



**Universidad de Valladolid**

Facultad de Ciencias



## **TRABAJO FIN DE MÁSTER**

Máster en Física

**Estudio de la interacción de nanopartículas autoensambladas basadas  
en un ELR anfifílico positivo con modelos de membranas biológicas**

*Autora: Paula Gironés Payá*

*Tutores: Israel González De Torre y J. Carlos Rodríguez-Cabello*

---

# Estudio de la interacción de nanopartículas autoensambladas basadas en un ELR anfílico positivo con modelos de membranas biológicas

Paula Gironés Payá,<sup>a</sup> Israel González De Torre,<sup>b</sup> J. Carlos Rodríguez-Cabello,<sup>c</sup>

15 de Julio del 2021

Las interacciones de biomateriales con membranas biológicas son importantes en aplicaciones como la liberación de fármacos. En este estudio se ha investigado la interacción de nanopartículas de un recombinámero tipo elastina (ELR) cargado positivamente con dos modelos de membrana de Langmuir, superficies funcionalizadas con lípido y fosfolípido. Este es un polímero anfílico con diseño dibloque, que se ha caracterizado con la temperatura de transición de autoensamblado, tamaño y carga mediante turbidimetría, DLS (dynamic light scattering) y potencial Z. Para estudiar la interacción, se ha hecho uso de técnicas como la microbalanza de cuarzo con disipación (QCM-D) combinada con el elipsómetro, para determinar propiedades como el espesor, la masa, el módulo elástico y la viscosidad, así como el microscopio de fuerza atómica (AFM) para estudiar la capa de ELR depositada. Además se realizó el ángulo de contacto para determinar la hidrofobicidad en cada caso. Como resultado de este estudio, se demostró que el polímero KI interactúa más eficazmente y forma capas más rígidas, con superficies fosfolipídicas que con las lipídicas.

**Palabras clave:** Recombinámero tipo elastina (ELR), autoensamblado, modelo Langmuir, membrana lipídica, membrana fosfolipídica.

## 1. Introducción

Las membranas biológicas son barreras que separan el interior de las células del medio extracelular y constituyen parte de la estructura interna en células, bacterias y virus<sup>1,2</sup>. Separar los medios es la principal función, aunque también actúa como barrera permeable selectiva<sup>3</sup>, controla el transporte de proteínas o solutos dentro y fuera de la célula, y se comunica con el entorno exterior uniéndose a señales o estímulos a través de los receptores de la membrana de la superficie celular<sup>1</sup>.

La membrana biológica está compuesta por diferentes tipos de lípidos (principalmente fosfolípidos, esfingolípidos y esteroides) y proteínas<sup>4</sup>. Los fosfolípidos son anfílicos, es decir, contienen una parte hidrofílica, que apunta al medio acuoso y otra hidrofóbica, que hace que los lípidos se encuentren más estables en un ambiente lipídico. Esto da lugar a bicapas lipídicas. Cuando se colocan en agua, los lípidos formarán espontáneamente liposomas, con agua por dentro y por fuera, ya que esta es la configuración más estable.<sup>5,2,6</sup>

La complejidad de la estructura de las membranas biológicas ha empujado a los investigadores a proponer modelos más simples que puedan predecir y explicar el comportamiento de las membranas celulares cuando interactúan con nanopartículas, y de esta manera desarrollar sistemas eficaces de administración de fármacos<sup>7</sup>. Existen tres tipos de modelos de membrana basados en

lípidos: la monocapa de Langmuir, liposomas y bicapas lipídicas soportadas<sup>7</sup>. El más simple para estudiar la membrana biológica es el sistema de monocapa de lípidos de Langmuir. Estas simulan la mitad de la membrana (monocapa en vez de bicapa), por tanto son adecuados para imitar los procesos en las superficies de las membranas. Además se puede variar fácilmente la composición de los lípidos y su densidad<sup>8</sup>.

En cuanto a las nanopartículas, se trata de ELR. Son polipéptidos modificados genéticamente basados en la secuencia de elastina VPGXGn [*valina – prolina – glicina – X – glicina*]<sub>n</sub>, donde X es cualquiera de los 20 aminoácidos excepto la prolina y n el número de repeticiones<sup>9,10</sup>. La elastina es una proteína fundamental para la elasticidad y resistencia de los tejidos que se encuentra en la matriz extracelular, precursora de la tropoelastina<sup>11</sup>. Como esta no es fácilmente sintetizable, fue necesario buscar derivados de forma recombinante e inspirado en la elastina natural. Las secuencias de las que hemos hablado se pueden alterar modificando el DNA mediante métodos de recombinación genética<sup>12</sup>. Estos métodos tuvieron gran éxito en la fabricación de biomateriales para aplicaciones en el campo de la biomedicina, siendo las principales la liberación de fármacos<sup>13,14</sup>, y regeneración o reparación de tejidos<sup>15,16</sup>.

El objetivo de este trabajo es estudiar el comportamiento de las nanopartículas de ELR cargadas positivamente cuando interactúan con superficies que simulan la membrana biológica más o menos hidrofóbicas. Para ello se ha usado diferentes técnicas (Dynamic light scattering, potencial Z, ángulo de contacto, turbidimetría, microbalanza de cuarzo con disipación, elipsometría y la microscopía de fuerza atómica), tanto para ca-

---

<sup>a</sup> Universidad de Valladolid, España. E-Mail: paula\_girones@hotmail.com

<sup>b</sup> Universidad de Valladolid, España. Director del Trabajo Fin de Máster. E-Mail: igonzalez@bioforge.uva.es,

<sup>c</sup> Universidad de Valladolid, España. Director del Trabajo Fin de Máster. Director de Bioforge. E-Mail: roca@bioforge.uva.es

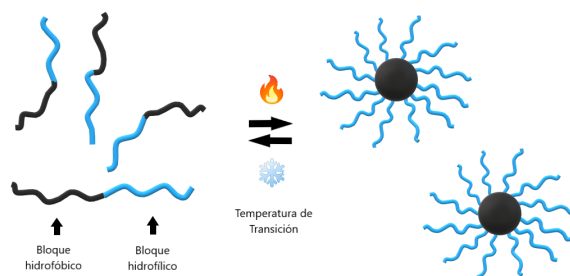
racterizar el polímero dibloque KI, como para estudiar su interacción con el modelo de monocapa de Langmuir cuyas superficies utilizadas han sido de oro, funcionalizadas con lípido y fosfolípido, aprovechando el enlace covalente que se forma entre el grupo tiol (SH) del lípido y fosfolípido con el oro.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1. Recombinámico tipo elastina

Se ha usado el polímero dibloque KI, sintetizado mediante técnicas recombinantes en el grupo de investigación Bioforge.<sup>17</sup> La secuencia relevante del KI es  $(VPGKG)_{48}(VPGIG)_{60}$ , donde V=Valina, P=Prolina, G=Glicina, K=Lisina, I=Isoleucina. Se trata de un polímero anfifílico, formado por una parte hidrofóbica neutra y otra hidrofílica, dominado por la lisina, y por tanto, cargado positivamente.

Estos polímeros se autoensamblan en micelas esféricas una vez alcanzada la temperatura de transición del bloque hidrofóbico. De esta manera se forma un núcleo hidrofóbico, mientras los bloques hidrofílicos forman la corona y permanecen hidratados (Figura 1).



**Fig. 1** Representación esquemática del autoensamblado en micelas de los copolímeros dibloque anfifílicos

Los bloques hidrofílicos tienen una temperatura de transición más alta, que si se alcanza se vuelven insolubles y forman de esta manera agregados junto a los bloques hidrofóbicos<sup>18</sup>.

### 2.2. Otros reactivos

1-Undecanotiol (lípido), ácido 11-mercaptopundecifosfórico (fosfolípido), N,N-Dimetilformamida (DMF) y dimetilsulfóxido (DMSO).

### 2.3. Preparación del polímero

Se usó PBS 1x (tampón fosfato salino) para disolver el polímero, simulando de esta manera el medio fisiológico. Inicialmente lo teníamos en una concentración 10x, por lo que la diluimos con agua destilada. Disolvimos el

polímero KI en PBS 1x a una concentración de 1mg/mL durante, al menos, 12 horas. Una vez disuelto, se filtró en frío con un filtro de  $0,2\mu\text{m}$ . Estas soluciones se mantuvieron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante una hora, antes de realizar los experimentos del DLS, el potencial Z, la microbalanza de cuarzo con disipación y el elipsómetro.

Para la turbidimetría procedimos de la misma manera, pero con una concentración 5mg/mL, sin filtrar y manteniendo la solución en frío hasta el momento de su uso.

### 2.4. Turbidimetría

Para la caracterización de la temperatura de transición se usó el espectrofotómetro UV-Visible (Cary Series UV-Vis, Agilent Technologies). Mide la intensidad de la luz después de pasar a través del medio dispersivo y la compara con la intensidad de la luz inicial, monitorizando la absorbancia, la cual aumenta al transicionar el polímero. La temperatura de transición se define como el punto de inflexión de la curva obtenida. Se introdujo dos cubetas de poliestireno, una con la solución y otra con PBS 1x que se usó como background, y se hizo un barrido de temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  a  $60^{\circ}\text{C}$  con un ratio de  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , con una longitud de onda de 350nm. Se realizó el promedio de tres muestras diferentes.

### 2.5. DLS (Dynamic light scattering) y Potencial-Z

Las medidas del DLS y potencial Z<sup>19</sup> se tomaron con el Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments) equipado con un láser de He-Ne con una longitud de onda de 633nm.

**DLS.** Para estas medidas, las muestras se introdujeron en cubetas de poliestireno y se dejaron estabilizar durante 5 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . La medición de DLS se realizó mediante la dispersión de luz cuasi elástica. En estas se mide el movimiento Browniano de las partículas y genera funciones de correlación para obtener el índice de polidispersidad y la distribución de tamaño. Los valores se obtuvieron como la media de 3 repeticiones que ofrece cada medida.

**Potencial-Z.** La muestra se insertó en cubetas con electrodos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se utilizó la dispersión de luz de análisis de fase para calcular el potencial Z. Los valores de este potencial se determinaron usando las ecuaciones de Smolukowski, que relacionan la movilidad iónica con la carga superficial. Los valores se sacaron como la media de 10 repeticiones.

Se usaron 3 muestras diferentes en cada caso.

### 2.6. Limpieza y activación de superficies

Las superficies AT-cut 5 MHz, cristales de cuarzo recubiertos de oro (Biolin Scientific, usado como sensores para QCM-D), se trataron con el Limpiador de Plasma (Sterilizer PDC-002, Harrick Scientific Corporation,

USA) usando plasma de argón durante 10 minutos a alta potencia (30 W) para limpiarlas antes de la funcionalización.

## 2.7. Funcionalización de superficies

Una vez terminada la limpieza de las superficies, estas se dejaron inmersas en soluciones de lípido y fosfolípido con DMF y DMSO respectivamente, a una concentración 1mg/mL durante mínimo 24 horas para obtener monocapas de estas moléculas<sup>2</sup>. A continuación, las superficies se lavaron con DMF/DMSO, etanol y milli-Q por duplicados y durante 10 minutos cada una para eliminar los restos de reactivos que no se adhirieron a la superficie. Finalmente, se dejaron secar en una estufa a 37°C durante toda la noche.

## 2.8. Microbalanza de Cuarzo con Disipación (QCM-D)

Esta técnica se basa en la oscilación de un cristal de cuarzo piezoeléctrico en su frecuencia de resonancia cuando se aplica un campo eléctrico alterno, y registra variaciones de frecuencia y disipación hasta el armónico 13, para detectar adsorción y desorción de masa en el rango de nanogramos<sup>20</sup>, así como las propiedades mecánicas de la capa.

Se utilizó un equipo Q-Sense Explorer System (Biolin Scientific, Suecia). Se utilizaron sensores piezoeléctricos de cuarzo recubiertos de oro con una frecuencia de resonancia de 5MHz, espesor de 0,3 mm y diámetro de 14 mm, previamente funcionalizados con 1-undecanotiol (lípido) y ácido 11-mercaptoundecilfosfórico (fosfolípido) como sustratos para realizar las medidas de QCM-D.

Dado que se usó PBS 1x como disolvente en la solución del ELR, se inyectó un flujo de este para definir una línea de base estable, seguido del flujo de la solución ELR a una concentración de 1mg/mL durante unos 30 minutos. El evento final correspondió a un lavado con PBS 1x durante unos 20 minutos. Las mediciones se llevaron a cabo a 37°C y se realizaron tres repeticiones para la superficie lipídica y tres más para la fosfolipídica. Para suministrar el caudal de 20 µL/min del flujo correspondiente en cada evento, se usó una bomba peristáltica.

Los datos experimentales de QCM-D se describieron numéricamente por el modelo Broadfit, basado en modelo de Voigt<sup>21</sup>, a causa de las disipaciones elevadas y de que no existe solapamiento de los armónicos de las frecuencias<sup>22</sup>. El modelo está implementado en el software de Biolin Scientific (Q-Sense Dfind), con una calidad del ajuste determinada por el parámetro  $\chi^2$  (valores menores de  $\chi^2$  indican un mejor ajuste), y solo se consideraron las medidas con un valor de  $\chi^2$  menor a 20.

## 2.9. Ángulo de contacto

Las medidas del ángulo de contacto se realizaron utilizando el método de gota sésil con un instrumento del sistema Data Physics OCA20. Las imágenes del perfil de la gota durante la dispensación de la microjeringa se registraron utilizando una cámara de vídeo CCD adaptada. Se depositó 3 gotas de agua ultrapura (MilliQ) en distintos lugares de la superficie y se midió el ángulo de contacto para determinar su hidrofobicidad.

Esta técnica se realizó en las superficies en tres ocasiones. Después de la limpieza con plasma, una vez funcionalizados con lípido y fosfolípido y después de usar la QCM-D, con la solución de polímero depositada.

## 2.10. Elipsometría

La elipsometría<sup>23</sup> se trata de un método óptico en el cual queda registrado el cambio de polarización de la luz polarizada elípticamente cuando se refleja en la superficie de una muestra<sup>24</sup>. Con esto, se proporciona información sobre las constantes ópticas, como es el índice de refracción y el espesor óptico.

Todos los experimentos se realizaron utilizando un elipsómetro espectroscópico (Horiba Jobin YVON UVI-SEL™, Kyoto, Japón) en condiciones "secas": las muestras se midieron a temperatura ambiente después de secarlas con una corriente de nitrógeno. Las medidas elipsométricas se realizaron directamente en la base vertical del elipsómetro. El área de la muestra en la que se registró la información de elipsometría medía aproximadamente 2-3 mm<sup>2</sup>. En todos los experimentos, la variación de los ángulos elipsométricos ( $\psi$  y  $\Delta$ ) se determinó en un ángulo de incidencia de 70° y la exploración espectroscópica se obtuvo en el rango de 300-800 nm (en pasos de 2,5 nm).

Se realizó un modelado de la estructura general con el fin de obtener el espesor seco de la capa ELR numéricamente. Esto requiere el modelado secuencial de cada una de las capas que componen toda la estructura. Por lo tanto, nuestro modelo consta de un sustrato de dos capas (capa de Au recubierta con una capa de lípido o fosfolípido) y una capa de ELR encima de estas. Para ello se necesitó explorar la capa de oro, después la de oro con el lípido/fosfolípido y finalmente toda la estructura.

Primero, el modelo de dispersión utilizado para modelar la capa de Au fue un modelo de Drude cuya permitividad es:

$$\epsilon_{Drude} = \epsilon_{\infty} - \frac{\omega_p^2}{-\omega^2 + i\Gamma_p\omega} \quad (1)$$

Con  $\epsilon_{\infty}$  la permitividad eléctrica a alta frecuencia, y  $\omega_p$  y  $\Gamma_p$  la frecuencia y la frecuencia de colisión de la conducción libre y de no interacción de electrones del metal (plasma). El grosor ajustado numéricamente coincide con el grosor proporcionado por Biolin Scientific (alrededor de 100 nm) para la película delgada de Au que recubre el sensor QCM-D.

A continuación, se modeló la capa de lípidos/fosfolípidos depositada considerando el conjunto de tres osciladores de Lorentz desacoplados<sup>25</sup>:

$$\epsilon_{Lorentz} = \epsilon_{\infty} + \sum_{k=1}^3 \frac{f_k \omega_{0k}^2}{(\omega_{ok}^2 - \omega^2) + i\gamma_k \omega} \quad (2)$$

Donde  $f_k$ ,  $\omega_{0k}^2$  y  $\gamma_k$  son la fuerza del oscilador, la frecuencia de resonancia y ancho (factor de amortiguación relacionado con la disipación de energía), respectivamente. Cada oscilador de Lorentz tiene en cuenta una banda de absorción vibratoria individual para considerar todos los detalles espectrales observados en el rango de longitudes de onda barridas. Para considerar la rugosidad de esta capa, se incluyó una subcapa consistente en un modelo de aproximación del medio efectivo (EMA)<sup>26</sup>, introduciendo el porcentaje de espacio vacío como parámetro ajustable.

Finalmente, la capa más externa (ELR) se modeló considerando nuevamente la serie de tres osciladores de Lorentz. La calidad del ajuste se evaluó mediante la figura de mérito  $\chi^2$ . En este trabajo, todos los ajustes tenían  $\chi^2 < 1,5$ . Los modelos y simulaciones numéricas se realizaron con el software DeltaPsi2 (de Horiba Scientific).

Se midieron tres muestras diferentes para cada condición y se escanearon al menos tres puntos diferentes en cada muestra.

### 2.11. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Las medidas de AFM<sup>27</sup> se realizaron usando un di-MultiMode™ V de Veeco Instruments - Nanoscope V. Las imágenes se tomaron en modo tapping usando un TESPA-V2, sondas de silicio afiliadas (sondas Bruker AFM). Detalles de la punta: Geometría: Estándar (empinada), Altura de la punta (h): 10-15  $\mu m$ , Ángulo frontal (FA):  $25 \pm 2,5^\circ$ , Ángulo posterior (BA):  $17,5 \pm 2,5^\circ$ , Ángulo lateral (SA):  $20 \pm 2,5^\circ$ , Radio de la punta (nom.): 7 nm, Radio de la punta (máx.): 10 nm, Punta SetBack (TSB) (nom.): 13,5  $\mu m$ , Punta SetBack (TSB) (RNG): 11,5 - 15  $\mu m$ .

El área de escaneo fue de 10  $\mu m \times 10 \mu m$  y se evaluó la rugosidad de la raíz cuadrada media (RMS) de las superficies para regiones de 1  $\mu m \times 1 \mu m$  y 5  $\mu m \times 5 \mu m$ , con una resolución de escaneo de 256 líneas/área. La rugosidad de la superficie cuantifica las variaciones verticales de una superficie real a partir de su forma ideal. Uno de los parámetros más comunes que se utilizan para describir el grado de rugosidad de una superficie es la rugosidad cuadrática media (RMS), que se define como:

$$R_q = \sqrt{\frac{\sum(Z_i)^2}{N}} \quad (3)$$

Donde  $Z_i$  es el valor actual de  $Z$ , y  $N$  es el número de puntos dentro de la región. Este valor no se corrige por la inclinación en el plano de los datos, por lo tanto, el ajuste plano o el aplanamiento de los datos cambia este valor.

De tres muestras que teníamos para cada condición, es decir, el sustrato de oro, el del lípido y fosfolípido y estas mismas con el KI depositado, se tomó una imagen por cada una, para determinar la rugosidad superficial.

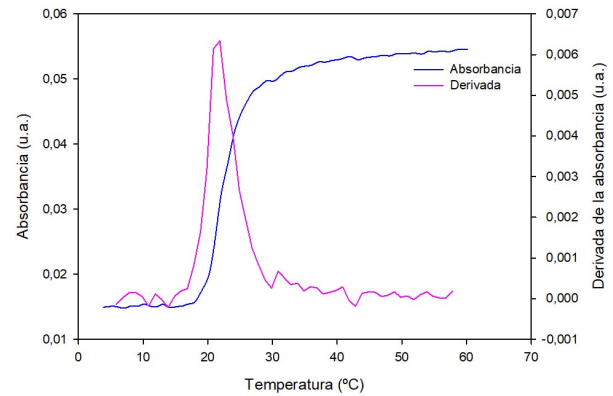
### 2.12. Análisis de datos

Los resultados se obtuvieron como la media y desviación estándar de tres medidas. Los análisis estadísticos se realizaron en excel usando análisis de varianza significativa ANOVA de un factor. Un valor de  $p$  menor de 0,05 se consideró significativo estadísticamente,  $(**)p < 0,005$ ,  $(*)p < 0,05$ , mientras que por encima de 0,05 no hay diferencias significativas.

## 3. Resultados

### 3.1. Turbidimetría

La medida de turbidimetría muestra un aumento de absorbancia cuando los polímeros anfífilos se autoensamblan (Figura 2), ya que la intensidad final al atravesar las micelas es menor que cuando están las cadenas plegadas. Cuando las soluciones se encuentran por debajo de la temperatura de transición se ven transparentes, mientras que la turbidez aumenta al transicionar el bloque hidrofóbico. Esta temperatura de transición se determina calculando el punto de inflexión, siendo en este caso de  $21,97 \pm 0,10^\circ C$ .



**Fig. 2** Curva de absorbancia del polímero KI y su derivada a  $\lambda = 350$  nm en PBS frente a la temperatura

### 3.2. Tamaño de partícula y carga

Se ha estudiado el tamaño de las nanopartículas que se forman a una temperatura por encima de la de transición, en este caso hemos realizado las medidas a  $37^\circ C$ . El polímero KI forma partículas de un diámetro de  $49,70 \pm 0,56$  nm con una polidispersidad de 0,075.

Las partículas grandes dispersan mucha más luz que las partículas pequeñas, además la intensidad de dispersión de una partícula es proporcional a  $d^6$  (de la apro-

ximación de Rayleigh). Con esto se puede determinar el diámetro de las partículas.

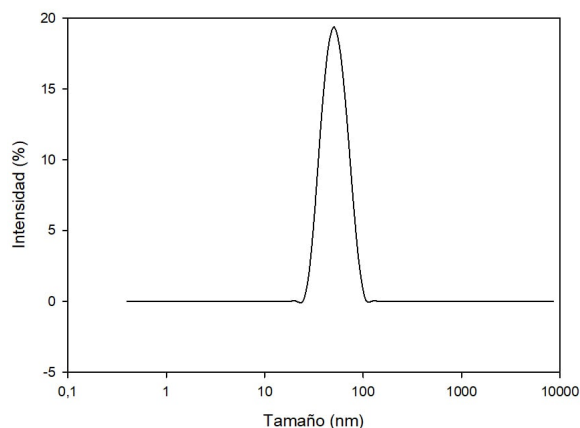


Fig. 3 DLS. Intensidad relativa en función del tamaño

En cuanto al potencial Z, las nanopartículas exhibían una carga claramente positiva, de  $12,05 \pm 1,54$  mV.

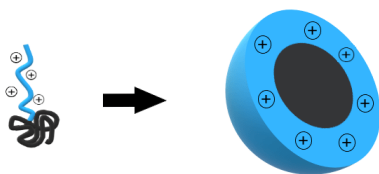


Fig. 4 Representación esquemática de la carga del polímero una vez alcanzada la temperatura de transición de forma individual y en las micelas

### 3.3. QCM-D

Con esta técnica se evaluó la interacción de las nanopartículas cargadas positivamente con superficies lipídicas y fosfolipídicas. Se estudió las frecuencias y disipaciones que están relacionadas con el espesor y rigidez de las capas de polímero depositadas. Para ello, se tuvo en cuenta los armónicos, des del fundamental hasta el treceavo. Los datos de la frecuencia fundamental no se analizaron, ya que es propensa a inestabilidades del flujo, que tienen un efecto menor para otros armónicos.<sup>22</sup>

En la figura 5, vemos la curva representativa que obtenemos con la microbalanza de cuarzo para un lípido y un fosfolípido. Se ha representado las frecuencias y disipaciones para los armónicos 3, 5, 7 y 9, siendo la tercera la de mayor disipación y menor frecuencia y la novena la de menor disipación y mayor frecuencia.

Se pueden distinguir tres eventos claros para ambos sustratos (lípidos y fosfolípidos), todos ellos a una temperatura de 37°C. El primer evento es el flujo de PSB 1x sobre el sensor ya funcionalizado, el cual define la línea de base para todo el experimento. El segundo se trata de la deposición del polímero KI, y el tercero es un paso de

lavado y estabilización, que determina el espesor de la capa de polímero y las propiedades de la capa de ELR que interactúa con el sustrato base.

Consideraremos la variación en frecuencia y disipación (Figura 6). En el caso de la frecuencia, vemos una caída de esta en los dos casos, aunque más abrupta y mucho mayor en el caso del fosfolípido. La frecuencia después del lavado apenas varía, pero existe una diferencia un poco mayor en el caso del lípido.

En cambio, los valores de la disipación fueron similares para ambos sustratos, aunque mayor para el fosfolípido. El ELR mostró valores de disipación final similares después del lavado.

La solución de ELR interactúa con la capa de lípidos o fosfolípidos sobre los sensores QCM-D de oro. Mediante el modelo de Broadfit, se determinan los valores en la deposición y lavado de espesor, masa depositada, viscosidad y módulo de Young (Tabla 2).

Comparando estos parámetros entre la capa lipídica y fosfolipídica tenemos diferencias significativas en el módulo elástico y en la viscosidad (\*), mientras que para el espesor y masa depositada no las hay (Figura 7).

En cuanto al análisis entre deposición y lavado, en los dos casos vemos que la masa y el espesor disminuyen, mientras la viscosidad y el módulo elástico aumentan.

### 3.4. Ángulo de contacto

La evolución de la funcionalización de las superficies de oro con sustratos de lípidos y fosfolípidos, y la posterior deposición de los ELR, se controló mediante el ángulo de contacto. En la figura 8 se puede observar un cambio en los valores del ángulo de contacto en comparación con la superficie de oro activado.

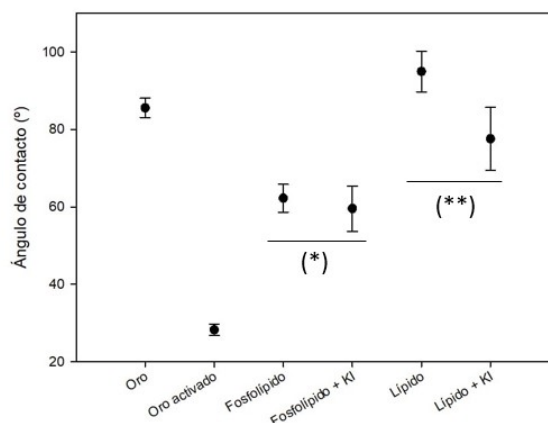
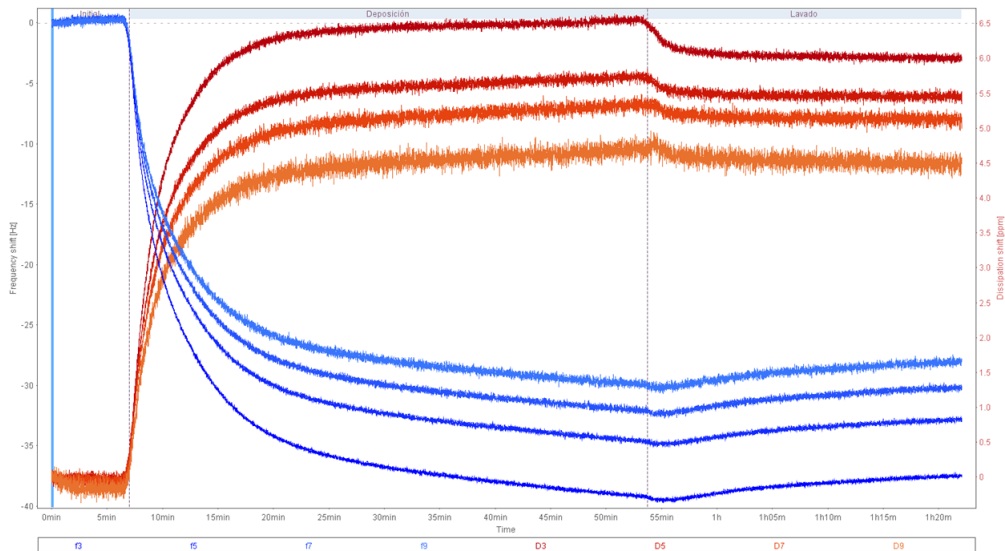
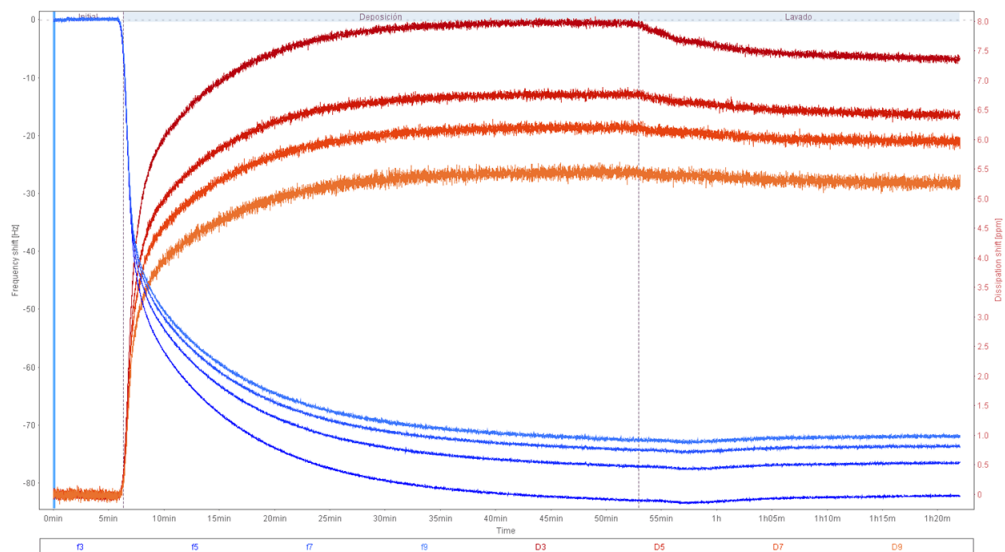


Fig. 8 Ángulo de contacto para la superficie de oro inicial, la de oro limpia con plasma, la funcionalizada con lípido y fosfolípido y con el ELR depositado sobre estas dos últimas.

Las superficies antes de la limpieza con plasma tenían un ángulo de contacto de  $85,60 \pm 2,48^\circ$ . Una vez activa-



(a) Lípido + KI



(b) Fosfolípido + KI

**Fig. 5** Curvas representativas de los armónicos 3, 5, 7 y 9 obtenidas de la Microbalanza de Cuarzo con Disipación.

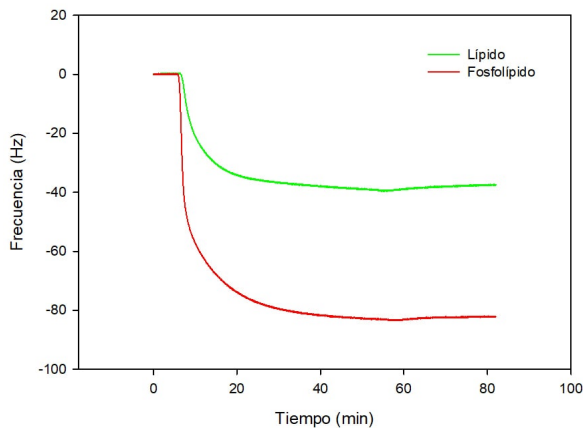
Sustrato	Espesor (nm)		Masa ( $ng/cm^2$ )		Módulo Elástico (kPa)		Viscosidad ( $\mu Pa \cdot s$ )	
	Deposición	Lavado	Deposición	Lavado	Deposición	Lavado	Deposición	Lavado
Lípido + KI	$44,99 \pm 1,29$	$43,81 \pm 1,15$	$4948,56 \pm 141,49$	$4796,08 \pm 134,41$	$46,90 \pm 2,05$	$47,97 \pm 1,01$	$1080,10 \pm 18,82$	$1095,63 \pm 20,38$
Fosfolípido + KI	$44,24 \pm 0,28$	$43,45 \pm 0,20$	$4866,17 \pm 30,74$	$4779,61 \pm 22,37$	$83,02 \pm 18,09$	$87,87 \pm 17,56$	$1168,51 \pm 45,08$	$1189,29 \pm 47,19$

**Cuadro 1** Parámetros ajustados con el modelo Broadfit en las medidas de QCM-D durante la deposición del polímero y el lavado de la superficie.

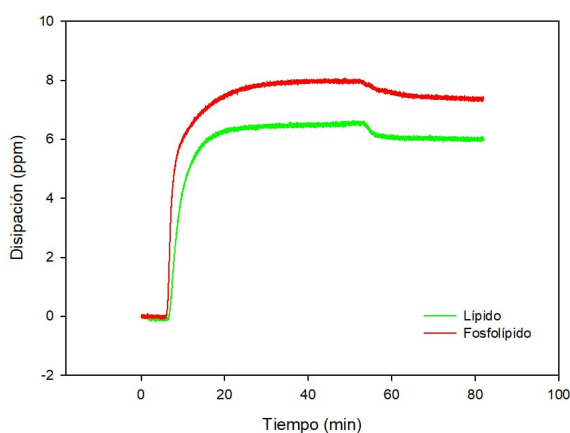
das con el plasma, los sustratos de oro se volvieron mucho más hidrófilos, con valores de ángulo de contacto de  $28,24 \pm 1,82^\circ$ . Para las superficies funcionalizadas con lípido sobre la superficie de oro, se volvieron extremadamente hidrofóbicas, con un ángulo de contacto de  $95,00 \pm 5,29^\circ$ . Como en la situación anterior, el cambio en el ángulo de contacto fue claro en el caso de fosfolípidos,  $62,25 \pm 3,63^\circ$ , aunque no tan marcado como en el

caso de lípidos.

Considerando el ángulo de contacto después de la deposición de ELR sobre la superficie de los lípidos resultó en una disminución significativa (\*\*) de la hidrofobicidad a valores de  $77,60 \pm 8,10^\circ$ . En el caso de fosfolípidos, el ángulo no ha variado tanto, manteniendo un ángulo de unos  $58,73 \pm 5,83^\circ$ , pero habiendo todavía diferencias significativas (\*).



(a) Evolución temporal de Frecuencia



(b) Evolución temporal de Disipación

**Fig. 6** Evolución temporal de frecuencias y disipaciones para los sustratos lipídicos y fosfolipídicos.

### 3.5. Elipsometría

Se usó el elipsómetro para determinar el espesor en seco de la capa de polímero depositada.

Sustrato	Espesor (nm)		Contribución del agua (%)
	Elipsometría	QCM-D	
Lípido + KI	3,39 ± 1,61	43,81 ± 1,15	92,26 ± 0,04
Fosfolípido + KI	6,76 ± 0,96	43,45 ± 0,20	84,45 ± 0,02

**Cuadro 2** Espesor seco (elipsometría) e hidratado (QCM-D) y contribución del disolvente al espesor, para el sustrato lipídico y fosfolípido + KI.

Como puede verse, el espesor en seco obtenido por elipsometría es menor que el espesor húmedo medido por QCM-D. En el caso del espesor en húmedo, es prácticamente el mismo en los dos casos. Sin embargo, observamos diferencias significativas (\*\*\*) en el espesor en seco de la capa formada sobre el lípido y la del fosfolípido. A partir de estos datos, se estimó la cantidad corres-

pondiente de agua que contribuye al espesor de la capa del polímero. Los resultados apuntan a una capa más hidratada para el caso del lípido que para el fosfolípido.

### 3.6. AFM

Se utilizó AFM para evaluar los cambios en la topografía y la rugosidad de las superficies de los sensores de oro, una vez funcionalizados con lípidos y fosfolípidos, así como después de la deposición de ELR. Las imágenes de AFM (Figura 9) muestran claras diferencias entre la nano-topografía de la superficie de oro y los sensores modificados con lípidos o fosfolípidos, así como una reducción significativa en la rugosidad RMS de la superficie en el caso del fosfolípido y un aumento para el sustrato lipídico. En cuanto a la rugosidad entre las superficies con lípido y fosfolípido, y las que tienen polímero depositado sobre estas, vemos que la rugosidad no ha variado demasiado para el fosfolípido, pero sí lo ha hecho considerablemente para el del lípido. Además se observa un claro cambio en la nano-topografía para ambos sustratos.

En cuanto a las diferencias entre la capa de KI sobre el sustrato lipídico y fosfolipídico, vemos una capa más compacta y más homogénea en el segundo caso.

Sustrato	Rugosidad RMS (nm)
Oro	2,17 ± 0,42
Lípido	3,90 ± 0,05
Fosfolípido	1,97 ± 0,17
Lípido + KI	0,95 ± 0,09
Fosfolípido + KI	1,81 ± 0,21

**Cuadro 3** Rugosidad RMS para los diferentes sustratos.

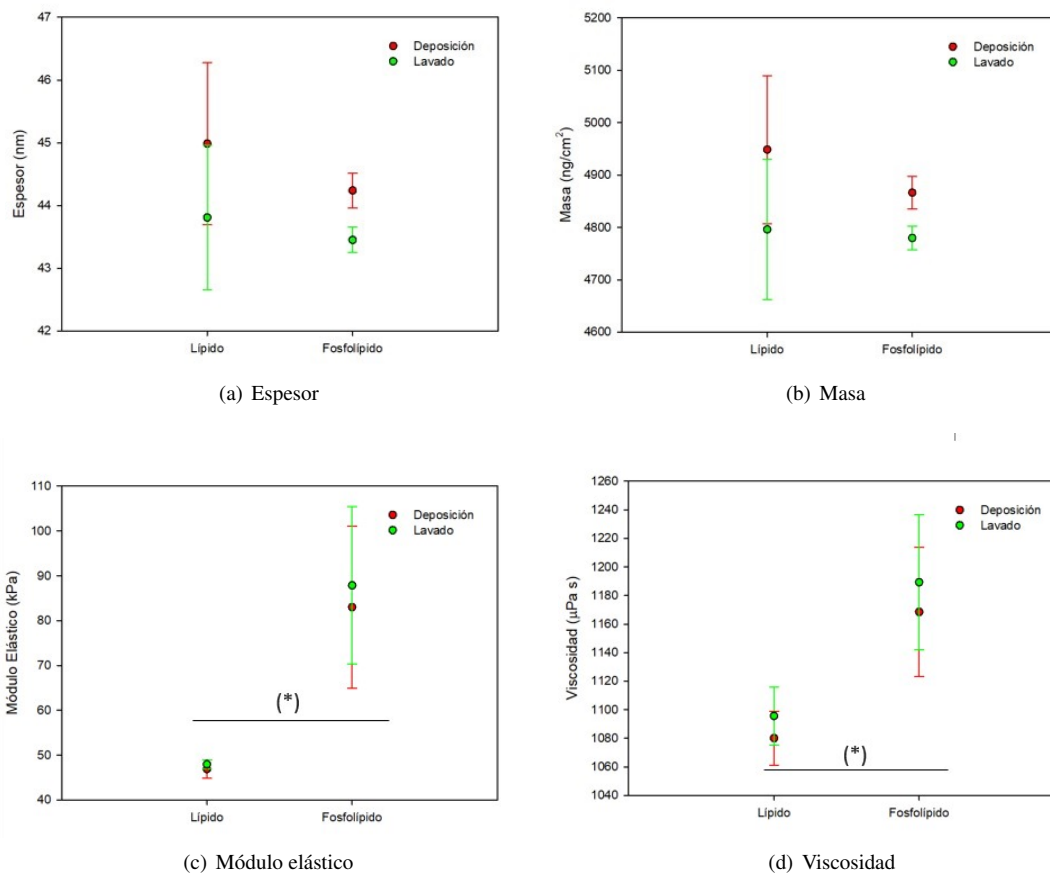
## 4. Discusión

En este trabajo se ha usado superficies de oro para crear modelos de biomembrana monocapa de lípido y fosfolípido, siguiendo el modelo de Langmuir. Se ha aprovechado que el oro forma enlaces covalentes con el grupo tiol<sup>28</sup> de las soluciones de 1-Undecanotiol (lípido) y ácido 11-mercaptoundecifosfórico (fosfolípido), para crear los modelos.

Para empezar, se determinó una buena funcionalización de las superficies de oro mediante el ángulo de contacto, ya que las superficies pasaron de ser muy hidrofílicas después de la limpieza, a un claro aumento de la hidrofobicidad de estas después del tratamiento. La diferencia de hidrofobicidad entre la capa lipídica y fosfolipídica se debe a los grupos de fósforo cargados negativamente que interactúan con el agua que es una molécula polar. El AFM fue de apoyo para confirmar esta funcionalización, ya que vimos un cambio de la topografía de la superficie de oro.

En cuanto al ELR depositado en estas membranas, se realizó su caracterización, determinando que su tempe-





**Fig. 7** Espesor, masa, módulo elástico y viscosidad durante la deposición del KI y el lavado para las superficies lipídicas y fosfolipídicas.

ratura de transición era de  $21,97 \pm 0,10^\circ\text{C}$ . Hemos trabajado a  $37^\circ\text{C}$ , una temperatura por encima de la de transición, la cual hemos elegido. La parte hidrofóbica del KI es la isoleucina y no tiene carga, mientras que la parte hidrofílica es la lisina y está cargada positivamente. Esta carga se debe a que la cadena lateral de la lisina a pH neutro, pH que mantiene la disolución tampón, tiene el grupo amino protonado. De esta manera se forma una micela con una corona hidrofílica cargada positivamente.

La interacción de estas nanopartículas con los modelos de biomembrana se evaluó mediante medidas de QCM-D. Para las biomembranas del modelo lipídico, se encontró que el valor de la frecuencia para las nanopartículas de KI disminuyó y se estabilizó en valores cercanos a  $-40$  Hz, aumentando unos hercios después del paso de lavado (Figura 6(a)). La frecuencia es un indicador de cantidad de materia depositada, por tanto como no hay un cambio significativo, esto nos indica que toda la cantidad de ELR depositado interactúa con la superficie lipídica.

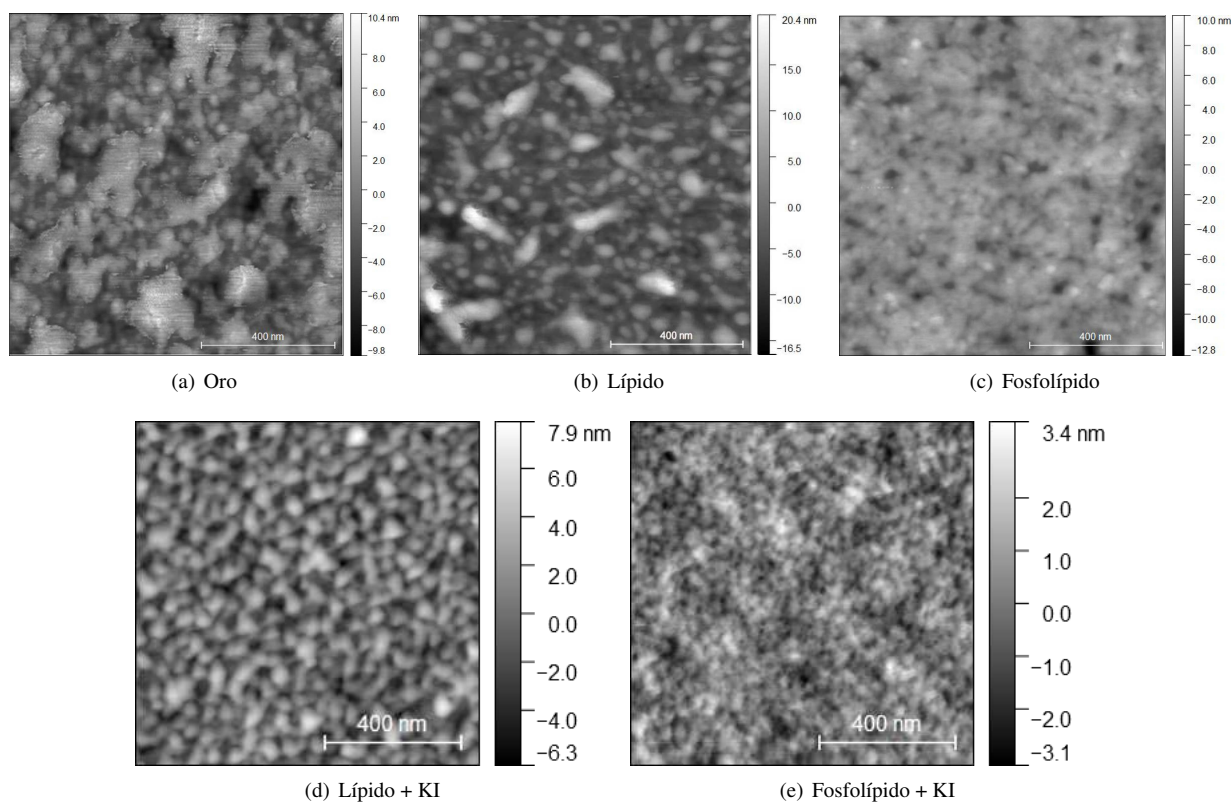
En el caso de los modelos de biomembrana de fosfolípidos, se encuentra un comportamiento similar a la de los modelos de los lípidos, aunque en este caso durante la deposición se alcanzaron frecuencias de unos  $-80$  Hz, disminuyendo también unos pocos hercios durante el la-

vado. Esto nos indica que existe mayor cantidad de moléculas depositadas. Como en el lípido, toda la cantidad de ELR depositado interactúa con la superficie.

Comparando las frecuencias de las dos superficies, se puede ver que la cantidad de materia que se ha depositado en la fosfolipídica, se ha hecho de forma más abrupta. Esto es debido a las fuertes interacciones que se producen entre la carga negativa del fósforo y positiva del KI. Además, en el lavado se ha eliminado los restos que no se han unido fuertemente a la superficie, vemos por tanto una subida en la frecuencia mayor en el lípido.

Se puede determinar que la capa formada por el polímero KI sobre el sustrato lipídico se trata de una capa más hidratada que en la formada sobre el fosfolipídico, ya que la masa que se ha obtenido es prácticamente la misma (Tabla 2) (n.s.d.). Esto también se corrobora con la viscosidad, que como podemos observar, es mayor para el sustrato fosfolipídico (\*). Esta tiene mayores fuerzas intermoleculares, y por tanto es menos propensa a la deformación que la lipídica.

Esta afirmación también se sustenta mediante la elipsometría. Las ventajas de usar elipsometría y QCM-D es que con la elipsometría podemos medir el espesor de la capa polimérica en seco, mientras que con QCM-D ob-



**Fig. 9** Topografía de los diferentes sustratos obtenidos con el AFM. Área escaneada de  $1 \times 1 \mu m^2$

tenemos el espesor de la capa en húmedo. Entonces, al combinar las dos técnicas, se puede determinar el porcentaje de agua que contribuye al espesor. Se ha determinado que en el caso del polímero depositado sobre el lípido existe una mayor contribución de agua que en el caso del KI sobre el fosfolípido.

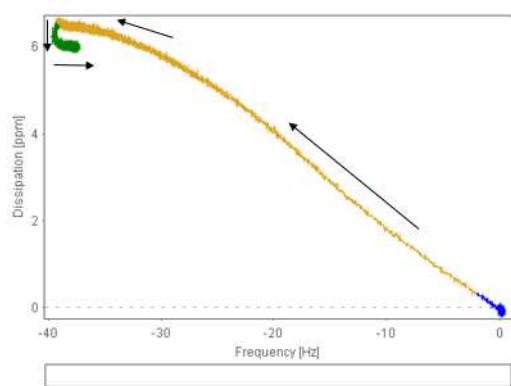
Con respecto a la evolución de la disipación, es conveniente estudiarla junto a la frecuencia (Figura 10). La variación de esta puede correlacionarse con las propiedades mecánicas de la capa. Los gráficos de disipación frente a la frecuencia son muy útiles para evaluar el comportamiento dinámico de las nanopartículas ELR cuando entran en contacto con los modelos de biomembranas. Además, como cada punto se adquiere en QCM-D con una diferencia de un segundo, la concentración de estos puede ofrecer una vista cinética del proceso. Por tanto, los puntos separados indican un proceso rápido, mientras que los puntos cercanos sugieren un proceso más lento. Es útil también trazar flechas siguiendo las diferentes direcciones del proceso para obtener una interpretación correcta de estos gráficos, con flechas que apuntan hacia arriba indicando una disminución en la rigidez y viceversa. De manera similar, las flechas que apuntan hacia la izquierda muestran un aumento en la masa depositada, mientras que las flechas que apuntan hacia la derecha indican una pérdida de masa<sup>29</sup>.

Existen comportamientos ligeramente diferentes entre la biomembrana de fosfolípido y la de lípido. Por ejem-

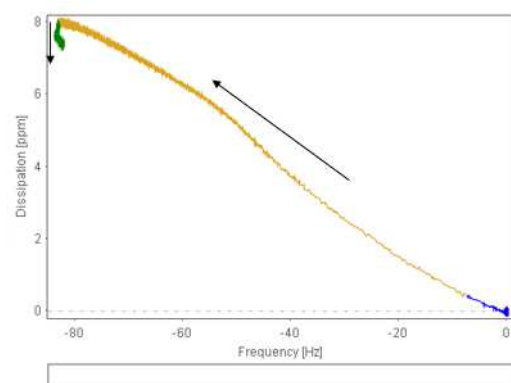
plo, prestando atención al modelo de biomembrana basado en lípidos, las nanopartículas siguieron una deposición lineal, lo que indica una estrecha interacción entre el polímero y la capa de lípidos. A partir de unos -30 Hz se visualiza una pequeña plateau, ya que se sigue depositándose masa, pero esta no interacciona prácticamente con el lípido. En el lavado se produce un reordenamiento de las moléculas en la capa, en el cual vemos una disminución de la disipación, y seguidamente se elimina las moléculas que no interactúan con el lípido dando lugar a un aumento de la frecuencia (pérdida de masa).

Para el modelo de la biomembrana basada en fosfolípido obtenemos una deposición lineal aunque en este caso la unión del ELR a la capa de fosfolípido es mucho más rápida que en el caso del lípido. Esto se deduce por la pequeña cantidad de puntos al principio de la caída de la frecuencia. En el lavado se observa una disminución de la disipación, que da lugar a una reordenación de la capa, pero no vemos pérdida de masa, posiblemente debido al hecho de que las moléculas de KI con carga positiva interactúan más eficazmente con el modelo de biomembrana de fosfolípidos con carga negativa.

Si consideramos una frecuencia de -40 Hz, vemos que la disipación es casi la mitad en el fosfolípido. La disipación es un indicador de la rigidez, y cuanto mayor sea esta, menor rigidez. Por tanto, se puede determinar también que la capa formada sobre el sustrato de fosfolípido es el doble de rígida que la capa sobre el sustrato lipídico.



(a) Lípido + KI



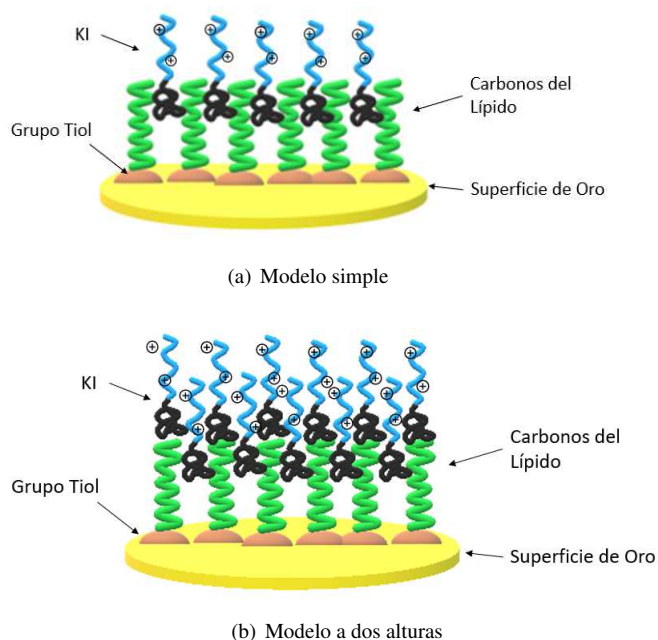
(b) Fosfolípido + KI

**Fig. 10** Disipación en función de la frecuencia para el tercer armónico para la solución de KI sobre sustratos de lípido y fosfolípido.

co (\*). Esto se confirma con los resultados obtenidos del modelado, recogidos en la tabla 2.

Se pueden observar diferentes cambios en la polaridad de las superficies respecto a estas mismas sin el KI mediante las medidas del ángulo de contacto (Figura 8). En la superficie lipídica, una vez depositado la solución de polímero se aprecia una disminución de la hidrofobicidad significativa. La situación de partida es una capa lipídica hidrofóbica sin carga sobre la que se depositan nanopartículas con una corona cargada. Este ELR forma interacciones hidrofóbicas con el lípido, ocultando esta parte y exponiendo así sus grupos polares al medio acuoso circundante y dando como resultado una reducción significativa en la hidrofobicidad del sustrato. De este modo, se proponen dos modelos para esta interacción (Figura 11), aunque por la reorganización de la capa y pérdida de masa que hemos determinado con la QCM-D, se podría decir que la figura 11(b) encaja más.

En cuanto al fosfolípido, se encuentran diferentes comportamientos posibles como podemos ver en la figura 12. Por un lado, podemos tener un caso similar al anterior, en el que la parte hidrofóbica se esconda del medio acuoso (Figura 12(a)). También podría el ELR cargado positivamente interactuar electrostáticamente con la bio-



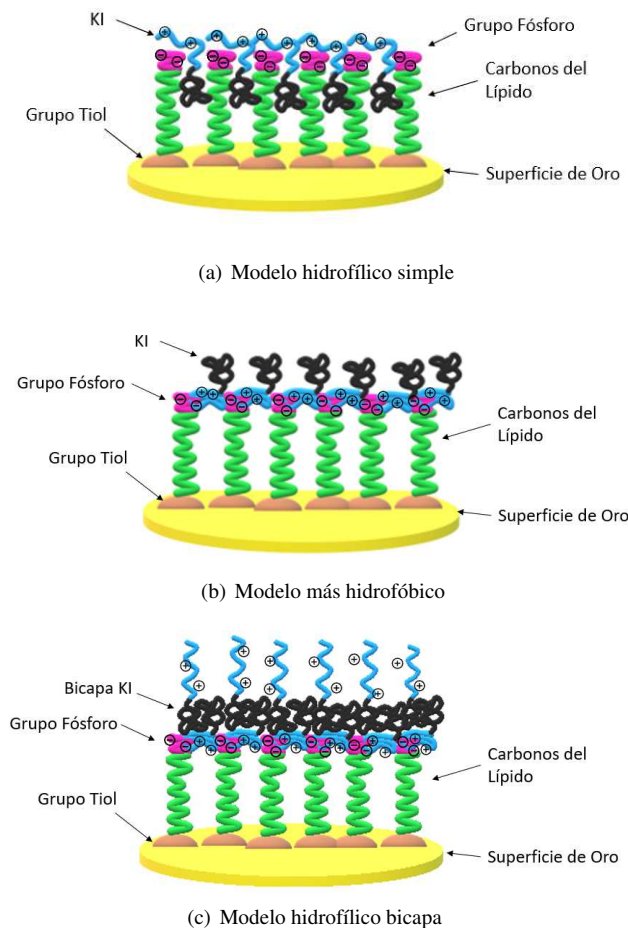
**Fig. 11** Esquema del modelo de biomembrana lipídica + KI.

membrana de fosfolípido cargada negativamente, dejando la parte hidrofóbica expuesta al medio acuoso (Figura 12(b)). Finalmente, podría formarse una bicapa, de manera que la parte hidrofílica del polímero interactúa con el fosfolípido, dejando expuesta la parte hidrofóbica, la cual interacciona con la parte hidrofóbica de una segunda capa de ELR, desplegando la parte hidrofílica al medio circundante (Figura 12(c)). En el primer y tercer caso, obtendríamos una superficie más hidrofílica, mientras que en el segundo veríamos un aumento en la hidrofobicidad. Con el ángulo de contacto se ha podido determinar que nuestra biomembrana fosfolipídica interacciona con el polímero depositado de la primera y tercera manera. No podemos descartar ninguno de los dos modelos, pero podríamos suponer que interacciona como el primer modelo, ya que conduciría a una capa más compacta en QCM-D dando módulos más altos, cosa que se confirma con los datos obtenidos, siendo el doble para el sustrato del fosfolípido respecto al lípido. Además en QCM-D vemos que no hay pérdida de masa, gracias a las fuertes interacciones entre el fosfolípido y el KI.

Con el AFM vemos las diferencias entre el modelo de biomembrana de lípido y el de fosfolípido con el KI (Figura 9), se observa que las nanopartículas no se rompen del todo en la superficie en el modelo de biomembrana con lípido, mientras sí lo hace con el fosfolípido, dando lugar a una capa más compacta y uniforme.

## 5. Conclusión

En este trabajo se ha presentado un estudio sobre el comportamiento de nanopartículas cargadas positivamente cuando entran en contacto con modelos de bio-



**Fig. 12** Esquema de los modelos de biomembranas fosfolipídicas + KI.

membranas de lípidos y fosfolípidos. De este modo, se ha propuesto diferentes modelos de interacción, y se ha demostrado que estas nanopartículas positivas interactúan más eficazmente sobre las capas fosfolipídicas, ya que contienen fósforo y por tanto, están cargadas negativamente.

Para empezar se caracterizó las nanopartículas formadas por el polímero KI, determinando su tamaño y potencial Z, siendo este último de especial interés, ya que rige la forma en la que interactúa con los modelos.

Se usó la microbalanza de cuarzo con disipación para estudiar la evolución de la frecuencia y disipación en función del tiempo, así como las gráficas de disipación frente a frecuencia, para así comprender las propiedades mecánicas de la capa de ELR que se formaba sobre el sustrato de lípido y fosfolípido. Las principales diferencias se encontraron en el módulo elástico de las capas, siendo el doble de rígida la capa de ELR sobre el sustrato fosfolipídico. Además, también se ha cuantificado el espesor, la masa depositada y la viscosidad de estas capas.

El ángulo de contacto fue útil para asegurarse de que

habíamos realizado una buena funcionalización de las superficies, así como determinar qué tipo de interacción estaba ocurriendo en el caso del sustrato fosfolipídico. Además pudimos corroborar la funcionalización y estudiar la rugosidad y topografía de las capas mediante AFM.

En cuanto a la elipsometría, se ha propuesto el modelo de Drude para la capa de oro y un conjunto de tres osciladores de Lorentz desacoplados para las capas de lípido y fosfolípido y la de ELR, para la determinación cuantitativa del espesor de las capas de ELR en estos modelos de biomembrana en condiciones secas.

En resumen, este trabajo podría ayudar a muchos investigadores que trabajan en el campo de los ELR a interpretar los datos obtenidos con la QMC-D, así como a proporcionar una perspectiva útil sobre el diseño de modelos de elipsometría para capas ELR.

Esta comprensión de las interacciones entre nanopartículas de KI con lípidos y fosfolípidos, es el punto de partida para producir estructuras basadas en ELR que puedan modular la actividad de canales de transporte ya presentes en las membranas biológicas.

## Referencias

- 1 R. Wardhan and P. Mudgal, Textbook of Membrane Biology. 2017.
- 2 P.L. Yeagle, The Membranes of Cells, 3rd ed., Elsevier, 2016. doi:10.1016/B978-0-12-800047-2.00017-6.
- 3 G. Banfalvi, Permeability of biological membranes. 2016.
- 4 K. H and P. Dynarowicz-Ł, "Biomedical applications of the Langmuir monolayer technique," vol. LXIII, 2008.
- 5 H. Watson, "Biological membranes," Essays Biochem., vol. 59, pp. 43–70, 2015, doi: 10.1042/BSE0590043.
- 6 A. Arrazola, "Biología De La Membrana Celular," Nefrología, vol. 14, no. 4, pp. 418–426, 1994.
- 7 C. Peetla, A. Stine, and V. Labhasetwar, "reviews Biophysical Interactions with Model Lipid Membranes: Applications in Drug Discovery and Drug Delivery," no. 4, pp. 8053–8058, 2009.
- 8 T. Ahmed, "Langmuir-Blodgett Monolayer Studies of Mixed Gemini Surfactant-Phospholipid Monolayers System for Gene Therapy Applications," 2015.
- 9 W. Hassouneh, E. B. Zhulina, A. Chilkoti, and M. Rubinstein, "Elastin-like Polypeptide Diblock Copolymers Self-Assemble into Weak Micelles," 2015, doi: 10.1021/acs.macromol.5b00431.
- 10 J. C. Rodríguez-cabello, I. G. De Torre, and S. Acosta, Elastin-like proteins: Molecular design for self-assembling. Elsevier Ltd., 2018.
- 11 S. M. Mithieux and A. S. Weiss, "Elastin," Adv. Protein Chem., vol. 70, pp. 437–461, Jan. 2005, doi: 10.1016/S0065-3233(05)70013-9.

- 12 A. Girotti, A. Fernández-colino, I. M. López, J. C. Rodríguez-cabello, and F. J. Arias, "Elastin-like recombinamers: Biosynthetic strategies and biotechnological applications," pp. 1174–1186, 2011, doi: 10.1002/biot.201100116.
- 13 J. C. Rodríguez-Cabello, F. J. Arias, M. A. Rodrigo, and A. Girotti, "Elastin-like polypeptides in drug delivery," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 97, pp. 85–100, 2016, doi: 10.1016/j.addr.2015.12.007.
- 14 S. R. Macewan and A. Chilkoti, "Applications of elastin-like polypeptides in drug delivery," *Journal of Controlled Release*, vol. 190, pp. 314–330, 2014, doi: 10.1016/j.jconrel.2014.06.028.
- 15 D. L. Nettles, A. Chilkoti, and L. A. Setton, "Applications of elastin-like polypeptides in tissue engineering," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 62, no. 15, NIH Public Access, pp. 1479–1485, Dec. 30, 2010, doi: 10.1016/j.addr.2010.04.002.
- 16 J. C. Rodríguez Cabello, I. G. De Torre, F. Cipriani, and L. Poczka, "Elastin-like materials for tissue regeneration and repair," in *Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue Regeneration and Repair*, Elsevier Inc., 2018, pp. 309–327.
- 17 A. Girotti, A. Fernández-colino, I. M. López, J. C. Rodríguez-cabello, and F. J. Arias, "Elastin-like recombinamers: Biosynthetic strategies and biotechnological applications," pp. 1174–1186, 2011, doi: 10.1002/biot.201100116.
- 18 W. Hassouneh et al., "Unexpected Multivalent Display of Proteins by Temperature Triggered Self-Assembly of Elastin-like Polypeptide Block Copolymers," 2012, doi: 10.1021/bm300321n.
- 19 S. Bhattacharjee, "Review article DLS and zeta potential – What they are and what they are not?," *J. Control. Release*, vol. 235, pp. 337–351, 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017.
- 20 G. Rudolph, A. Hermansson, A. S. Jönsson, and F. Lipnizki, "In situ real-time investigations on adsorptive membrane fouling by thermomechanical pulping process water with quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D)," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 254, p. 117578, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.seppur.2020.117578.
- 21 M. V. Voinova, M. Rodahl, M. Jonson, and B. Kasemo, "Viscoelastic Acoustic Response of Layered Polymer Films at Fluid-Solid Interfaces: Continuum Mechanics Approach Viscoelastic Acoustic Response of Layered Polymer Films at Fluid-Solid Interfaces: Continuum Mechanics Approach," 1999.
- 22 "The Sauerbrey equation or Viscoelastic modeling? – how to assess which method to use." <https://www.biolinscientific.com/blog/the-sauerbrey-equation-or-viscoelastic-modeling-how-to-assess-which-method-to-use> (accessed Jun. 25, 2021).
- 23 E. Garcia-Caurel, A. De Martino, J. P. Gaston, and L. Yan, "Application of spectroscopic ellipsometry and mueller ellipsometry to optical characterization," *Appl. Spectrosc.*, vol. 67, no. 1, pp. 1–21, 2013, doi: 10.1366/12-06883.
- 24 F. Höök, B. Kasemo, T. Nylander, C. Fant, K. Sott, and H. Elwing, "Variations in coupled water, viscoelastic properties, and film thickness of a Mefp-1 protein film during adsorption and cross-linking: A quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, ellipsometry, and surface plasmon resonance study," *Anal. Chem.*, vol. 73, no. 24, pp. 5796–5804, 2001, doi: 10.1021/ac0106501.
- 25 M. Losurdo et al., "Spectroscopic ellipsometry and polarimetry for materials and systems analysis at the nanometer scale: State-of-the-art, potential, and perspectives," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 11, no. 7, pp. 1521–1554, 2009, doi: 10.1007/s11051-009-9662-6.
- 26 M. B. Young, B. K. Oh, W. Lee, H. L. Won, and J. W. Choi, "Study on orientation of immunoglobulin G on protein G layer," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 21, no. 1, pp. 103–110, 2005, doi: 10.1016/j.bios.2004.09.003.
- 27 H. Hölscher, "AFM, Tapping Mode," *Encycl. Nanotechnol.*, pp. 99–99, 2012, doi: 10.1007/978-90-481-9751-4\_33.
- 28 H. Häkkinen, "The gold-sulfur interface at the nanoscale," 2012, doi: 10.1038/NCHEM.1352.
- 29 G. A. Mccubbin et al., "QCM-D fingerprinting of membrane-active peptides," pp. 437–446, 2011, doi: 10.1007/s00249-010-0652-5.