analogues, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1788 (2009) 97–121.
- [49] O. Reis, R. Winter, T.W. Zerda, The effect of high external pressure on DPPC-cholesterol multilamellar vesicles: a pressure-tuning Fourier transform infrared spectroscopy study, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1279 (1996) 5–16.
- [50] M.-C. Giocondi, D. Yamamoto, E. Leniewska, P.-E. Milhiet, T. Ando, C. Le Grimellec, Surface topography of membrane domains, *Biochim. Biophys. Acta* 1798 (2010) 703–718.
- [51] R.M. Fratila, M. Navascuez, J. Idiago-López, M. Eceiza, J.I. Miranda, J.M. Aizpurua, J.M. de la Fuente, Covalent immobilisation of magnetic nanoparticles on surfaces via strain-promoted azide–alkyne click chemistry, *New J. Chem.* 41 (2017) 10835–10840.
- [52] J.T. Dias, M. Moros, P. del Pino, S. Rivera, V. Grazú, J. de la Fuente, DNA as a molecular local thermal probe for the analysis of magnetic hyperthermia, *Ang. Chem. Int. Ed.* (2013) 11526–11529.
- [53] P. Klapetek, M. Valtr, D. Nečas, O. Salyk, P. Dzik, Atomic force microscopy analysis of nanoparticles in non-ideal conditions, *Nanoscale Res. Lett.* 6 (2011) 514.
- [54] L.A. Worthman, K. Nag, P.J. Davis, K.M. Keough, Cholesterol in condensed and fluid phosphatidylcholine monolayers studied by epifluorescence microscopy, *Biophys. J.* 72 (1997) 2569–2580.
- [55] Q. Guo, X. Teng, S. Rahman, H. Yang, Patterned Langmuir-Blodgett films of monodisperse nanoparticles of iron oxide using soft lithography, *J. Am. Chem. Soc.* 3 (2003) 630–631.
- [56] H.M. Osorio, P. Cea, L.M. Ballesteros, I. Gascon, S. Marqués-González, R.J. Nichols, F. Pérez-Murano, P.J. Low, S. Martín, Preparation of nascent molecular electronic devices from gold nanoparticles and terminal alkyne functionalised monolayer films, *J. Mater. Chem. C* 2 (2014) 7348–7355.
- [57] S. Martín, L.M. Ballesteros, A. González-Orive, H. Oliva, S. Marqués-González, M. Lorenzoni, R. Nichols, F. Pérez-Murano, P.J. Low, P. Cea, Towards a metallic top contact electrode in molecular electronic devices exhibiting a large surface coverage by photoreduction of silver cations, *J. Mater. Chem. C* 4 (2016) 9036–9043.
- [58] M. Lafuente, S. Ruiz-Rincon, R. Mallada, P. Cea, M.P. Pina, Towards the

- reproducible fabrication of homogeneous SERS substrates by Langmuir-Schaefer technique: a low cost and scalable approach for practical SERS based sensing applications, *Appl. Surf. Sci.* (2020) 506.
- [59] C.R. Henry, Morphology of supported nanoparticles, *Prog. Surf. Sci.* 80 (2005) 92–116.
- [60] E. Guzmán, L. Liggieri, E. Santini, M. Ferrari, F. Ravera, Mixed DPPC-cholesterol Langmuir monolayers in presence of hydrophilic silica nanoparticles, *Colloids Surf. B* 105 (2013) 284–293.
- [61] P.B. Santhosh, B. Drašler, D. Drobne, M.E. Kreft, S. Kralj, D. Makovec, N.P. Ulrih, Effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticles on fluidity and phase transition of phosphatidylcholine liposomal membranes, *Int. J. Nanomedicine* (2015) 6089–6104.
- [62] L. Polo-Corrales, C. Rinaldi, Monitoring iron oxide nanoparticle surface temperature in an alternating magnetic field using thermoresponsive fluorescent polymers, *J. Appl. Phys.* 11 (2012) 07B334.
- [63] A. Riedinger, P. Guardia, A. Curcio, M.A. Garcia, R. Cingolani, L. Manna, T. Pellegrino, Subnanometer local temperature probing and remotely controlled drug release based on azo-functionalized Iron oxide nanoparticles, *Nano Lett.* 13 (2013) 2399–2406.
- [64] H. Huang, S. Delikanli, H. Zeng, D.M. Ferkey, A. Pralle, Remote control of ion channels and neurons through magnetic-field heating of nanoparticles, *Nat. Nanotechnol.* 5 (2010) 602.
- [65] R. Munshi, S.M. Qadri, Q. Zhang, I. Castellanos Rubio, P. Del Pino, A. Pralle, Magneto-thermal genetic deep brain stimulation of motor behaviors in awake, freely moving mice, *Neurosci. eLife* 6 (2017) e27069.
- [66] R. Piñol, C.D.S. Brites, R. Bustamante, A. Martínez, N.J.O. Silva, J.L. Murillo, R. Cases, J. Carrey, C. Estepa, C. Sosa, F. Palacio, L.D. Carlos, A. Millán, Joining time-resolved thermometry and magnetic-induced heating in a single nanoparticle unveils intriguing thermal properties, *ACS Nano* 9 (2015) 3134–3142.
- [67] S. Garcia-Manyes, L. Redondo-Morata, G. Oncins, F. Sanz, Nanomechanics of lipid bilayers: heads or tails? *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 12874–12886.

Bottom Effect in Atomic Force Microscopy Nanomechanics

Stefano Chiodini,* Silvia Ruiz-Rincón, Pablo D. Garcia, Santiago Martin, Katharina Kettelhoit, Ilaria Armenia, Daniel B. Werz, and Pilar Cea*

In this work, the influence of the rigid substrate on the determination of the sample Young's modulus, the so-called *bottom-effect artifact*, is demonstrated by an atomic force microscopy force-spectroscopy experiment. The nanomechanical properties of a one-component supported lipid membrane (SLM) exhibiting areas of two different thicknesses are studied: While a standard contact mechanics model (Sneddon) provides two different elastic moduli for these two morphologies, it is shown that Garcia's bottom-effect artifact correction yields a unique value, as expected for an intrinsic material property. Remarkably, it is demonstrated that the ratio between the contact radius (and not only the indentation) and the sample thickness is the key parameter addressing the relevance of the bottom-effect artifact. The experimental results are validated by finite element method simulations providing a solid support to Garcia's theory. The amphiphilic nature of the investigated material is representative of several kinds of lipids, suggesting that the results have far reaching implications for determining the *correct* Young's modulus of SLMs. The generality of Garcia's bottom-effect artifact correction allows its application to every kind of supported soft film.

Mechanobiology aims to understand how biological systems sense, transduce, and respond to mechanical cues and despite a century of history, represents today a crucial research line in the interdisciplinary fields of nanoscience, nanotechnology, and life sciences.^[1,2] In this context, mechanical properties have been recognized as an essential tool for characterizing soft biological matter, such as cells, tissues, and membranes.^[3,4] In the case of cells, a relationship between their elasticity and physiological and pathological state has been established.^[5–7] Accordingly, extensive research has been carried out also on model cell membranes, e.g., supported lipid membranes (SLMs), as manageable and relatively simple platforms that can be analyzed by different surface techniques.^[8] SLMs are reasonably easy to obtain, present 2D order, lateral mobility and they are a relevant tool for the study of lipid lateral interactions, formation of

rafts, interactions between the lipid membrane and proteins, drugs, nanoparticles, ions, etc.^[9–11]

Atomic force microscopy (AFM) has become an invaluable surface characterization technique for SLMs due to its high spatial,^[12] force and time^[13] resolutions achievable even in liquid environments at controlled temperatures. AFM imaging of soft mono and multilayered films has revealed either homogeneous or phase-separated morphologies,^[14–16] accompanied by a comprehensive understanding of molecular interactions among the film components.^[17–19] Molecular and submolecular resolution AFM images of lipid membranes have been obtained by several authors^[20–22] and hydration layers at the water–lipid interface have been investigated by frequency modulation AFM.^[23] Remarkably, AFM allows to go beyond imaging, providing mechanical material properties at the nanoscale.^[24–31] Regarding SLMs, for instance, their nanomechanical properties can be investigated by AFM force-spectroscopy (AFM-FS) “breakthrough experiments” where the (breakthrough) force required to rupture the membrane is measured. This force has been found to be directly related to the lateral interaction between lipid molecules,^[32] hence it is regarded as the fingerprint of the mechanical stability of a SLM in a specific liquid environment.^[33] Additionally, other relevant physical parameters can be extracted from breakthrough experiments including the sample Young's modulus and the adhesion force.^[34]

AFM-FS nanomechanical experiments rely on the acquisition of an array of deflection–displacement curves on the sample to obtain, by means of the calibrated deflection sensitivity and

Dr. S. Chiodini, S. Ruiz-Rincón, Prof. P. Cea
Instituto de Nanociencia de Aragón (INA)
Campus Río Ebro
Universidad de Zaragoza

C/Mariano Esquillor s/n, Zaragoza 50018, Spain
E-mail: schiodini@unizar.es; pilarcea@unizar.es

Dr. S. Chiodini, S. Ruiz-Rincón, Prof. P. Cea
Laboratorio de Microscopias Avanzadas (LMA)
Campus Río Ebro
Universidad de Zaragoza


C/Mariano Esquillor s/n, Zaragoza 50018, Spain

Dr. S. Chiodini, S. Ruiz-Rincón, Dr. S. Martin, Prof. P. Cea
Departamento de Química Física
Facultad de Ciencias
Universidad de Zaragoza
C/Pedro Cerbuna 12, Zaragoza 50009, Spain

Dr. P. D. Garcia
Instituto de Ciencia de Materiales
ICMM-CSIC
Campus de Cantoblanco
C/Sor Juana Inés de la Cruz, 3, Madrid 28049, Spain

Dr. S. Martin, Dr. I. Armenia, Prof. P. Cea
Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón (ICMA)
Universidad de Zaragoza-CSIC
C/Pedro Cerbuna 12, Zaragoza 50009, Spain

Dr. K. Kettelhoit, Prof. D. B. Werz
Technische Universität Braunschweig
Institut für Organische Chemie
Hagenring 30, Braunschweig 38106, Germany

 The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/smll.202000269>.

DOI: 10.1002/smll.202000269

cantilever spring constant, a set of force–indentation curves. These are typically fitted with an appropriate contact mechanics model to obtain the (effective) Young’s modulus of the sample as a best-fit parameter. Several models have been proposed and, among them, Sneddon^[35,36] and Hertz^[37] approaches are the most commonly used. While Sneddon’s theory tackles the general problem of any axisymmetric tip geometry (spherical, paraboloidal, conical, etc.), the Hertz’s theory is more restricted, considering only the case of a paraboloidal tip shape. Remarkably, Hertz’s approach can be considered a very good approximation of a spherical tip in case of small indentations.^[38] These two models are based on three main assumptions:^[38] 1) a *continuum* sample, 2) linearity between stress and strain tensors, and 3) an infinite sample thickness. While the first hypothesis means that the actual discrete (atomistic) nature of the sample does not affect the nanomechanical properties, the second one is crucial to relate the force–indentation curves only to the elastic property of the sample, ruling out any quadratic contribution. The third assumption, instead, considers that the rigid substrate, on which the sample is deposited, is too far from the indentation region to affect the nanomechanical properties of the sample. However, Dimitriadis et al.^[39] have theoretically demonstrated that the contribution to the Young’s modulus of the underlying rigid substrate is in general *not negligible*. Following a *naive* description, when the sample is indented with the AFM tip, the applied force propagates through the *finite* sample thickness until the rigid substrate and bounces back modifying the cantilever deflection. This adds an artifact to the Young’s modulus of the sample, resulting in an overestimation of the real value. Such effect is usually called the *bottom-effect*

artifact.^[40,41] Recently, Garcia and Garcia^[41] extended the bottom-effect theory giving a more general description and providing finite element method (FEM) simulations. An extension of this phenomenon from elastic to viscoelastic samples was also published by the same authors.^[42] However, despite several *theoretical* and *numerical* contributions,^[39–44] direct *experimental* proofs of the bottom-effect artifact and of Garcia’s approach validity are still scarce in literature.^[45]

In this contribution, the existence of the bottom-effect artifact is experimentally demonstrated and the validity of Garcia’s theory to determine the correct sample Young’s modulus, free of the substrate influence, is confirmed by AFM-FS experiments performed on a synthetic glycosphingolipid (GSL) SLM on mica. The GSL was deposited onto mica by the Langmuir–Schaefer (LS) technique resulting in a SLM mainly composed of two-layer and four-layer regions. These two regions modulate in two different ways the bottom-effect artifact allowing to probe, by AFM, a change in the SLM nanomechanical properties. By fitting the force–indentation curves with Sneddon’s formula, indeed, two different Young’s moduli are obtained, depending on the indented film thickness. In contrast, when Garcia’s formula with a fourth-order correction is used, a unique value for the sample Young’s modulus is obtained, restoring it as an intrinsic material property. Finally, FEM simulations are provided showing a good agreement with the experimental force–indentation curves, confirming once again the robustness of Garcia’s bottom-effect theory.

The chemical structure of the amphiphilic molecule used to prepare the SLM is shown in Figure 1a, while the corresponding synthetic protocol is fully reported in Section S1 (Supporting Information).

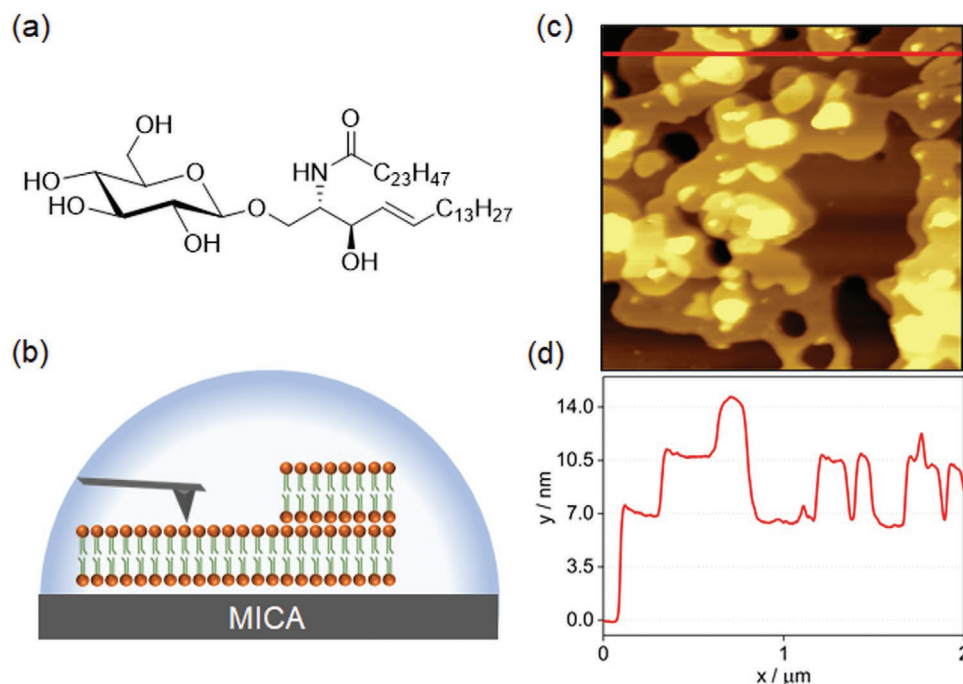


Figure 1. a) Chemical structure of the GSL molecule. b) Illustration of the AFM experiment in a liquid environment. The two main areas, two-layer and four-layer regions, of the GSL SLM can be distinguished. c) Representative AFM image of a $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$ region of the GSL SLM in $10 \times 10^{-3}\ \text{M}$ HEPES, $300 \times 10^{-3}\ \text{M}$ NaCl, and $20 \times 10^{-3}\ \text{M}$ MgCl_2 ($\text{pH} = 7.4$), on a mica substrate. d) Profile corresponding to the red line in (c). Three regions of ≈ 7 , 11, and 14 nm in height can be distinguished, which can be ascribed to two-layer, three-layer, and four-layer regions, respectively.

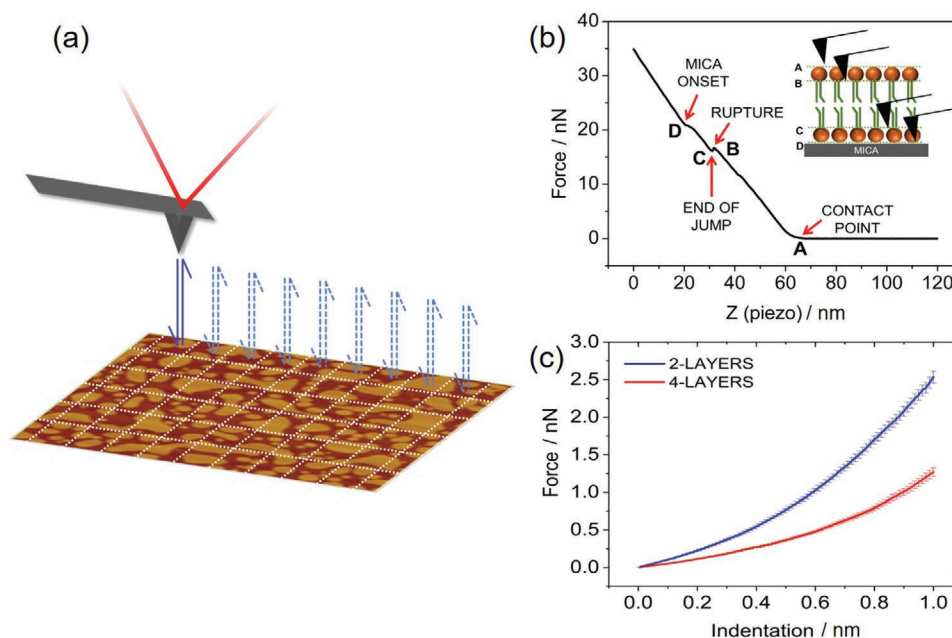


Figure 2. a) Representation of the AFM force-spectroscopy experiment where an array of force–distance curves is performed by approaching and withdrawing the cantilever onto the sample. b) Representative force–distance curve performed on the GSL SLM on mica in a liquid medium. The four main points, from A to D, are highlighted: point A is the contact point, point B provides the breakthrough force, point C the jump, and point D the final contact with the mica substrate. c) Averaged force–indentation curves obtained from the raw experimental data. Blue data correspond to the average of ≈ 180 curves of indentations on two-layer regions (≈ 7 nm) while red data refer to ≈ 60 curves onto four-layer regions (≈ 14 nm).

This compound is a synthetic GSL with a β -D-glucose as a polar head group that favors the anchoring of the molecules on the water subphase by the LS method; additionally, this GLS contains two hydrocarbon chains of different length that provide insolubility in water and favor lateral van der Waals interactions between neighbor molecules that stabilize the Langmuir film. The length of this molecule, assuming a *trans zig-zag* configuration of the alkyl chains was calculated theoretically to be 3.3 nm using the program Spartan08 V 1.0.0. This GSL was selected among a large catalogue of synthetic biomaterials in our laboratory due to its ability to form ordered films with regions of different thicknesses on the substrate (Figure 1b–d).

The SLM was deposited onto a mica substrate by the LS technique, where the substrate is horizontally approached (and then immediately withdrawn) to the water surface in a Langmuir trough containing a GSL monolayer (for further details see Section S2, Supporting Information). As a result, a film exhibiting regions of different thickness was obtained (Figure 1b–d). In order to check that the polar heads of the GSL molecules are exposed to the liquid environment, the hydrophilicity of the film surface was tested by measurements of the contact angle of a drop of water. A value lower than 10° was obtained confirming a high hydrophilicity of the membrane surface (see Section S3, Supporting Information).

Figure 1c shows an AFM image of the GSL SLM obtained in 10×10^{-3} M HEPES, 300×10^{-3} M NaCl, and 20×10^{-3} M MgCl_2 (pH = 7.4). This buffer was chosen on the one hand to mimic physiological conditions and on the other hand to expose the sample to a high ionic strength in order to reduce the

extension of the tip–sample electrostatic interactions. From this image, three main regions with heights of ≈ 7 , 11, and 14 nm (Figure 1c,d) can be distinguished. Taking into account the GSL molecule maximum length (3.3 nm), the membrane regions whose thickness is ≈ 7 , 11, and 14 nm are consistent with two-layer, three-layer, and four-layer patches, respectively. The small difference (about half a nanometer) between the theoretical double of the molecule length (6.6 nm) and the bilayer thickness (≈ 7 nm) could be due to the presence of a thin liquid layer at the mica interface, as reported in literature,^[46–48] or eventually, to an apparent larger sample height caused by electrostatic interactions with the tip.^[49] In the following, only two-layer and four-layer regions will be studied since these are the most relevant for a bottom-effect artifact proof based on different thickness morphologies of the *same* indented material (see later).

To study the nanomechanical properties of the described GSL SLM, an AFM-FS experiment was performed whose procedure is illustrated in Figure 2a.

After immersion of the sample in the liquid media, a $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ AFM image was recorded. An array of $\approx 20 \times 20$ force–distance curves onto the sample was performed by approaching and then withdrawing the cantilever to/from the sample in order to analyze its nanomechanical properties. A representative AFM (approach) force–distance curve obtained on a bilayer region in liquid is provided in Figure 2b (ten additional curves are provided in Figure S15 (Supporting Information)). All these curves show the same shape as the one in Figure 2b). The black line is the set of raw experimental data. Some points are especially noteworthy to describe the AFM-FS curve. Starting from

far, Z (piezo) ≈ 120 nm, a region of no interaction is clearly visible, which corresponds to a negligible tip–sample force. At Z (piezo) ≈ 65 nm, the contact point is reached (point A), and the tip starts to indent the sample resulting in an increase of the recorded force. This increase lasts until the rupture event (point B) occurs, where a jump is visible in the force–distance curve; this event corresponds to the rupture of the GSL polar heads top layer at the solid–liquid interface and the consequent fall of the tip through the soft GSL hydrocarbon chains until the last polar heads in contact with mica are reached (points B and C). Then, the final indentation takes place till the mica is touched by the tip and the onset of the mica contact regime (with zero indentation) can be distinguished (point D). Notably, the Z (piezo) distance between point A and point D is *not* equal to the bilayer thickness, ≈ 7 nm. This is due to the deflection of the cantilever during indentation. To restore the proper GSL bilayer thickness, indeed, a force–indentation plot should be considered.^[50]

Once the force–distance curves were recorded, a customized Nanomechanics Python code (a full description of this code is provided in Section S5, Supporting Information) was used to extract the sample Young's modulus from the experimental force–indentation curves. In this code, a specific contact mechanics model must be selected, together with a proper choice of the contact point (see Section S5c, Supporting Information).^[51] As a first approximation, Sneddon's model for a paraboloidal tip geometry was applied

$$F_{\text{SNEDDON}} = \frac{4}{3} E_{\text{eff}} \sqrt{R} \delta^{3/2} \quad (1)$$

where E_{eff} , R , and δ are the effective Young's modulus, the tip radius, and the indentation, respectively. More specifically, the effective Young's modulus, E_{eff} , reads as

$$\frac{1}{E_{\text{eff}}} = \frac{(1-\nu_t^2)}{E_t} + \frac{(1-\nu_s^2)}{E_s} \quad (2)$$

with ν_t , ν_s , E_t , and E_s equal to the tip Poisson coefficient ($\nu_t = 0.3$), the sample Poisson coefficient ($\nu_s = 0.5$),^[24] the tip Young's modulus ($E_t = 170$ GPa), and the sample Young's modulus, respectively.

Equation (1) relies on two additional assumptions: i) no adhesion between AFM tip and sample and ii) a paraboloidal tip geometry. For our experiments, the first hypothesis holds true, as can be seen in Figure S8 (Supporting Information). Regarding the second assumption, a spherical geometry was initially assumed due to a nominal tip radius between 2 and 12 nm. Notably, in case of small indentations (smaller than the tip radius), the spherical tip geometry can be approximated by a paraboloidal one, a tip shape which will be considered throughout this contribution. Since Sneddon's model does not correct the bottom-effect artifact, it is expected to be sensible to the two thicknesses exhibited by the GSL SLM (Figure 1b), therefore providing two different sample Young's modulus values despite the material being the same.

Recently, Garcia and Garcia^[41] have proposed a complete correction to the bottom-effect artifact which, for the same

paraboloidal tip geometry, yields the following force–indentation contact mechanics expression

$$F_{\text{GARCIA}} = F_{\text{SNEDDON}} \left[1 + \frac{1.133\sqrt{\delta R}}{h} + \frac{1.497\delta R}{h^2} + \frac{1.469\delta R\sqrt{\delta R}}{h^3} + \frac{0.755(\delta R)^2}{h^4} \right] \quad (3)$$

As can be seen, this equation provides a correction to Sneddon's formula, made up of four terms. Remarkably, these terms are a function of the ratio between the contact radius, $(\delta R)^{1/2}$, and the thickness, h , of the indented membrane.

In Figure 2c, the *averaged* force–indentation curves conducted on two-layer and four-layer regions are reported, i.e., 7 nm (blue curve) and 14 nm (red curve) thick layers, respectively. Both curves were truncated at ≈ 1 nm of maximum indentation in order to endorse the paraboloidal tip geometry assumption (as discussed previously) and, at the same time, to avoid any kind of nonlinearity (between stress and strain) related to the breakthrough force event (at ≈ 20 nN, Figure 2b, points B and C and Figure S9, Section S5b, Supporting Information). To this maximum indentation corresponds a maximum strain (indentation/sample thickness) of $\approx 14\%$, therefore less than what is considered the limit for a purely elastic sample, i.e., 20%.^[3] Despite the material being the same, the two curves follow different behaviors, with the blue curve (two-layer regions) presenting higher force values, at the same indentation, with respect to the red curve (four-layer regions). We claim that this observation represents the fingerprint of the bottom-effect artifact, which is more pronounced on the 7 nm thick membrane due to a shorter distance from the mica rigid substrate. Basically, the presence of two-layer and four-layer regions of the same GSL material determines the magnitude of the bottom-effect artifact by changing the propagation length of the applied tip force, from the contact point (Figure 2b, point A), to the underneath mica substrate (Figure 2b, point D).

In Figure 3 a more comprehensive analysis of the bottom-effect artifact is provided for the system under investigation (see panel a). The analysis of the force–indentation curves in order to determine the sample Young's modulus was performed by means of the previously described Nanomechanics Python code where a paraboloidal tip geometry is assumed. Figure 3b shows the sample Young's modulus histograms corresponding to force–indentation curves performed on two-layer regions (blue data) and on four-layer thick regions (red data).

Fitting the force–indentation curves with Sneddon's theory, Equation (1), results in two clearly different Young's moduli since the bottom effect is not considered, which clearly evidences that the presence of the rigid substrate is not negligible. The difference in the Young's modulus value for the two-layer and four-layer regions is (131 ± 16) MPa despite the same nature of the indented sample. Remarkably, the Young's modulus obtained for 7 nm thick regions is higher than the elastic modulus for a 14 nm thick area revealing the fingerprint of the bottom-effect artifact, more pronounced in the case of two-layer regions. In contrast, fitting with Garcia's complete formula (at the fourth-order correction), Equation (3), provides the *same* Young's modulus value (within

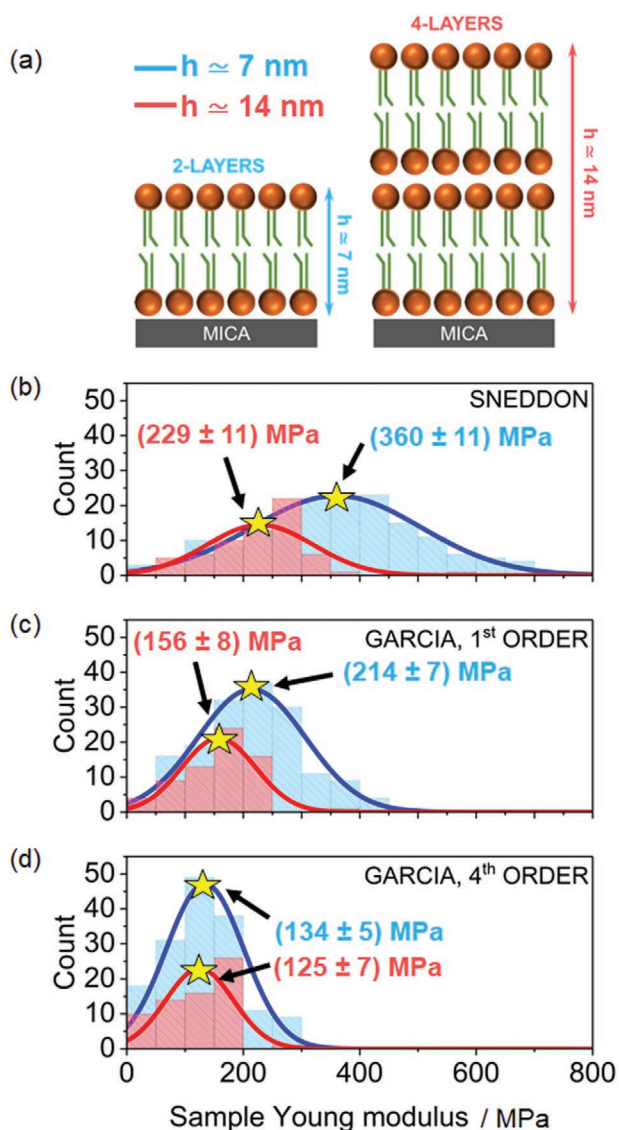


Figure 3. a) Scheme of the system under investigation made up of two-layer regions (height $h \approx 7$ nm) and four-layer regions of GSL (height $h \approx 14$ nm). b) Young's modulus histogram obtained by force-distance curves performed on two-layer (blue data) and four-layer (red data) regions using Sneddon's formula, Equation (1). c) Young's modulus histogram obtained by using Garcia's first-order correction formula, Equation (3). d) Young's modulus histogram obtained with Garcia's fourth-order correction formula, Equation (3). In (b)–(d) the solid blue and red lines are Gaussian fittings of the two-layer and four-layer histograms, respectively, while the yellow stars indicate the histograms mean values. Main parameters used in the simulation (for more information refer to the Supporting Information or the AFM Imaging and Force-Spectroscopy in the Experimental Section): $R = 17$ nm, $k = 0.6878$ N m $^{-1}$, deflection sensitivity $S = 14.46$ nm V $^{-1}$, $\chi^2 = 10$ (see Section S5f, Supporting Information), geometry of the tip: paraboloidal. N (blue data) = 180, N (red data) = 60.

the error bars), ≈ 130 MPa (Figure 3d) for the two-layer and the four-layer regions (Figure 3d). This result is in agreement with the elastic modulus as an intrinsic material property (therefore independent from the sample thickness) and it explicitly shows that the bottom-effect artifact is fully compensated by a fourth-order correction of Garcia's formula. Additionally, this

nanomechanical analysis was performed on three-layer regions, i.e., ≈ 11 nm thick patches, showing results in agreement with Figure 3 main trends (Section S5e, Supporting Information).

The obtained Young's modulus value for the GSL SLM (Figure 3b) is in good agreement with previously reported values for phospholipids molecules ranging from ≈ 30 to 300 MPa^[21,24,27,52] with eventual discrepancies attributable to differences in the chemical structure of the biological material under investigation and to the presence of salts in the buffer.^[21,52]

The statistical analysis of the sample Young's modulus was also performed fitting all the force-indentation curves with Garcia's formula (Equation (3)) but using only the first-order correction. As shown in Figure 3c, the bottom-effect artifact correction truncated at the first order yields two closer values of elastic modulus with respect to the simple approach of Sneddon (here the difference is only 58 MPa) but still does not fully compensate the rigid substrate contribution to the sample Young's modulus. For the second and third-order Garcia's corrections differences of 17 and 15 MPa are obtained, confirming a progressive correction coming from the four terms of Equation (3).

All these experimental results confirm that the use of Garcia's bottom-effect artifact correction is unavoidable for a correct determination of the elastic modulus of soft films supported on a rigid substrate, otherwise the accuracy of the Young's modulus can be highly questionable.

To further test the validity of Figure 3 results, FEM simulations were performed (more details in the Experimental Section); FEM simulations are considered to provide the correct nanomechanical behavior of the material under investigation and have already been demonstrated to be in agreement with Garcia's theory.^[41] Figure 4a shows the interface between the vertical indenting AFM tip, not drawn for clarity, a finite elastic two-layer region (thickness of 7 nm) and the rigid support. For a simulated maximum indentation of 1 nm, the Von Mises^[53] stresses extend through the full thickness of the elastic layer, due to the relative wide contact radius. This propagation of the stress is the cause of the bottom-effect artifact, since it connects mechanically the tip and the substrate. In Figure 4b, the force-indentation curves data obtained by FEM simulations (symbols) are compared with the averaged experimental data (solid line) obtaining a good agreement which also demonstrates the consistency of two of the physical hypotheses discussed in the Introduction: the continuous nature and the linearity of the sample. These two assumptions are explicitly included in the FEM model, but they do not necessarily hold for every material under study. However, the agreement between simulations and experimental results shown in Figure 4b strongly supports their validity.

Nonetheless, a small discrepancy between experimental and FEM data is still present in Figure 4b, mainly in the four-layer case (red data). This error could be due to several reasons: i) the FEM simulations do not take into account any viscosity of the sample since only elastic properties were considered. As already reported in literature, phospholipids do show viscoelastic behaviors^[27,54] therefore addressing the necessity for a more complete mechanical description, ii) the FEM simulations are based on linear elasticity which, as well, could be only a first-order description, neglecting nonlinear contributions, iii) the four-layer experimental curve (red solid line) corresponds

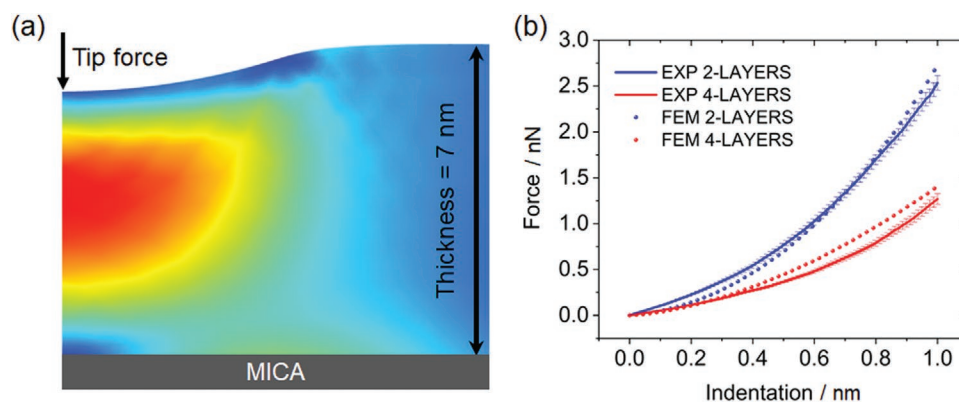


Figure 4. a) Cross section of a FEM simulation of the AFM tip indenting a two-layer region (7 nm). The color map represents the simulated Von Mises stress inside the sample (red: high stress, blue: small stress), due to the vertical force applied by the spherical tip (not shown for clarity). b) Force-indentation curves comparison between FEM simulations (symbols) and averaged experimental data (solid lines), for the two different layer thicknesses (two-layer: blue data (≈ 180 curves), four-layer: red data (≈ 60 curves)).

to the average of ≈ 60 force-indentation curves, i.e., a slightly poor statistics. This could also be a partial reason for a worse four-layer fitting with respect to a two-layer experimental curve which is related to a higher statistic, ≈ 180 curves. As can be appreciated in Figure 1c, indeed, the coverage of four-layer regions is smaller than the coverage of two-layer areas.

Finally, following Equation (3), we stress that the ratio between the *contact radius*, $(\delta \cdot R)^{1/2}$, and the sample thickness h , is the key parameter for the evaluation of the relevance of the bottom-effect artifact for the AFM nanomechanical properties of a supported sample. In the example studied here, due to a maximum indentation of 1 nm and a tip radius of 17 nm (see Section S6 and also Section S7, Supporting Information, with scanning electron microscopy (SEM) images of the tip), the ratio between the contact radius and the sample thickness is ≈ 0.5 , which fully addresses a relevant bottom-effect artifact. This conclusion is also supported by the simulation provided in Figure 4a, where the vertical dimension of the red region (high-stress zone) is in the same order of magnitude than the contact radius. As the stresses are a kind of mechanical connection between the tip and the sample, also this observation addresses a relevant bottom-effect artifact. Hence, these results indicate that the accepted rule—of a maximum indentation less than 10–20% of the sample thickness to be enough for a negligible bottom-effect artifact—cannot be generally applied.

This contribution provides an AFM force-spectroscopy experimental proof of the existence of the so-called bottom-effect artifact for the elastic Young's modulus determination of a supported lipid membrane. In particular, a glycosphingolipid sample exhibiting regions of different thicknesses onto a rigid mica substrate was obtained by the Langmuir-Schaefer technique and its mechanical properties analyzed. The application of a standard contact mechanics model such as Sneddon's theory yields a thickness-dependent value for the Young's modulus due to a modulation of the bottom-effect artifact by the varying thickness of the sample. Remarkably, the results here provided strongly support the validity of Garcia's correction to the bottom-effect artifact, which is experimentally demonstrated to be able to restore (at the fourth correction order) a sample Young's modulus as an intrinsic material property, i.e.,

a Young's modulus value independent from the thickness of the film and not perturbed by the presence of a rigid substrate. These observations are validated by FEM simulations.

Moreover, it is shown that indenting not more than 10–20% of the sample thickness (in this case ≈ 1 nm) *does not* ensure that the nanomechanical contribution of the rigid substrate is negligible. Indeed, the crucial parameter to determine whether the bottom-effect artifact is relevant, is the ratio between the *contact radius* (and not the pure indentation) and the sample thickness.

The amphiphilic chemical structure of the material investigated here is representative of several kinds of biological materials, therefore paving the way for future determinations of the *correct* Young's modulus of supported lipid membranes. Due to the generality of Garcia's bottom-effect correction theory, we foresee applications to every kind of supported soft sample fields, from (ultra-) thin film technologies to mechanobiology, where the measured apparent elastic modulus of a cell can strongly depend on the location of the indentation. Nonetheless, we consider our approach to the bottom-effect artifact/correction to be valid only inside the AFM community and not the whole nanomechanics field for which additional experiments are needed.

Experimental Section

AFM Imaging and Force-Spectroscopy: AFM measurements were performed at room temperature, about 25 °C, using a Multimode 8 (Bruker) AFM microscope. SCANASYST FLUID+ (Bruker) cantilevers were used both for topography and nanomechanical measurements in a liquid environment, namely, 10×10^{-3} M HEPES, 300×10^{-3} M NaCl, and 20×10^{-3} M $MgCl_2$ (pH = 7.4). The cantilevers were used as received for the AFM imaging and nanomechanical experiments. To avoid damaging the tip, the calibration procedures^[55] were performed at the end of the AFM-FS experiment. The deflection sensitivity S was obtained by performing ten force-distance curves on mica (in the same liquid environment and without changing the laser spot position onto the cantilever) and calculating the average inverse slope of the contact region. The cantilevers spring constant (≈ 0.7 N m^{-1}) was then obtained (in liquid as well) using the standard thermal tune method.^[55]

The used cantilever has a nominal cantilever bending angle smaller than 2°, therefore no trigonometrical correction was applied to the force

calculations and to the FEM simulations where a vertical indenting tip was used.

The breakthrough force experiments were carried out following the AFM-FS method. After recording a $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ topographical image, on the same scanned region, an array of 20×20 points was selected, resulting in a distance between close pixels of 100 nm, much bigger than twice the measured tip radius ($R = 17$ nm) to avoid breakthrough holes overlapping. Force–distance curves were recorded by approaching and retracting the cantilever tip to the sample (for about 150 nm) at a constant speed ($1 \mu\text{m s}^{-1}$), with 1024 pixels in the vertical direction and about 4 V as a deflection set-point. All the AFM images were obtained in tapping mode at about 1 Hz of scan rate. These were all equally postprocessed with Gwyddion^[56] by means of a plane flattening, a second-order polynomial flattening in x and y , plus a median of difference rows alignment.

As described in Section S6 (Supporting Information), the tip radius R was measured before and after the official bottom-effect experiment, using a commercial polystyrene and polyolefin elastomer (ethylene-octene copolymer) PS-LDPE test sample (Bruker) with a known Young's modulus. The average result was $R = (17 \pm 2)$ nm.

FEM Simulations: The numerical simulations of the indentation were performed with commercial FEM software (COMSOL Multiphysics, COMSOL AB, Stockholm, Sweden). The indenter was a rigid sphere ($R = 17$ nm), and the material model used for it was an elastic material (linear, isotropic, and homogeneous, $E = 170$ GPa). The sample was also simulated as an elastic material (linear, isotropic, and homogeneous with a Young's modulus $E = 130$ MPa). This value was taken as the average between the two mean elastic modulus values present in Figure 3d, i.e., 134 and 125 MPa). The lateral size of the sample (100 nm) was large enough to prevent lateral boundary effects, and two different thickness were simulated ($h_1 = 7$ nm and $h_2 = 14$ nm). The bottom of the sample was fixed to a rigid substrate. The tip was moved perpendicular to the sample surface, up to a maximum indentation of 1 nm.

The mesh parameters were refined until a convergence in the solutions was obtained. This final converged mesh was graded to be more refined close to the indenter and in the surroundings of the tip contact point (0.01 nm) and coarser at the edges of the sample (up to 0.1 nm). The simulations were performed assuming a frictionless contact between the tip and the sample.

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements

S.R.-R. and P.D.G. contributed equally to this work. S.C., S.M., and P.C. are grateful for financial assistance from the European MagicCellGene Project (M-ERA.NET COFUND call 2016, Ministerio de Economía y Competitividad from Spain in the framework of project PCIN-2017-127). P.C. and S.M. also acknowledge support from DGA and Fondos FEDER for funding Platon research group (E31_17R). K.K. and D.B.W. are grateful to the German Science Foundation (SFB 803, project A05) for financial support. The authors acknowledge Javier Idiago for providing the AFM HEPES buffer. The authors are also indebted to Prof. Ricardo Garcia for useful discussions and Prof. Luca Costa for the Python code that was used and expanded in this work.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords

AFM force-spectroscopy, AFM nanomechanics, bottom-effect artifact, mechanobiology, supported lipid membranes

Received: January 14, 2020

Revised: June 4, 2020

Published online:

- [1] P. Roca-Cusachs, V. Conte, X. Trepast, *Nat. Cell Biol.* **2017**, *19*, 742.
- [2] E. K. Paluch, C. M. Nelson, N. Biais, B. Fabry, J. Moeller, B. L. Pruitt, C. Wollnik, G. Kudryasheva, F. Rehfeldt, W. Federle, *BMC Biol.* **2015**, *13*, 47.
- [3] M. Krieg, G. Fläschner, D. Alsteens, B. M. Gaub, W. H. Roos, G. J. L. Wuite, H. E. Gaub, C. Gerber, Y. F. Dufrêne, D. J. Müller, *Nat. Rev. Phys.* **2019**, *1*, 41.
- [4] N. Mandriota, C. Friedsam, J. A. Jones-Molina, K. V. Tatem, D. E. Ingber, O. Sahin, *Nat. Mater.* **2019**, *18*, 1071.
- [5] M. Lekka, P. Laidler, D. Gil, J. Lekki, Z. Stachura, A. Z. Hryniewicz, *Eur. Biophys. J.* **1999**, *28*, 312.
- [6] A. Fuhrmann, J. R. Staunton, V. Nandakumar, N. Banyai, P. C. W. Davies, R. Ros, *Phys. Biol.* **2011**, *8*, 015007.
- [7] M. Plodinec, M. Loparic, C. A. Monnier, E. C. Obermann, R. Zanetti-Dallenbach, P. Oertle, J. T. Hyotyla, U. Aebi, M. Bentires-Alj, R. Y. H. Lim, C.-A. Schoenenberger, *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7*, 757.
- [8] B. Gumí-Audenis, L. Costa, L. Redondo-Morata, P.-E. Milhiet, F. Sanz, R. Felici, M. I. Giannotti, F. Carlà, *Nanoscale* **2018**, *10*, 87.
- [9] B. Gumí-Audenis, M. I. Giannotti, in *Biomimetic Lipid Membranes: Fundamentals, Applications, and Commercialization* (Eds: F. N. Kök, A. A. Yildiz, F. Inci), Springer International Publishing, Cham, Switzerland **2019**, pp. 1–27.
- [10] Y. Roiter, M. Ornatska, A. R. Rammohan, J. Balakrishnan, D. R. Heine, S. Minko, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 941.
- [11] K. Lee, L. Zhang, Y. Yi, X. Wang, Y. Yu, *ACS Nano* **2018**, *12*, 3646.
- [12] S. Chiodini, D. Reinares-Fisac, F. M. Espinosa, E. Gutiérrez-Puebla, A. Monge, F. Gándara, R. García, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 11088.
- [13] F. Zuttion, L. Redondo-Morata, A. Marchesi, I. Casuso, in *Nanoscale Imaging: Methods and Protocols* (Ed: Y. Lyubchenko), Springer, New York **2018**, p. 181.
- [14] M. Haro, B. Giner, C. Lafuente, M. C. López, F. M. Royo, P. Cea, *Langmuir* **2005**, *21*, 2796.
- [15] A. Villares, S. Martín, I. Giner, J. Díaz, D. P. Lydon, P. J. Low, P. Cea, *Soft Matter* **2008**, *4*, 1508.
- [16] S. Ruiz-Rincón, A. González-Orive, J. M. de la Fuente, P. Cea, *Langmuir* **2017**, *33*, 7538.
- [17] B. Gumí-Audenis, F. Sanz, M. I. Giannotti, *Soft Matter* **2015**, *11*, 5447.
- [18] B. Gumí-Audenis, L. Costa, F. Carlà, F. Comin, F. Sanz, I. M. Giannotti, *Membranes* **2016**, *6*, 58.
- [19] L. Redondo-Morata, M. I. Giannotti, F. Sanz, *Langmuir* **2012**, *28*, 12851.
- [20] H. Asakawa, T. Fukuma, *Nanotechnology* **2009**, *20*, 264008.
- [21] W. Trewby, J. Faraudo, K. Voitchovsky, *Nanoscale* **2019**, *11*, 4376.
- [22] T. Fukuma, M. J. Higgins, S. P. Jarvis, *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *98*, 106101.
- [23] T. Fukuma, M. J. Higgins, S. P. Jarvis, *Biophys. J.* **2007**, *92*, 3603.
- [24] L. Picas, F. Rico, S. Scheuring, *Biophys. J.* **2012**, *102*, L01.
- [25] C. A. Amo, A. P. Perrino, A. F. Payam, R. Garcia, *ACS Nano* **2017**, *11*, 8650.
- [26] M. Kocun, A. Labuda, W. Meinhold, I. Revenko, R. Proksch, *ACS Nano* **2017**, *11*, 10097.
- [27] Z. Al-Rekabi, S. Contera, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 2658.
- [28] J. Rother, H. Nöding, I. Mey, A. Janshoff, *Open Biol.* **2014**, *4*, 140046.

- [29] Z. Ma, H. Wen, H. Guo, J. Tang, J. Liu, Y. Li, Y. Sugawara, *Coatings* **2020**, *10*.
- [30] W. Park, S. Müller, R.-P. Baumann, S. Becker, B. Hwang, *Appl. Surf. Sci.* **2020**, *507*, 145041.
- [31] M. Lee, R. K. R. Reddi, J. Choi, J. Liu, X. Huang, H. Cho, J.-H. Kim, *ACS Appl. Energy Mater.* **2020**, *3*, 1899.
- [32] Y. F. Dufrêne, T. Boland, J. W. Schneider, W. R. Barger, G. U. Lee, *Faraday Discuss.* **1999**, *111*, 79.
- [33] S. Garcia-Manyes, F. Sanz, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2010**, *1798*, 741.
- [34] J. K. Li, R. M. A. Sullan, S. Zou, *Langmuir* **2011**, *27*, 1308.
- [35] I. N. Sneddon, *Int. J. Eng. Sci.* **1965**, *3*, 47.
- [36] J. W. Harding, I. N. Sneddon, *Math. Proc. Cambridge Philos. Soc.* **1945**, *41*, 16.
- [37] H. Hertz, *J. Reine Angew. Math.* **1882**, *1882*, 156.
- [38] L. V. Popov, M. Heb, E. Willert, *Handbook of Contact Mechanics: Exact Solutions of Axisymmetric Contact Problems*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg **2019**.
- [39] E. K. Dimitriadis, F. Horkay, J. Maresca, B. Kachar, R. S. Chadwick, *Biophys. J.* **2002**, *82*, 2798.
- [40] N. Gavara, R. S. Chadwick, *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7*, 733.
- [41] P. D. Garcia, R. Garcia, *Biophys. J.* **2018**, *114*, 2923.
- [42] P. D. Garcia, R. Garcia, *Nanoscale* **2018**, *10*, 19799.
- [43] B. L. Doss, K. R. Eliato, K.-H. Lin, R. Ros, *Soft Matter* **2019**, *15*, 1776.
- [44] A. P. Perrino, R. Garcia, *Nanoscale* **2016**, *8*, 9151.
- [45] L. Li, P. Zhang, J. Li, Y. Wang, Y. Wei, J. Hu, X. Zhou, B. Xu, B. Li, *Nanoscale* **2019**, *11*, 4707.
- [46] R. Tero, *Materials* **2012**, *5*, 2658.
- [47] R. P. Richter, A. R. Brisson, *Biophys. J.* **2005**, *88*, 3422.
- [48] S. J. Johnson, T. M. Bayerl, D. C. McDermott, G. W. Adam, A. R. Rennie, R. K. Thomas, E. Sackmann, *Biophys. J.* **1991**, *59*, 289.
- [49] D. J. Müller, A. Engel, *Biophys. J.* **1997**, *73*, 1633.
- [50] L. Redondo-Morata, M. I. Giannotti, F. Sanz, *Mol. Membr. Biol.* **2014**, *31*, 17.
- [51] N. Gavara, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 21267.
- [52] K. Voitchovsky, S. A. Contera, M. Kamihira, A. Watts, J. F. Ryan, *Biophys. J.* **2006**, *90*, 2075.
- [53] S. Timoshenko, *Strength of Materials. Part 1. Elementary Theory and Problems*, Van Nostrand Reinhold, New York **1980**.
- [54] G. Espinosa, I. López-Montero, F. Monroy, D. Langevin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 6008.
- [55] H. Schillers, C. Rianna, J. Schäpe, T. Luque, H. Doschke, M. Wälte, J. J. Uriarte, N. Campillo, G. P. A. Michanetzis, J. Bobrowska, A. Dumitru, E. T. Herruzo, S. Bovio, P. Parot, M. Galluzzi, A. Podestà, L. Puricelli, S. Scheuring, Y. Missirlis, R. Garcia, M. Odorico, J.-M. Teulon, F. Lafont, M. Lekka, F. Rico, A. Rigato, J.-L. Pellequer, H. Oberleithner, D. Navajas, M. Radmacher, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 5117.
- [56] Gwyddion, www.gwyddion.net (accessed: August 2019).