



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

DEPARTAMENTO DE FÍSICA

**COMPLEJOS SUPRAMOLECULARES, EN VOLUMEN Y EN
INTERFACES, CON POTENCIAL APLICACIÓN EN
NANOMEDICINA**

Tesis para optar al grado de Doctor en Física

LIC. HERNÁN MARTINELLI

Director de Tesis: Doctor Hernán A. Rittaco.

Bahía Blanca, Argentina.

Marzo, 2023

Prefacio

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Física, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Física y el Instituto de Física del Sur (IFISUR-CONICET) durante el período comprendido entre los años 2018 y 2023, bajo la dirección del Dr. Hernán Ritacco, Profesor Asociado con dedicación exclusiva.

Hernán Martinelli

Bahía Blanca, 20 de enero de 2023
DEPARTAMENTO DE FÍSICA
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente Tesis ha sido aprobada el 09/03/2023 , mereciendo la calificación de 10 (sobresaliente)

*"Sólo él sabía entonces que su aturdido corazón estaba condenado para siempre a la
incertidumbre."*

Gabriel García Márquez en *Cien años de soledad*

Agradecimientos

El desarrollo y culminación de este proyecto de tesis no hubiera sido posible sin el apoyo de las siguientes personas e instituciones a las que les debo mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar agradecer a la ANCyPT y al CONICET, que a través de la FUNS y el IFISUR dirigieron parte de los impuestos de los argentinos a financiar la presente investigación y mi sustento diario, permitiendo dedicarme íntegramente a las labores del doctorado. A la Universidad Nacional del Sur y a su Departamento de Física por brindarme el lugar y el marco institucional para desarrollar este trabajo.

Al Dr. Hernán Ritacco, por abrirme las puertas de su grupo y por ser no sólo un gran director, sino también mentor, guía, psicólogo y gran maestro Jedi. Gracias por la confianza depositada, por el trabajo y charlas compartidas y por todo lo que transmitiste en mi persona; si hoy me siento un poco más científico, es gracias a vos.

Al Dr. Marcos Fernández Leyes por su generosidad para compartir su amplio conocimiento, por las charlas en las largas jornadas de medición y por las risas que nunca faltaron. Este agradecimiento se hace extensivo a las personas que pertenecen o pertenecieron al grupo Clau, Eze, Jhon, Santi, Zulma y Sole, gracias por lo compartido.

Al Dr. Sergio Moya y a su grupo de investigación del CICbiomaGUNE por hacer mi estancia en Donostia muy placentera y productiva. Espero que el futuro nos encuentre colaborando nuevamente.

A las amistades que encontré en Bahía, por estar siempre sosteniendo y dispuestos para compartir un buen rato. En especial a Elizabeth, indispensable para transitar los primeros momentos en esta ciudad, gracias por las charlas y las risas, los enojos y las cervezas. Que suerte haber coincidido en las casitas del DF.

A mis amigos de la facu, Nacho, Nachito, Juanma, Juampi, los de Bariloche, Pri y Mati y a todo el círculo que siempre está dispuesto a una juntada cuando vuelvo de visita a BA. Gracias por los mensajes y las llamadas, por sostener esta amistad a la distancia. A los de siempre, Mariano, Agus, Pulga, Maxi, Euge y Emi, por su incondicionalidad, por las visitas (los que pudieron venir), por estar siempre a pesar de la distancia y las ausencias.

A mi familia que siempre me apoyó y me apoya a pesar de ya ser un hombre (al menos en edad) y de que cada vez me voy más lejos. Sunny y Lulo gracias por ser las hermanas que siempre me acompañan. A mamá y papá, sepan que aunque muchas veces no lo exprese, los extraño siempre. Nada de esto sería posible sin la educación y las oportunidades que me brindaron. Espero hacerlos sentir orgullosos.

Y por último, a mi nueva familia, la que encontré de casualidad aprendiendo a bailar tango, Natalin y Vicente. Natalin, gracias por el amor que me brindás todos los días, sin merma y cada día más. Y Vicente, gracias por enseñarme el amor más puro que una persona puede recibir. Los amo a los dos para siempre.

A todos los que no nombré y formaron parte de este camino. ¡GRACIAS!

Contenido

Agradecimientos.	II
Índice de figuras	VII
Índice de tablas	XVI
Resumen.	XIX
Abstract.	XXI
Lista de publicaciones.	XXIII
I Introducción y métodos	1
1. Introducción	3
1.1. Nanoremediación, alcances y desafíos	3
1.1.1. Tipos de nanotrasportadores	9
1.1.2. Características de los complejos con base en polielectrolitos	12
1.2. Objetivos y estructura de la tesis	19
2. Métodos experimentales	29
2.1. Técnicas de caracterización de superficies	29
2.1.1. Balanza de Langmuir	29
2.1.2. Tensión superficial dinámica: gota pendiente	33
2.1.3. Reflectometría de rayos X (XRR)	35
2.1.4. Microblanza de cuarzo con control de disipación (QCM-D)	39
2.2. Técnicas de caracterización en volumen	41
2.2.1. Efecto Kerr electroóptico	41
2.2.2. Técnicas de dispersión de luz	48
2.2.3. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)	54
2.2.4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	56
2.2.5. Espectroscopía de fluorescencia	57

II	Resultados y discusión	65
3.	Polaridad local en multicapas de polielectrolitos determinada por fluorescencia de Doxorrubicina	67
3.1.	Introducción	67
3.2.	Materiales y metodología	70
3.2.1.	Materiales	70
3.2.2.	Preparación de las PEMs	70
3.2.3.	Mediciones de fluorescencia	71
3.3.	Resultados	72
3.4.	Conclusiones	82
4.	Complejos responsivos a pH basados en mezclas de PAA y Gemini 12-2-12	91
4.1.	Introducción	91
4.2.	Materiales y métodos	92
4.2.1.	Materiales	92
4.2.2.	Preparación de las complejos PAA-G12	93
4.2.3.	Desarrollo experimental	93
4.3.	Resultados	94
4.3.1.	Fases presentes	94
4.3.2.	Tensión superficial de equilibrio	94
4.3.3.	Tensión superficial dinámica	96
4.3.4.	Reología superficial	97
4.3.5.	Reflectometría de rayos X	99
4.3.6.	Dispersión de luz dinámica y electroforética	103
4.3.7.	Efecto Kerr	106
4.4.	Discusión	113
4.5.	Conclusiones	122
5.	Autoensamblado, termodinámica y estabilidad de nanopartículas poliaminas (PANs)	129
5.1.	Introducción	129
5.2.	Materiales y metodología	130
5.2.1.	Materiales	130
5.2.2.	Preparación de nanoparticulas de fosfato de poliaminas (PANs)	131
5.2.3.	Medidas de dispersión de luz dinámica (DLS) y movilidad electroforética	131
5.2.4.	Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	132
5.2.5.	Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)	132
5.3.	Formación de PANs y morfología	132
5.4.	Caracterización termodinámica	142
5.5.	Estabilidad con el pH	145
5.6.	Conclusiones	148

6. Estudio de complejos ADN-DTAB por Efecto Kerr electroóptico	153
6.1. Introducción	153
6.2. Materiales y métodos	154
6.2.1. Análisis de transitorios	155
6.3. Resultados	156
6.3.1. Propiedades del ADN	156
6.3.2. Señales de birrefringencia	157
6.3.3. Birrefringencia estacionaria	158
6.3.4. Régimen transitorio	160
6.4. Discusión	169
6.5. Conclusiones	176
Apéndice	187
A. Anexo de Capítulo 2	187
B. Anexo de Capítulo 4	225
C. Anexo de Capítulo 5	231

Índice de figuras

1.1. Número de publicaciones por año que contienen la palabra Nanomedicine o Nanopharmaceutic indexadas en el portal <i>PubMed</i> [2]	5
1.2. Factores como el tamaño, la forma, la carga y la funcionalización superficial determinan lo que sucede con las nanopartículas en el torrente sanguíneo y como interactúan con las barreras locales como los microambientes tumorales o las mucosas. Imagen adaptada de referencia [11]	7
1.3. Ejemplos de estímulos o triggers que pueden utilizarse para liberación controlada en DDS. Externos: temperatura, campos magnéticos, ultrasonido, luz. Internos: Redox, anticuerpos, enzimas, pH.	8
1.4. Clasificación de nanopartículas utilizadas como DDS según sus constituyentes.	9
1.5. Esquema de longitudes características de un polímero	14
1.6. Isoterma de tensión superficial típica para mezclas de algunos polielectrolitos con tensoactivos	16
1.7. Descripción esquemática de posibles arreglos de complejos polielectrolito-surfactante: (a) polielectrolito decorado con surfactantes; (b) Micelas altamente empaquetadas unidas por un polielectrolito; (c) estructura tipo collar de perlas; (d) agregado tipo barra de micelas con un polielectrolito rígido.	17
1.8. Modelo de las zonas para una multicapa de polielectrolitos. La zona I está contigua al sustrato, la zona II forma lo que se denomina el “bulk” de la multicapas y la zona III está próxima a la interfase film/solución o film/aire	18
2.1. Esquema de una balanza de Langmuir	29
2.2. Montaje y esquema para la determinación de tensión superficial de equilibrio	31
2.3. (a) Equipo comercial KSV NIMA utilizado en las mediciones de tensión superficial y reología interfacial. (b) Datos obtenidos mediante un proceso de compresión súbita del área superficial (curva azul) y la respuesta temporal de la interfaz en términos de presión interfacial (curva negra)	33
2.4. Esquema de la gota pendiente y sus variables geométricas.	34

2.5. Configuración del tensiómetro de gota pendiente. (a) esquema del dispositivo; (b) foto del mismo dispositivo. (1) fuente de luz (2) difusor de luz (3) celda de medición (4) lente telecéntrica (5) cámara CCD (6) válvula (7) banco óptico. (8) Sistema automatizado de bomba de jeringa	35
2.6. Ejemplos de perfiles de reflectividad	37
2.7. (a) Imagen de la configuración del equipo Empyrean III para para experimentos de XRR sobre monocapas en interfaz líquido-aire. (b) Cuba de teflon cubierta de solución, la altura del líquido debe sobrepasar el alto del recipiente. (c) Medida de XRR para una monocapa de Gemini 12-2-12, se marca el módulo de vector de scattering crítico q_c	38
2.8. Esquema de (A) la adsorción de moléculas sobre un sustrato y (B) su desorción. En el panel inferior se observa la caracterización obtenida del proceso por QCM-D.	40
2.9. Equipo QSense Analyzer conectado a la bomba peristáltica para circulación de las soluciones, al lado el equipo desarmado mostrando las cuatro balanzas y los cristales de cuarzo	41
2.10. El signo de la birrefringencia depende de el momento dipolar eléctrico total (flecha punteada) resultante de los dipolos inducidos (signos \pm) y permanentes (flecha roja) y de la anisotropía óptica de las partículas (elipses punteadas). Las partículas se reorientan debido al dipolo eléctrico total, por lo tanto el eje óptico principal puede terminar en cualquier dirección entre paralelo ($\Delta n > 0$) o perpendicular ($\Delta n < 0$) al campo eléctrico.	43
2.11. Esquema del diseño experimental para medición de efecto Kerr electroóptico	46
2.12. Esquema del montaje experimental para mediciones de TEB.	47
2.13. Equipo utilizado para la medición de efecto Kerr (1) Laser de He-Ne, (2) polarizador, (3) celda Kerr sobre posicionador micrométrico, (4) Lámina de cuarto de onda, (5) analizador (polarizador cruzado), (6) Detector fotodiodo, (7) Fuente de tensión de pulsos, (8) Osciloscopio.	48
2.14. Esquema del proceso de medición del Radio hidrodinámico por DLS. Se puede observar que las partículas más grandes tardan más tiempo en descorrelacionar que las pequeñas. Esta medida puede ser traducida en el coeficiente de traslación difusional D_t y a través de la ecuación 2.30 obtener el R_h	49
2.15. Diagrama esquemático que muestra la doble capa eléctrica sobre la superficie de una partícula, con los diferentes potenciales de interés. Notar que la longitud de Debye $1/\kappa$ es donde el potencial de Stern disminuye a $1/e$ veces su valor	53
2.16. Equipo Malvern Zetsizer Nano junto con cubetas descartables para medidas de DLS (izquierda) y ELS (derecha)	54
2.17. Esquema del equipo de ITC	55
2.18. Datos obtenidos en un experimento de ITC	56

2.19. Diagrama de Jablonsky que ilustra las diferentes transiciones entre los estados de energía de una molécula. Las líneas punteadas representan decaimientos no radiativos.	58
2.20. Espectrofluorómetro Fluorolog-3	58
2.21. Esquema del proceso de medición. Se excita con una fuente pulsada y detecta un único fotón. A través de una electrónica veloz se pueden traducir las señales en tiempo y con la repetición generar una estadística que reproduzca el perfil de tiempo de vida de fluorescencia del sistema. .	59
3.1. Variación del espectro de fluorescencia de la DX con el solvente.	69
3.2. Esquema del proceso experimental de ensamblado de PEMs y de medición. También se muestran las estructuras de los compuestos utilizados .	71
3.3. Soporte para muestras sólidas con una muestra montada en él y posteriormente colocado en el espectrofluorómetro	72
3.4. Espectros de fluorescencia estacionaria correspondientes a la DX/PSS ubicada en la cuarta capa (a) como capa superior, (b) con 3 capas por encima, (c) con 6 capas por encima	73
3.5. Espectros de fluorescencia normalizados para el sistema PAH/PSS con la capa de DX/PSS ubicada en (a) cuarto lugar y (b) octavo lugar. Inset: evolución del ratio I_1/I_2 con el número de capas	74
3.6. Ensamblado de multicapas de PAH/PSS seguido por QCM-D. Se observa el cambio en frecuencia y disipación tras la deposición de 17 capas de polielectrolito. La PEM muestra un crecimiento regular desde la cuarta capa y se puede observar una frecuencia y disipación prácticamente constante luego de cada capa depositada.	76
3.7. Espectros de fluorescencia normalizados para el sistema PAH/PAA con la capa de DX/PAA ubicada en (a) cuarto lugar y (b) octavo lugar. Inset: evolución del ratio I_1/I_2 con el número de capas	77
3.8. Ensamblado de multicapas PAH/PAA seguido por QCM-D. Se observa el cambio de frecuencia y la disipación tras la deposición de 17 capas. Las capas de PAH/PAA muestran un crecimiento menos regular que las de PAH/PSS evidenciado por los cambios en frecuencia y disipación. La frecuencia decrece alrededor de 700 Hz en la última capa depositada mientras que para el sistema PAH/PSS corresponde a 2000 Hz la misma capa. La disipación es mayor debido probablemente a la hidratación de las capas de PAA.	78
3.9. Decaimiento del tiempo de vida de fluorescencia correspondiente a DX/PSS en la cuarta capa y con seis capas de polielectrolito por encima. (inset) Intensidad promediada del tiempo de vida como función de las capas de polímero depositadas por encima de la de DX/PSS para PEMs de PAH/PSS.	80
3.10. Esquema de los resultados experimentales PEMs con DX (óvalos verdes) y diferentes números de capas por encima retienen distintas cantidades de agua (moléculas rojas y blancas)	81

4.1. Gemini 12-2-12	93
4.2. Isotermas de tensión superficial de equilibrio para mezclas de PAA-Gemini 12-2-12 a diferentes pHs: 3.5 (círculos abiertos), 6 (triángulos abiertos), y 11 (rombos abiertos). Se ha incluido la isoterma correspondiente al surfactante G12 libre de polímero (cuadrados negros).	95
4.3. Tensión superficial dinámica de 1 mg mL ⁻¹ PAA mezclado con G12 a la concentración de 0.5 mM. Se muestran las curvas para tres pHs: 3.5 (cuadrados), 6 (círculos) y 11 (triángulos). Las flechas indican el tiempo de inducción para el cual la tensión disminuye significativamente. Las líneas superpuestas a la curva de pH 11 son ajustes con exponenciales.	96
4.4. Módulos elástico E' y viscoso E'' obtenidos por reología interfacial para soluciones 1 mg mL ⁻¹ + 0.1 mM G12 a pH 3.5 y (b) Espectro de relajaciones $H(\tau)$ obtenido por CONTIN	97
4.5. Módulos elástico E' y viscoso E'' obtenidos por reología superficial para soluciones 1 mg mL ⁻¹ + 0.1 mM G12 a (a) pH 6 y (b) pH 11.	98
4.6. Resultados de XRR para una solución de 2mM de G12. (a) Reflectividad vs. vector de onda (b) Perfil de densidad electrónica (ED) obtenido con un ajuste modelo-independiente (línea negra) y con un modelo de caja (línea punteada roja)	99
4.7. Curvas de XRR para el sistema 1 mg mL ⁻¹ + 0.5 mM G12 para los tres pHs estudiados. Las líneas rojas corresponden a las curvas ajustadas.	100
4.8. Curvas de XRR curves en función del tiempo para 1 mg mL ⁻¹ PAA + 0.1 mM G12 a pH 11. La primer curva (círculos negros) se obtuvo luego de un proceso de adsorción de 15 minutos. La segunda (cuadrados rojos) y tercera (triángulos azules) se midieron luego de 55 y 95 min, respectivamente. Se ha incluido por comparación la curva correspondiente a la monocapa de Gemini, libre de polímero (línea cyan). Se han eliminado las barras de error para mejorar la visualización	102
4.9. Diámetro hidrodinámico aparente y polidispersidad obtenidas por análisis de cumulantes para soluciones de PAA/G12	103
4.10. Diámetro hidrodinámico aparente y polidispersidad obtenidas por análisis de cumulantes para soluciones de PAA/G12 en función del pH	104
4.11. Potencial ζ para mezclas de PAA con distintas concentraciones de G12 en función del pH.	105
4.12. Tendencia del potencial ζ con la concentración de surfactante en la mezcla para pH 3.2.	106
4.13. Señales Kerr obtenidas tras la aplicación de un campo externo efectivo $E = 550$ kV/m a soluciones de PAA libre 1 mg mL ⁻¹ y mezclado con 10^{-3} mM $<c_s < 6.10^{-2}$ mM G12. Las mezclas con concentraciones más altas fueron excitadas con un pulso de mayor duración para asegurar llegar a la birrefringencia estacionaria.	107
4.14. Evolución de la constante de Kerr ($B-B_0$) del sistema PAA/G12 en función de la concentración de surfactante.	108

4.15. Señales de birrefringencia por efecto Kerr obtenidas para un voltaje efectivo de 800 V en soluciones de PAA libre y PAA/G12 a diferentes pHs .	109
4.16. Constantes de Kerr para sistemas PAA libre y mezclados con 10^{-3} mM, $3 \cdot 10^{-2}$, $5 \cdot 10^{-2}$ y 1 mM de G12 en función del pH	110
4.17. Tiempos de relajación obtenidos del ajuste de las señales Kerr para el sistema $1 \text{ mg mL}^{-1} + 5 \cdot 10^{-2}$ mM G12 a distintos pHs y para tensiones aplicadas efectivas de 250 kV/m y 550 kV/m	111
4.18. Coeficiente de estiramiento β y de difusión rotacional D obtenidos del ajuste de las relajaciones con el modelo dado por la ecuación 4.1	112
4.19. Esquema del proceso de complejación del PAA con el Gemini 12-2-12 para el pH de formación 3.2 (a) El PAA se encuentra ovillado para minimizar el contacto con el solvente. A través del progresivo agregado de G12 (b) se produce la interacción por reemplazo iónico en los grupos carboxílicos y por efecto hidrofóbico mediado por las colas alquílicas del G12; provocando la extensión parcial del ovillo. Al continuar agregando G12 (c) la cadena se extiende ampliamente permitiendo la asociación de mayor cantidad de Gemini, y las interacciones intercadenas lo que produce la agregación y formación de partículas macroscópicas en suspensión. (d) Al llegar a la CMC del G12, el sistema precipita, dejando el sobrenadante poblado de agregados de complejos monodispersos (línea punteada azul).	116
4.20. Esquema de la responsividad estructural frente al pH para la mezcla 1 mg mL^{-1} PAA + $5 \cdot 10^{-2}$ mM G12. Al aumentar el pH desde 3.2 la estructura se estira debido a la repulsión de los grupos carboxilatos del PAA que se ionización progresivamente. Al llegar a pH 7 se produce un cambio conformacional que provoca un aumento drástico en el tamaño. Luego a partir de pH 8, en la configuración de máximo estiramiento del PAA se consolida una estructura que no varía a pesar del aumento del pH. Se conjetura que es tipo collar de perlas.	119
4.21. Esquema de la responsividad estructural frente al pH para la mezcla 1 mg mL^{-1} PAA + 1 mM G12. A pH 3.2 el sistema se encuentra precipitado. Al aumentar el pH la repulsión entre las cadenas provoca la ruptura de las uniones más débiles como los puente hidrógeno intercadenas. Al llegar a pH 7.2 el sistema se redispersa, obteniéndose agregados de tamaño definido y baja polidispersidad. Al continuar aumentando el pH a partir de 8 el sistema comienza a disminuir su tamaño progresivamente. Es posible que se separen los agregados en otros más pequeños también monodispersos, por la repulsión de los grupos cargados del PAA.	121
5.1. Datos obtenidos por DLS para el sistema PAH + $Na_5P_3O_{10}$ a distintas concentraciones.	134
5.2. Datos obtenidos por DLS y TEM para el sistema PAH + 2 mM $Na_5P_3O_{10}$.	135
5.3. Datos obtenidos por dispersión de luz para el sistema PAH + Na_3PO_4 .	136

5.4. Resumen de las variaciones de la tasa de cuentas de luz medidas para los distintos sistemas PAH/fosfato estudiados en función de la concentración de fosfato: (●) Na_3PO_4 , (●) $Na_4P_2O_7$, (●) $Na_5P_3O_{10}$, (●) $Na_6P_6O_{18}$, (●) $(NaPO_3)_{26}$	137
5.5. Resumen de las propiedades de los fosfatos y las PANs correspondientes.	138
5.6. Estabilidad de las PANs luego de (●) una hora y (●) 24 horas.	139
5.7. Movilidad electroforética de PANs para diferentes polifosfatos y fuerza iónica.	140
5.8. Dependencia de la movilidad electroforética y la morfología con la fuerza iónica de las siguientes PANs: (●) 2 mM $Na_5P_3O_{10}$; (●) 1 mM $Na_6P_6O_{18}$; (●) 0.2 mM $(NaPO_3)_{26}$	142
5.9. Datos representativos de ITC obtenidos (arriba) sin procesar y (abajo) integrados, obtenidos para la titulación de 1 mg/ml de PAH con las sales de fosfato estudiadas.	143
5.10. Isotermas de entalpía de la titulación de la solución de PAH 1 mg/ml con soluciones de fosfato en función de la concentración de las mismas: (●) Na_3PO_4 ; (●) $Na_4P_2O_7$; (●) $Na_5P_3O_{10}$; (●) $Na_6P_6O_{18}$; (●) $(NaPO_3)_{26}$	144
5.11. Isotermas de entalpía corregidas por el número de carga de los fosfatos correspondientes en función del radio molar R	145
5.12. Intensidad de dispersión de luz para las PANs formadas con PAH 1 mg/mL y los diferentes polifosfatos en función del pH	146
5.13. Rangos de estabilidad con el pH de los complejos PAH-polifosfatos: (●) Na_3PO_4 ; (●) $Na_4P_2O_7$; (●) $Na_5P_3O_{10}$; (●) $Na_6P_6O_{18}$; (●) $(NaPO_3)_{26}$	147
6.1. Bromuro de dodeciltrimetilamonio $C_{15}H_{34}NBr$ bromuro de dodeciltrimetilamonio (DTAB) tensoactivo catiónico de cadena simple. Su cabeza polar tiene como contraión bromo; el peso molecular es de 308.3 g/mol	154
6.2. (a) Esquema de la doble cadena de ADN con las longitudes características de la doble hélice y la configuración espacial de las bases nitrogenadas [29]. (b) Estructura molecular de las bases apareadas.	157
6.3. Resumen de la evolución de las señales de birrefringencia de una solución de ADN en función de la cantidad de DTAB presente y del campo aplicado	158
6.4. (a) Birrefringencia estacionaria en función del cuadrado del campo aplicado (b) Constantes de Kerr para los sistemas ADN/DTAB en función de la concentración de DTAB	159
6.5. Esquema de las exponenciales necesarias para describir el (a) build up y (b) la relajación señal de birrefringencia obtenida a 350 kV/m. (c) Tiempos de relajación para el sistema ADN + 0.2 mM DTAB en función del campo aplicado	160
6.6. Señal de birrefringencia de ADN libre a un campo aplicado efectivo de 500 kV/m, se observan tres tiempos de relajación característicos en la subida como en la bajada, dos rápidos y de signo contrario y uno más lento y negativo.	161

6.7.	Tiempos de relajación para el sistema ADN + (a) 1.3 mM DTAB y (b) 1.5 mM DTAB en función del campo aplicado	162
6.8.	Tiempos de relajación para el sistema ADN + 1.7 mM DTAB en función del campo aplicado	163
6.9.	Tiempos de relajación rápidos ajustados por la ecuación de Broersma para las mezclas de ADN con distintas concentraciones de DTAB	164
6.10.	Tiempos de relajación lentos ajustados por la ecuación de Broersma para las mezclas de ADN con distintas concentraciones de DTAB	164
6.11.	(a) Coeficiente de difusión rotacional y (b) relación entre dipolos permanentes e inducidos en función del campo efectivo aplicado para cada uno de los sistemas con ADN estudiados. La línea punteada indica el cambio de tendencia en R en las mezclas con baja concentración de DTAB. Las barras de error se quitaron para mayor claridad de la imagen (error de ajuste $\sim 5\%$)	165
6.12.	(a) Coeficiente de difusión rotacional y (b) relación entre la interacción interpartícula y los dipolos permanentes en función del campo efectivo aplicado para cada uno de los sistemas con ADN estudiados. La línea punteada indica el cambio de tendencia en δ/β en las mezclas con baja concentración de DTAB. Las barras de error se quitaron para mayor claridad de la imagen (error de ajuste $\sim 5\%$)	166
6.13.	(a) Coeficiente de estiramiento y (b) Coeficiente de difusión rotacional en función del campo efectivo aplicado para cada uno de los sistemas con ADN estudiados.	167
6.14.	(a) Coeficiente de difusión rotacional y (b) producto del parámetro A con la energía de interacción interpartículas δ en función del campo efectivo aplicado para cada uno de los sistemas con ADN estudiados.	168
6.15.	(a) Coeficiente de difusión rotacional y (b) cociente de la energía de interacción interpartículas δ con la contribución por dipolos permanentes β en función del campo efectivo aplicado para cada uno de los sistemas con ADN estudiados.	168
6.16.	Par de bases nitrogenadas, se marca en rojo las direcciones de polarización óptica de cada base de acuerdo a los cálculos efectuados por Takashima et al. [30]. Se observa que los dominios están contenidos en el plano que definen las bases.	169
6.17.	Esquema del fenómeno de polarización del ADN libre reportado. Al aplicar un campo eléctrico, los contraiones condensados (esferas rojas) se desplazan sobre la cadena, generando un desbalance de carga entre los extremos. Esto provoca una polarización inducida de la cadena y una orientación de la partícula en la dirección del campo. Por lo tanto, las bases nitrogenadas quedan perpendicular al campo al igual que la polarizabilidad óptica $\Delta\alpha^0$ de la partícula.	170
6.18.	Isotermas de tensión superficial para el sistema ADN/DTAB. Se muestra en puntos negros la isoterma correspondiente al DTAB libre. Tomado de la referencia [31].	171

6.19. Esquema del proceso de establecimiento de los dipolos inducidos. En un sistema que cumple que $L \sim \xi$, según Manning, se establece el típico dipolo inducido en la dirección del campo por la polarización de los contraiones condensados y, al establecerse un arreglo de partículas paralelas, los contraiones pueden saltar también cadenas paralelas, generando un dipolo inducido pero en la dirección perpendicular al campo. El tiempo de establecimiento de esta polarización es más lento porque depende del establecimiento y orientación que genera la primera.	175
B.1. Tensión superficial dinámica de 1 mg mL ⁻¹ PAA mezclado con G12 a la concentración de 10 ⁻³ mM. Se muestran las curvas para tres pHs: 3.5 (círculos) y 11 (cuadrados)	225
B.2. Tensión superficial dinámica de 1 mg mL ⁻¹ PAA mezclado con G12 a la concentración de 4 x 10 ⁻² mM. Se muestran las curvas para tres pHs: 3.5 (cuadrados), 6 (círculos) y 11 (triángulos)	226
B.3. Tensión superficial dinámica de 1 mg mL ⁻¹ PAA mezclado con G12 a la concentración de 0.1 mM. Se muestran las curvas para tres pHs: 3.5 (cuadrados), 6 (círculos) y 11 (triángulos)	227
B.4. Coeficientes elástico y viscosos obtenidos de experimentos de compresión y expansión súbita para el sistema 1 mg mL ⁻¹ PAA mezclado con G12 a la concentración de 4.10 ⁻² mM.	227
B.5. Resultados de XRR para una solución de 1 mg mL ⁻¹ PAA + 4 x 10 ⁻² mM G12. Reflectividad vs. vector de onda (Inset) Perfil de densidad electrónica (ED) obtenido con un ajuste modelo-independiente (línea negra) y con un modelo de caja (línea punteada roja)	228
B.6. Curvas de XRR para 1 mg mL ⁻¹ PAA + 10 ⁻³ mM G12 a pH 3, como función del tiempo de adsorción. El inset muestra el resultado de ajuste modelo-independiente; en este caso, la curva corresponde a un tiempo de adsorción de 142 min.	229
C.1. Tasa de cuentas para el PAH vs distintas concentraciones de varios polifosfatos	231
C.2. Imágenes TEM y funciones de autocorrelación obtenidas por DLS para los sistemas PAH-sales de fosfato	232

Índice de tablas

4.1. Resultado de los ajustes para los sistemas PAA/G12 en la interfaz líquido aire	101
4.2. Resultado de los ajustes para el sistema PAA a $c_s = 0.1$ mM y pH 11, como función del tiempo.	102

Complejos supramoleculares, en volumen y en interfaces, con potencial aplicación en nanomedicina

Lic. Hernán Martinelli

Resumen

La nanotecnología ha permitido avanzar sobre cuestiones que parecían impensadas, abriendo un nuevo campo de investigación básica y tecnológica. Su aplicación en la medicina no ha sido una excepción y la fabricación de sistemas nanoestructurados para transporte y liberación controlada de fármacos ha surgido como una alternativa promisoriosa para el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer o el Alzheimer. Sin embargo, la diversidad de las patologías de paciente a paciente provocan que se deba tener un control preciso de la ingeniería de estos nanotransportadores de forma de dar versatilidad y eficiencia a los tratamientos. Dentro de la variedad de estos sistemas emergen los complejos basados en polímeros ya que debido a su biocompatibilidad, solubilidad y potencial responsividad a estímulos se convierten en excelentes candidatos para su aplicación en nanomedicina.

Por ello, este trabajo de tesis se aboca al estudio de mezclas en solución acuosa de polielectrolitos y moléculas pequeñas de diversa índole, tales como tensoactivos, sales o agentes terapéuticos; junto con los complejos nanoestructurados que surgen de la misma. Por un lado se pretende abordar una caracterización fisicoquímica del proceso de ensamblado y las propiedades de los complejos resultantes; y por otro evaluar su utilización potencial como nanotransportadores de fármacos. Para tal fin, se han utilizado una gran diversidad de técnicas experimentales, tanto para caracterización volumétrica como interfacial. Entre ellas se destaca la implementación de la técnica de Efecto Kerr Electroóptico desarrollada en el curso de esta tesis.

En primer lugar se utilizará un sistema compuesto de polielectrolitos aniónicos y la droga anticancerosa hidrocloreto de doxorubicina para determinar las propiedades dieléctricas locales en sistemas de multicapas de polielectrolitos. También se presentarán dos sistemas responsivos a pH. El primero, mezcla de ácido poliacrílico (PAA) y el tensoactivo catiónico no comercial Gemini 12-2-12, se caracterizará en superficie y en volumen demostrándose que las interacciones polímero-surfactante dominan y determinan la estructura de agregados. Los mismos pueden ser modulados con el pH de forma de obtener un sistema responsivo a estímulos. El segundo sistema responsivo surge de la mezcla de hidrocloreto de polialilamina (PAH) y sales de polifosfato. A través de caracterizaciones morfológicas y termodinámicas se explicará y concluirá que la cantidad de grupos fosfato es determinante en la responsividad; obteniéndose nanopartículas con distintos rangos de estabilidad frente al pH. Finalmente, como sistema modelo de terapias génicas, se mostrarán resultados de un sistema mezcla de ácido desoxirribonu-

cléico (ADN) con un tensoactivo catiónico como el bromuro de dodeciltrimetilamonio (DTAB). El proceso de ensamblado y las interacciones que las producen en conjunto con las variaciones morfológicas se seguirán con Efecto Kerr Electroóptico.

Supramolecular complexes in bulk and interfaces for applications in nanomedicine.

Lic. Hernán Martinelli

Abstract

Nanotechnology has made possible to advance on issues that years ago seemed unthinkable, opening up a new field for scientific and technological research. Its application in medicine has not been the exception and the manufacture of nanostructured systems for transport and controlled release of drugs has emerged as a promising alternative to treatment of diseases such as cancer or Alzheimer. However, pathologies varies from patient to patient and consequently, the engineering of these nanocarriers must be precisely controlled in order to give versatility and efficiency to the treatments. Within the variety of carriers, polymer-based complexes emerge; due to their biocompatibility, solubility and potential responsiveness to stimuli they become plausible candidates for their application in nanomedicine.

Therefore, this thesis work focuses on the study of mixtures in aqueous solution of polyelectrolytes and small molecules of various kinds, such as surfactants, salts or therapeutic agents, together with the nanostructured complexes that arise from them. On the one hand, it is intended to get a physicochemical characterization of the assembly process and the properties of the resulting complexes; and on the other hand, to evaluate their potential as drug nanocarriers. To achieve this aim, a wide range of experimental techniques have been used, both for volumetric and interfacial characterization. Among them, the implementation of the Electrooptical Kerr Effect technique developed during the course of this thesis stands out.

Firstly, a system composed of anionic polyelectrolytes and an anticancer drug, Doxorubicin hydrochloride, will be used to determine local dielectric properties in polyelectrolyte multilayer systems. Then, two pH-responsive systems will be presented. The first one, a mixture of polyacrylic acid (PAA) and a non-commercial cationic surfactant Gemini 12-2-12, will be characterized in surface and volume, showing that polymer-surfactant interactions dominate and determine the aggregate structure. They can be modulated by pH in order to obtain a stimuli-responsive system. The second one, composed of polyallylamine hydrochloride (PAH) and several polyphosphate salts; through morphological and thermodynamic characterizations it will be shown and explained that the amount of phosphate groups is determinant in the responsivity; obtaining nanoparticles with different ranges of stability against pH. Finally, As a model system for gene therapies, results of a mixed system of deoxyribonucleic acid (DNA) with a cationic surfactant such as dodecyltrimethylammonium bromide (DTAB) will be shown. The assembly process and the interactions involved, together with morphological variations

will be followed by electro-optical Kerr effect

Certifico que fueron incluidos todos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.

Firma del director

Lista de publicaciones

Artículos publicados:

1. Cuenca, V. E., **Martinelli, H.**, Ramirez, M. D. L. A., Ritacco, H. A., Andreozzi, P., Moya, S. E. (2019). Polyphosphate poly (amine) nanoparticles: self-assembly, thermodynamics, and stability studies. *Langmuir*, 35(44), 14300-14309.
2. **Martinelli, H.**, Domínguez, C., Leyes, M. F., Moya, S., Ritacco, H. (2021). A pH-Responsive Foam Formulated with PAA/Gemini 12-2-12 Complexes. *Colloids and Interfaces*, 5(3), 37.
3. **Martinelli, H.**, Tasca, E., Andreozzi, P., Libertone, S., Ritacco, H., Giustini, M., Moya, S. E. (2022). Polarity studies of single polyelectrolyte layers in polyelectrolyte multilayers probed by steady state and life time doxorubicin fluorescence. *Journal of Colloid and Interface Science*, 607, 153-162.

Artículos en preparación:

1. Martinelli H., Leyes M. F., Cuenca E., Moya S. Ritacco H. A. Self assembled of pH responsive PAH nanoparticles: A Light Scattering and Electric birefringence Study. A ser enviado 2023 (PCCP o J. Phys. Chem. B)
2. Martinelli H., Leyes M. F. Ritacco H. A Interfacial dynamics of PAA/Gemini 12-2-12 complexes at the air-water interface. A ser enviado 2023 (Langmuir)
3. Martinelli H., Leyes M. F., Langevin D. Ritacco H. A DNA/DTAB complexation as studied by electric birefringence. A ser enviado 2023 (Macromolecules).

Parte I

Introducción y métodos

Capítulo 1

Introducción

1.1. Nanoremediación, alcances y desafíos

La consolidación de la nanociencia como un área del conocimiento ha permitido una expansión en la frontera científica tanto en el aspecto teórico como en el tecnológico. Esto se debe a la posibilidad de diseñar, sintetizar, manipular sistemas a niveles atómico, molecular o supramolecular de características fisicoquímicas únicas. Su aplicación se ha extendido por múltiples campos, tales como las industrias minerales, agrícolas y petrolíferas; aplicaciones electrónicas, en la generación, almacenamiento y distribución de energías verdes; y particularmente en cosmética y medicina. La implementación de estas nuevas tecnologías en el campo sanitario ha permitido el establecimiento de una rama del conocimiento llamada Nanomedicina, definida como la aplicación de la nanotecnología al diagnóstico, monitoreo, tratamiento y control de sistemas biológicos. Esta rama es una realidad, ya que se disponen en el mercado múltiples productos para diagnóstico y tratamiento de enfermedades, muchas veces en simultáneo (teragnosis). Por lo tanto, la nanomedicina posee el potencial para resolver muchos de los problemas a los que se enfrenta hoy la medicina convencional en cada una de sus áreas.

En particular, el tratamiento de enfermedades presenta una serie de limitaciones debida al actual paradigma de administración de medicamentos:

1. **Baja solubilidad:** muchos fármacos son hidrofóbicos y se dificulta alcanzar una formulación farmacéutica conveniente debido a que pueden precipitar en medio acuoso. El uso de solubilizadores aumenta la toxicidad de la formulación.
2. **Daño de tejidos por extravasación¹:** el escape inadvertido de drogas citotóxicas desde los vasos a los tejidos sanos produce daño en los mismos como por ejemplo necrosis tisular debido a medicamentos anticancerosos (p.ej. Doxorrubi-

¹Escape de sangre, linfa u otro líquido corporal desde un vaso sanguíneo o un tubo hacia el tejido que lo rodea.

cina).

3. **Rápida degradación de la droga *in vivo*:** luego de la administración la droga, ésta pierde actividad debido a los distintos ambientes fisiológicos presentes en el cuerpo.
4. **Farmacocinética desfavorable:** el fármaco se elimina rápidamente por los riñones y se necesita un mayor dosaje o una administración continua.
5. **Biodistribución pobre:** los fármacos se distribuyen en todo el cuerpo, lo que puede provocar efectos no deseados sobre tejidos sanos, provocando daños colaterales como por ejemplo, problemas cardíacos derivados de la cardiotoxicidad de la Doxorubicina.
6. **Falta de selectividad:** como se mencionó en el punto anterior, la distribución de la droga en todo el cuerpo provoca daños no deseados, lo que limita la cantidad de dosis administrada. La baja concentración de droga en el tejido objetivo resulta en efectos terapéuticos pobres.

Ante este escenario, los sistemas de almacenamiento y transporte de fármacos (*Drug delivery systems*, DDS) basados en nanotecnología tienen el potencial para solucionar cada uno de estos inconvenientes y realizar una revolución en el tratamiento de enfermedades, como el Alzheimer o el cáncer. Los DDS poseen el potencial para mejorar la solubilización y la estabilidad de los fármacos almacenados, así como para promover el transporte a través de las distintas barreras biológicas ², logrando especificidad y reduciendo el volumen de las dosis y la toxicidad. También pueden reducir la potencial extravasación protegiendo la carga hasta el punto de liberación, la cual puede ser activada por *disparadores* internos, tales como el pH o externos como campos eléctricos o magnéticos. Desde 1960, cuando se realizó la primera descripción del uso de nanotecnología para encapsulación de fármacos en liposomas [1] se han patentado cerca de 360 nuevas formulaciones que incluyen alguna nanotecnología. Sin embargo la cantidad de investigaciones en el área no se ve reflejada en la cantidad de patentes aprobadas para uso clínico. En la Figura 1.1 se muestra la tendencia creciente en los últimos años en las publicaciones que contienen la palabra **Nanomedicine** o **Nanopharmaceutic** arrojada por el portal *PubMed* [2].

²Conjunto de mecanismos que permite a los animales y otros seres vivos reconocer en el organismo las sustancias extrañas, neutralizarlas y eliminarlas.

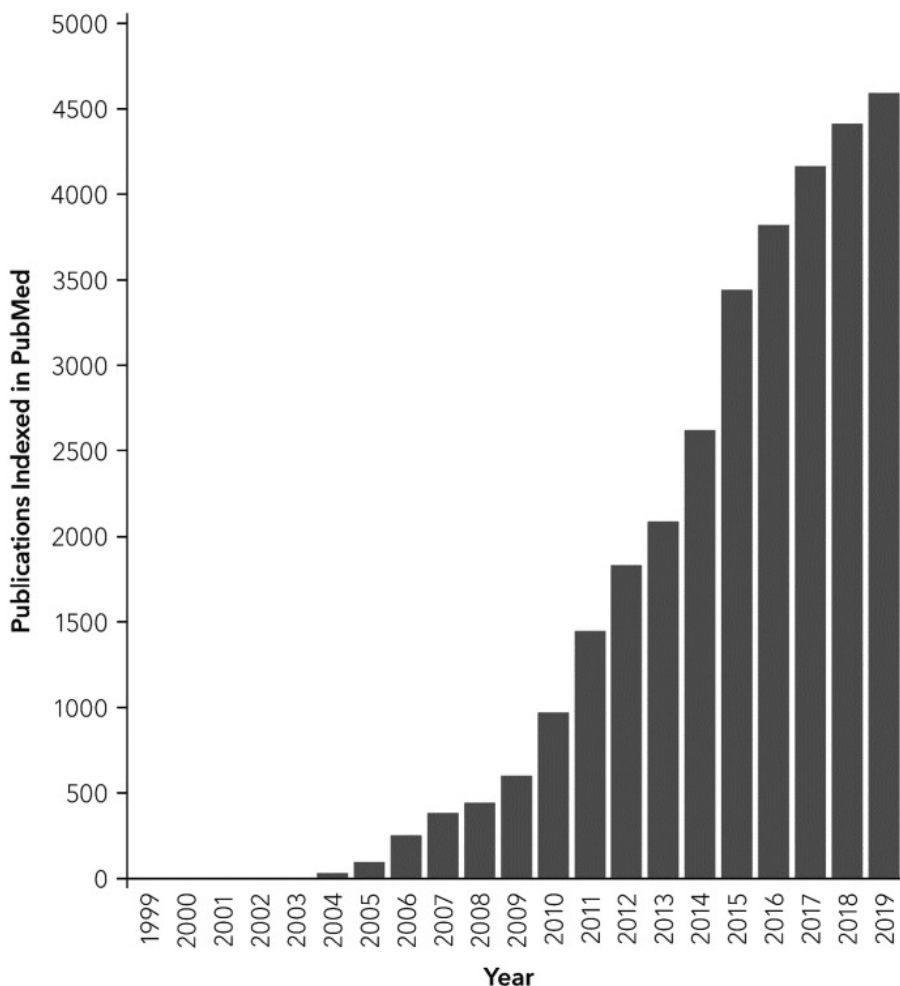


Figura 1.1: Número de publicaciones por año que contienen la palabra **Nanomedicine** o **Nanopharmaceutic** indexadas en el portal *PubMed* [2]

Una de las limitaciones en ésta área viene dada por la diferencia en la transición de estudios en animales a humanos [3, 4]. Esto es debido a la falta de conocimiento de las diferencias fisiológicas y patológicas entre especies animales modelo y humanos, específicamente cómo estas diferencias influyen en el comportamiento y la funcionalidad de las nanomedicinas en el cuerpo [5]. Asimismo las diferencias entre especies no son el único factor que limitan la transición a la clínica. La heterogeneidad entre pacientes puede limitar el éxito de las nanomedicinas, y actualmente hay poco reportado acerca de las interacciones de nanomedicinas y poblaciones de pacientes estratificadas. Por este motivo, de las nanomedicinas que se encuentran aprobadas, sólo unas pocas se recomiendan como primeras opciones de tratamiento, y la acción farmacológica es efectiva sólo en un pequeño subgrupo de pacientes [6]. Esto es debido, en parte a la inexplorada heterogeneidad en los fundamentos biológicos de las enfermedades, es de-

cir, la falta de comprensión del particular crecimiento, estructura y fisiología del tejido enfermo paciente a paciente.

Es por eso que las primeras formulaciones de DDS no fueron capaces de atravesar estas barreras biológicas para lograr el transporte de la carga, pero diseños más recientes de nanopartículas han utilizado avances en estrategias de síntesis controladas para incorporar arquitecturas complejas, fracciones bioresponsivas y agentes de *targeting*³ para mejorar el transporte [7–10]. Además, estas nanopartículas pueden ser utilizadas como sistemas más complejos que permitan alterar múltiples vías de señalización de procesos celulares, maximizar la eficacia terapéutica sobre macromoléculas específicas, accionar sobre una fase deseada del ciclo celular o sobreponerse a los mecanismos de resistencia a los medicamentos. Dependiendo de la patología, el microentorno que la rodea, la vía de administración, entre otras, se pueden diseñar sistemas específicos que aumenten la eficiencia del transporte y el targeting. **Para ello, lograr una caracterización inicial de las propiedades fisicoquímicas de los nanotransportadores y entender los mecanismos físicos que las controlan es fundamental; parte del éxito de los mismos dependerá de la forma, el tamaño, la carga superficial, la ingeniería de la superficie, etc;** tal como se esquematiza en la Figura 1.2. Como tendencias generales se puede mencionar que las partículas cilíndricas extravasan más que las esféricas o que las cargadas positivamente o sin cobertura son más propensas a ser eliminadas por macrófagos. Sin embargo, localmente en el punto de acción la extravasación es deseada, por lo que en microambientes tumorales las partículas cilíndricas y funcionalizadas en superficie son más efectivas. En esta tesis se mostrarán múltiples formas de caracterización de sistemas nanoestructurados en soluciones acuosas o salinas con el fin de determinar desde la mesada del laboratorio su potencial como nanotransportadores. Esto se logrará a través de la comprensión de los procesos físicos subyacentes en el proceso de ensamblado supramolecular y como dichos procesos determinan las características fisicoquímicas de los complejos (carga superficial, tamaño, forma, entre otros).

³Anglicismo utilizado para referirse a los procesos o mecanismos ideados para dirigir de forma específica, el fármaco al órgano, tejido o célula afectado por la enfermedad o dolencia a tratar.

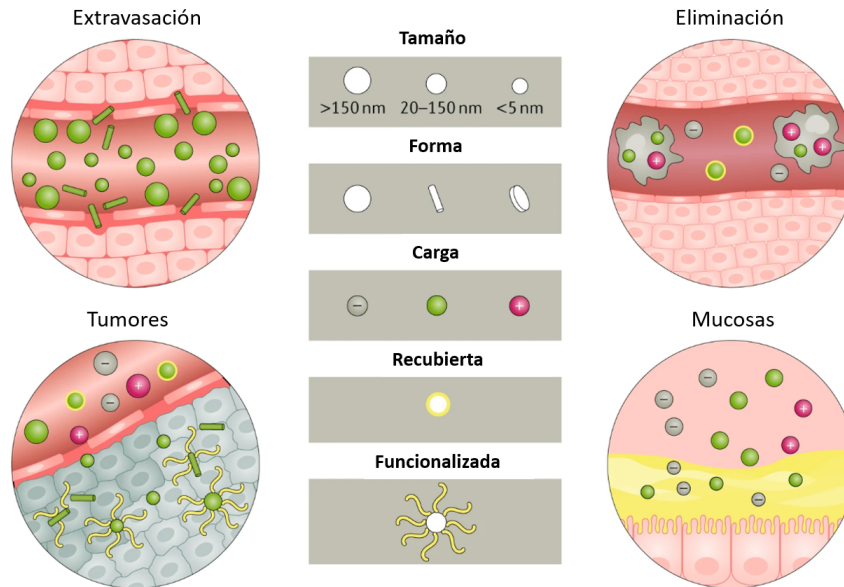


Figura 1.2: Factores como el tamaño, la forma, la carga y la funcionalización superficial determinan lo que sucede con las nanopartículas en el torrente sanguíneo y como interactúan con las barreras locales como los microambientes tumorales o las mucosas. Imagen adaptada de referencia [11]

Con este panorama y apuntando a una nanomedicina orientada al paciente, la generación de nanotransportadores estímulo-respuesta que permitan la liberación controlada de agentes terapéuticos se presenta como una solución versátil frente a los desafíos más importantes de la administración de fármacos. La clasificación de estos DDS se puede realizar en base al origen de los estímulos a los que se somete la nanopartícula para provocar una respuesta, como el calentamiento o la liberación de la carga. Los estímulos pueden ser internos, debido a las características del entorno (como el pH o la cantidad de oxígeno) y la interacción con agentes, como anticuerpos o enzimas; o externos, provenientes de fuentes extracorporales como por ejemplo, campos magnéticos, luz o ultrasonido, como se muestran en la Figura 1.3

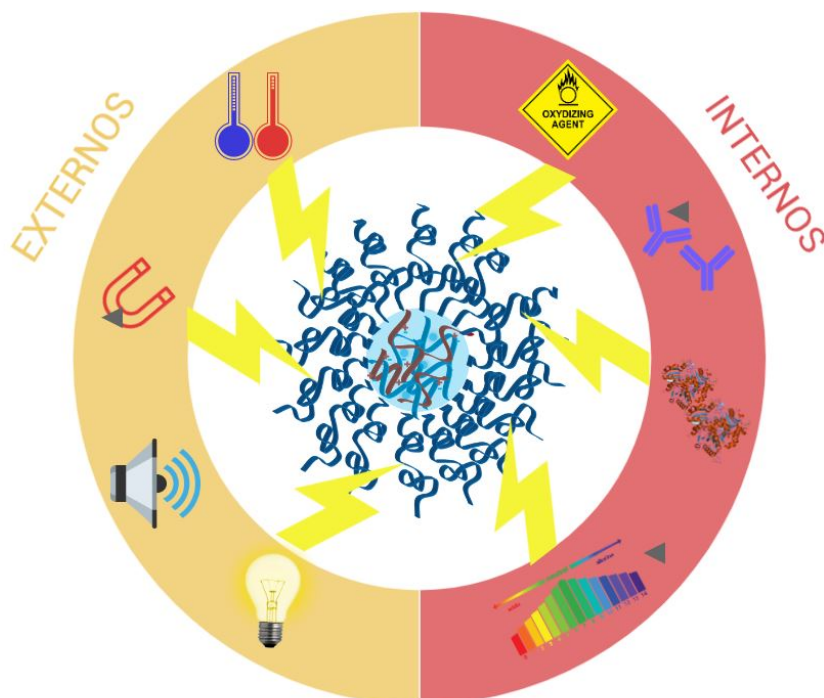


Figura 1.3: Ejemplos de estímulos o triggers que pueden utilizarse para liberación controlada en DDS. Externos: temperatura, campos magnéticos, ultrasonido, luz. Internos: Redox, anticuerpos, enzimas, pH.

Por ejemplo, los microambientes tumorales tienen la particularidad de que la cantidad de oxígeno disminuye a medida que se penetra en el tejido, generando hipoxia y en consecuencia, altas concentraciones CO_2 y aumento del ácido láctico que provoca acidificación en la matriz extracelular. Por lo tanto, estas condiciones son ideales para nanotransportadores sensibles a estímulos internos, como el pH, para explotar la liberación de agentes terapéuticos en las inmediaciones del tumor. Otro entorno en el que se pueden aprovechar las ventajas de este tipo de nanotransportadores es en el intracelular, ya que las diferencias de pH entre distintos orgánulos⁴ puede utilizarse para la liberación selectiva, tanto de fármacos como de cargas para diagnósticos por imagen (fluoróforos). La principal desventaja que presentan este tipo de sistemas es la posibilidad de degradación prematura del transportador y la liberación de la carga. Por lo tanto es necesaria una caracterización extensiva de las propiedades estructurales y los rangos de estabilidad frente al pH de los mismos. En este trabajo de tesis se realizaron estos estudios en dos sistemas de polielectrolitos responsivos a pH, uno mezclado con sales de fosfato y otro con un tensoactivo no comercial.

Por estas razones, el control preciso de la ingeniería de las nanopartículas per-

⁴Compartimentos intracelulares que cumplen funciones determinadas en el ciclo de vida celular.

mitirá una aplicación eficaz de esta tecnología, realizando formulaciones personalizadas y ubicando a la nanomedicina como una alternativa viable y de primera línea en el tratamiento de enfermedades.

1.1.1. Tipos de nanotransportadores

Tomando en cuenta los componentes de los transportadores (*carriers*) estos se pueden clasificar en tres tipos: poliméricos, inorgánicos y lipídicos. Los mismos se esquematizan en la Figura 1.4 junto con un resumen de sus ventajas y desventajas. Muchas investigaciones buscan combinar componentes de un tipo y de otro para maximizar las ventajas. A continuación se presentará una breve descripción de cada uno, ejemplos y aplicaciones.

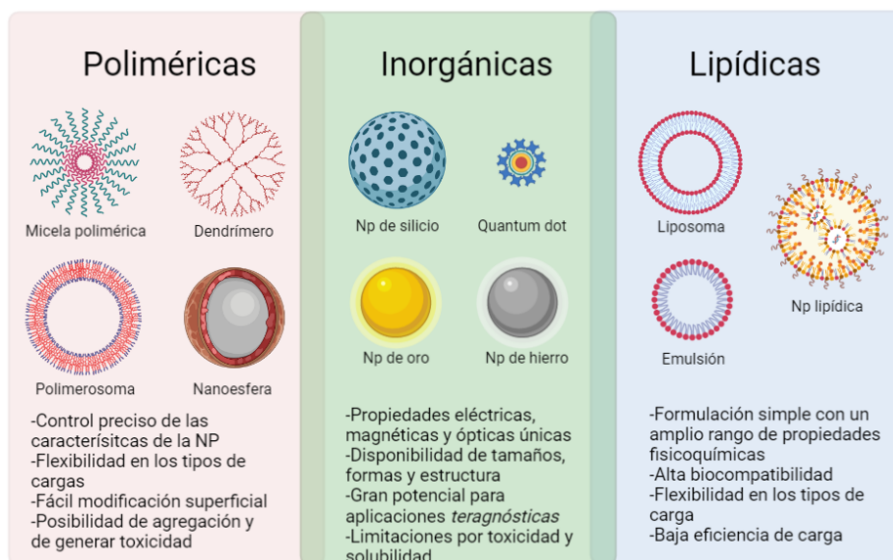


Figura 1.4: Clasificación de nanopartículas utilizadas como DDS según sus constituyentes.

Complejos basados en lípidos

Las nanopartículas basadas en lípidos se caracterizan típicamente por ser plataformas esféricas compuestas por al menos una bicapa lipídica que rodea como mínimo un compartimiento acuoso interno. Como sistema de transporte presenta muchas ventajas incluyendo la simpleza en la formulación, autoensamblado, biocompatibilidad, alta biodisponibilidad, capacidad de transportar cargas de peso molecular alto y un espectro de propiedades fisicoquímicas que pueden ser controladas para modular sus características biológicas [12, 13]. Por estas razones, las nanopartículas lipídicas son el tipo más común de nanomedicina aprobado por la Administración de alimentos y medicamentos estadounidense (FDA) [6, 14].

Las más conocidas son los liposomas, compuestos por fosfolípidos, los cuales pueden formar estructuras vesiculares uni- y multilaminares. Esto permite que el liposoma pueda transportar medicamentos hidrofílicos, hidrofóbicos y lipofílicos, y hasta incluso encapsular compuestos hidrofílicos y lipofílicos en el mismo sistema, expandiendo así su versatilidad [15]. Su estabilidad *in vitro* e *in vivo* se ve alterada por el tamaño, la carga superficial, la composición lipídica, el número de capas y las modificaciones superficiales que pueden agregarse durante la síntesis (con ligandos o polímeros) [12, 16]. Debido a que pueden ser rápidamente capturados por el sistema reticuloendotelial⁵, los liposomas usualmente incluyen modificaciones superficiales para mejorar su circulación y mejorar el transporte, lo que ha permitido su uso clínico [13, 17].

Complejos inorgánicos

Se han utilizado materiales inorgánicos, como el oro, hierro y silicio para sintetizar materiales nanoestructurados para aplicaciones en DDS e *imaging*. Estas partículas son formuladas con precisión y pueden ser fabricadas con una amplia variedad de tamaños, estructuras y geometrías. Las nanopartículas de oro son el sistemas más extensivamente estudiado y se utilizan en múltiples formas: nanoesferas, nanotubos, nanoestrellas, nanocápsulas y nanojaulas [18]. Adicionalmente, las nanopartículas inorgánicas tienen propiedades físicas, eléctricas, magnéticas y ópticas únicas debido al material base con el que están hechas. Por ejemplo, las nanopartículas de oro poseen electrones libres en su superficie que pueden oscilar continuamente a una frecuencia que depende del tamaño y la forma, dando así distintas propiedades fototérmicas [19]. También pueden ser fácilmente funcionalizadas, dándoles propiedades adicionales que optimicen el transporte [18].

El óxido de hierro es otro material comúnmente investigado para síntesis de nanopartículas, las cuales dentro de las nanomedicinas inorgánicas, son las que tienen mayor aprobación por la FDA [20]. Las nanopartículas de óxido de hierro poseen propiedades paramagnéticas a ciertos tamaños y se ha demostrado con éxito su función como agentes de contraste para diagnóstico por imagen, DDS y para terapia térmica [21]. Otras nanopartículas inorgánicas ampliamente estudiadas son los fosfatos de calcio y las mesoporosas de sílice, las cuales han sido utilizadas exitosamente para transporte de fármacos y genes [22]. Los puntos cuánticos (*Quantum dots*), fabricados típicamente de materiales semiconductores, son nanopartículas únicas utilizadas mayormente en aplicaciones de *imaging in vitro*, pero tienen el potencial para desarrollar aplicaciones para diagnóstico *in vivo*. [23, 24]

La mayoría de estos tiene alta biocompatibilidad y estabilidad, llenando el nicho de aplicaciones que son inalcanzables para los materiales orgánicos. Sin embargo, su aplicación clínica está limitada por la baja solubilidad y la toxicidad, especialmente en formulaciones que utilizan metales pesados. [21, 25].

⁵Sistema funcional del cuerpo que participa principalmente en la defensa frente a las infecciones y en la eliminación de los productos de degradación celular

Complejos basados en polímeros

Las nanopartículas poliméricas pueden sintetizarse con materiales naturales o sintéticos, así como de monómeros o polímeros preformados, lo que permite una amplia variedad de estructuras y características posibles. Pueden ser formulados para permitir un control preciso de múltiples características de las nanopartículas resultantes y generalmente son excelentes plataformas de transporte por su biocompatibilidad y su formulación simple. Las nanopartículas poliméricas se sintetizan usando técnicas como emulsificación [26], nanoprecipitación [27, 28], gelación iónica [29] y microfluídica [30], resultando en productos finales diferentes. También presentan versatilidad en la carga del fármaco: los medicamentos pueden ser encapsulados dentro del núcleo de las nanopartículas, entrecruzados con la matriz polimérica, ser conjugados a los polímeros o unidos a la superficie de la nanopartícula. Esto permite el transporte de varias cargas incluyendo compuestos hidrofílicos e hidrofóbicos en simultáneo, así como cargas con diferentes pesos moleculares como moléculas pequeñas, macromoléculas biológicas, proteínas, etc [30–36]; haciendo que las nanopartículas poliméricas sean ideales para aplicaciones de co-transporte [37]. A través de la modulación de propiedades como composición, estabilidad, responsividad y carga superficial, la eficacia de la carga y la cinética de liberación de los medicamentos puede ser controlada con precisión [38, 39].

Las formas más comunes de nanopartículas poliméricas son las nanocapsulas (cavidades rodeadas por una membrana polimérica) y las nanoesferas (sistemas de matriz sólida). Dentro de estas categorías, las nanopartículas se clasifican según su forma como polimerosomas, micelas y dendrímeros. Los polimerosomas son vesículas, con membranas fabricadas de copolímeros en bloque anfifílicos. Son similares a los liposomas y usualmente son responsivos localmente. Adicionalmente se ha reportado una mejor estabilidad y retención de la carga [40], lo que los hace vehículos efectivos para el transporte de medicamentos en el citosol⁶ [41]. Algunos polímeros que son comúnmente copolimerizados para estas aplicaciones son el polietilenglicol (PEG) y el polidimetilsiloxano (PDMS). Por otro lado, las micelas poliméricas, también compuestas típicamente por copolímeros en bloque responsivos, se autoensamblan para formar nanoesferas con un núcleo hidrofílico y un recubrimiento hidrofóbico: esto funciona como protección para cargas acuosas de medicamentos y mejora la circulación del transportador. Las micelas poliméricas pueden cargarse con varios agentes terapéuticos, desde pequeñas moléculas a proteínas.[42]. Los dendrímeros son polímeros ramificados con arquitecturas tridimensionales las cuales permiten un alto control de la masa, tamaño, forma y química superficial. Los grupos funcionales activos presentes en el exterior de los dendrímeros permiten la conjugación de biomoléculas o agentes de contraste a la superficie, mientras que las drogas pueden ser cargadas en el interior. Los dendrímeros se pueden cargar con muchos tipos de moléculas, pero los más investigados son los sistemas que transportan ácidos nucleicos y moléculas pequeñas [43, 44]. Para estas aplicaciones se utilizan comúnmente polímeros cargados como la polietilimina (PEI) y la poliamidoa-

⁶Mezcla compleja de sustancias disueltas en agua que se encuentra en el interior de las células y constituye la mayoría del fluido intracelular

mina (PAMAM). Varios productos basados en dendrímeros se encuentra actualmente en pruebas clínicas como agentes teragnósticos ⁷, de transfección ⁸, geles tópicos y agentes de contraste [44–46].

Los polímeros cargados también pueden ser usados para formar nanopartículas no dendríticas. Los polielectrolitos son un ejemplo: estos polímeros están compuestos por unidades repetitivas que en solución se disocian de sus contraiones, convirtiéndose el conjunto en un macroión. Debido a esto se pueden lograr formulaciones mezclándose con moléculas pequeñas cargadas, ya sea para afectar su conformación, carga o flexibilidad. Algunos polielectrolitos presentan responsividad natural a estímulos manifestándose a través de la cantidad iones disociados, variando así su carga superficial total. Los polielectrolitos han sido incorporados en numerosas formulaciones de nanopartículas para mejorar propiedades como la biodisponibilidad [47] y el transporte a través de mucosas [48]. Sobre este subgrupo se hará énfasis en este trabajo.

En general, las nanopartículas poliméricas son candidatas ideales para DDS porque son biodegradables, se pueden dispersar como coloides en solución, son biocompatibles, biomiméticas y estables durante el transporte. Sus superficies pueden ser fácilmente modificadas con moléculas funcionales [49], permitiendo el transporte de drogas, proteínas y material genético a los tejidos deseados, lo que las hace útiles para tratamiento de cáncer, terapia génica y diagnósticos. Las limitaciones de este tipo de nanopartículas incluyen un alto riesgo de agregación y toxicidad. Solo un pequeño número de nanomedicinas poliméricas están aprobadas por la FDA y utilizadas en la clínica, pero en la actualidad se están evaluando numerosos transportadores poliméricos en pruebas clínicas [6].

1.1.2. Características de los complejos con base en polielectrolitos

Por lo mencionado anteriormente, en esta tesis se estudiarán complejos basados en polielectrolitos para su implementación en nanomedicina desde un punto de vista fisi-coquímico. Para ello, se utilizarán mezclas con otros componentes de carga opuesta tales como surfactantes, sales, fármacos y otros polielectrolitos. A continuación se definirán algunos conceptos y fenómenos recurrentes que emergen de estas interacciones.

Polielectrolito es el término utilizado para clasificar macromoléculas que tienen muchos grupos cargados o con posibilidad de ionizarse cuando se disuelven en solventes polares, predominantemente agua [50]. Los polielectrolitos se disocian en un macroión y contraiones en solución acuosa. Las soluciones de polielectrolitos se caracterizan por una fuerte interacción electrostática entre el macroión y los pequeños contraiones. Estas interacciones juegan un rol importante en la estructura de los polielectrolitos, en el comportamiento de biopolímeros (ADN, proteínas) y en la complejación en soluciones mixtas de polielectrolitos y analitos de carga opuesta. La mayoría de las teorías desa-

⁷Dispositivos que permiten la implementación conjunta de diagnóstico y terapia/tratamiento de enfermedades

⁸Acción de introducir material genético externo en células eucariotas

rolladas para entender como se relacionan los polielectrolitos en solución con las otras especies se basan en la condensación de contraiones. Según la teoría de condensación desarrollada por Manning [51] una parte de los contraiones se asocia al macroión de manera electrostática de una manera particular. La idea básica de esta teoría es que la densidad de carga lineal del macroión no puede exceder un determinado valor crítico. El valor crítico viene dado por el potencial a lo largo de la cadena: este no debe exceder el valor de $k_B T/e$, siendo k_B la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta y e la carga elemental del electrón. Para evitar dicho exceso de carga los contraiones intervienen para neutralizarla, lo que genera que parte de los contraiones libres condensan en la cadena polimérica en una posición cercana a los grupos cargados del polímero. Esto provoca que la energía de la repulsión entre grupos cargados vecinos sea igual que la energía térmica, $k_b T$. Según la teoría, se puede definir un parámetro de densidad de carga, η , como la razón entre la longitud de Bjerrum, l_b , (distancia en la que la interacción electrostática entre dos cargas se iguala a la energía térmica) y la distancia entre cargas adyacentes, $N.b$, donde N es el número de monómeros que separan los grupos cargados y b es el tamaño del monómero [51]. Cuando $\eta > 1$, se produce el fenómeno de condensación, reduciéndose la densidad de carga efectiva hasta un valor mínimo, con los contraiones situados a una distancia de las cargas de la cadena polimérica igual a la longitud de Bjerrum. Todo lo anterior permite definir la fracción de contraiones libres o grado de disociación como $f = 1/\eta$. El trasfondo físico de la condensación de contraiones es la competencia entre una ganancia de energía en la interacción electrostática entre ambas especies y una pérdida de entropía al ordenar los contraiones cercanos al macroión.

Otra característica típica de los polielectrolitos es la alta expansión o "stretching" de la cadena debido a la fuerte repulsión electrostática entre los segmentos cargados [52]. A pesar de ello, la conformación de los mismos en solución es dependiente de varios factores, tales como la concentración de polielectrolito, de sal, el largo de la cadena, etc. Aún las cadenas más rígidas no adoptan una configuración completamente extendida. Varias teorías basadas en física estadística se han desarrollado para dar un panorama de la conformación de polielectrolitos en solución, siendo Flory [53, 54] y de Gennes [52, 55] sus máximos contribuyentes. No es la idea hacer un desarrollo extensivo de las mismas, pero se utilizarán algunos resultados que emergen de ellas, y para ello se introducirán las siguientes longitudes características, esquematizadas en la Figura 1.5:

1. Longitud extendida L : longitud de máximo estiramiento del polímero. Se calcula como el número de monómeros (N) por la separación entre ellos (\mathbf{A}).
2. Longitud de persistencia l_p : longitud a partir de la cual no se observa correlación entre los segmentos de la cadena polimérica. Superado este valor, un polímero se considera flexible. Tiene contribución intrínseca (estérica) y una electrostática.
3. Distancia extremo a extremo (end to end) R_{ee} : distancia en línea recta entre los puntos extremos de un polímero. Se calcula estadísticamente según la conformación del polímero. Sin embargo se utilizará una ley de escala provista por de

Gennes.

- Radio hidrodinámico: es el radio de una esfera equivalente que posea el mismo coeficiente de difusión que el polímero.

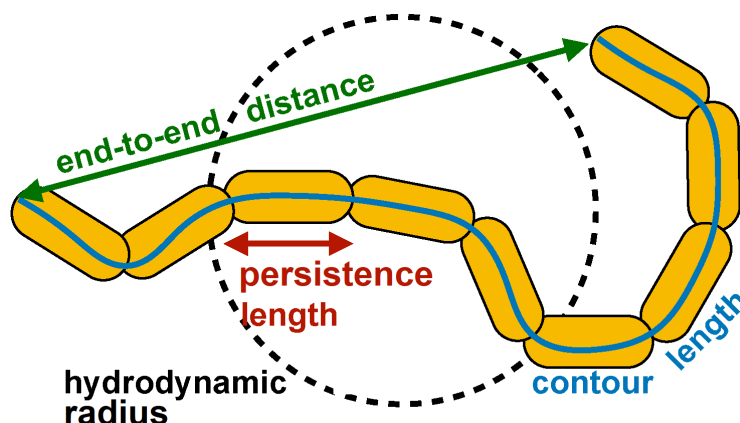


Figura 1.5: Esquema de longitudes características de un polímero

Estas magnitudes se ven afectadas cuando se producen interacciones con otras moléculas. En el caso de la interacción con sales de carga opuesta, al sistema se le agregan contraiones por lo que se produce un efecto de apantallamiento eléctrico. En muchos casos los contraiones se asocian al polímero disminuyendo la repulsión entre los monómeros y provocando una disminución en la longitud de persistencia, llegando en algunos casos a provocar el colapso del polielectrolito a configuraciones globulares, como se verá en el Capítulo 5. En soluciones acuosas con contraiones monovalentes, la renormalización de cargas estabiliza la suspensión coloidal frente a la separación de fases. En presencia de iones multivalentes, donde las capas de contraiones condensados en diferentes coloides pueden encontrarse fuertemente correlacionados, puede producirse la atracción entre los coloides, dando lugar a la separación de fases.

En el caso particular del proceso de agregación de polielectrolitos y tensoactivos de cargas opuestas, este está controlado y dirigido tanto por interacciones electrostáticas como hidrofóbicas, lo cual da lugar a un comportamiento de fases muy rico y complejo [56–58]. Esto es debido principalmente a la naturaleza anfifílica de los tensoactivos iónicos, los cuales están compuestos por una cabeza polar y una cadena alquílica apolar. En consecuencia, la formación de los complejos polielectrolito-tensoactivo puede resultar en una separación de fases, en un coloide estable en dispersión acuosa o en complejos solubles, dependiendo de parámetros tales como la densidad de carga del polielectrolito, la flexibilidad (o rigidez) de la cadena, el peso molecular, el grado de ramificación, la relación de cargas entre polielectrolito y tensoactivo, el tipo de contra-iones del polímero y del tensoactivo, el balance hidrofílico/hidrofóbico del tensoactivo y de los grupos quím-

micos en el polímero, la presencia de otros componentes, como sal, así como también de las condiciones físicas como pH, temperatura, etc. Debido al gran número de variables involucradas que deben tenerse en cuenta, la búsqueda de generalidades en las características y en el comportamiento de estos sistemas es una tarea ardua, especialmente cuando se considera que todas las propiedades dependen del sistema químico específico en estudio. A pesar de estas dificultades, se puede dar el siguiente panorama general simplificado acerca del comportamiento de los sistemas polielectrolitos-tensoactivo en solución acuosa: a medida que un tensoactivo de carga opuesta se agrega a una solución de un polielectrolito, las moléculas del tensoactivo iónico reemplazan progresivamente el contra-ión del polielectrolito, proceso impulsado principalmente por una ganancia entrópica. A baja concentración del tensoactivo, este intercambio iónico no conduce necesariamente a la formación de agregados polímero-tensoactivo. Este proceso de intercambio de contra-iones no produce, en general, cambios apreciables en las propiedades de volumen del sistema observables usando técnicas como dispersión de luz o conductividad eléctrica. Sin embargo, sí son observables usando técnicas más sensibles al ambiente de cargas del polielectrolito como lo es el efecto Kerr desarrollado en el cuerpo de esta tesis [59, 60].

A medida que la concentración del tensoactivo aumenta, éste finalmente condensa sobre la cadena de polímero, cerca de los grupos con carga. Esto ocurre a cierta concentración específica, característica del sistema polielectrolito-tensoactivo, llamada concentración de agregación crítica (CAC). Este fenómeno es cooperativo, de allí la palabra crítica, lo cual quiere decir que la probabilidad de que un ión de tensoactivo condense sobre la cadena de polímero se incrementa si ya hay moléculas asociadas a la cadena en un sitio adyacente. La CAC es normalmente entre 1 y 3 órdenes de magnitud menor que la concentración micelar crítica, CMC, del tensoactivo. La CAC puede determinarse mediante calorimetría [61], conductimetría y tensión superficial, entre otras técnicas. El método más utilizado para determinar la CAC y al mismo tiempo la cantidad de tensoactivo asociado al polielectrolito es la potenciometría con electrodo selectivo [62].

En el caso de utilizar tensión superficial, la CAC se asigna al inicio de un plateau en la isoterma de tensión [63]. En la Figura 1.6 se muestra esquemáticamente una isoterma típica, donde se representa la tensión superficial de la interfaz entre la disolución y el aire en función de la concentración del tensoactivo (a concentración de polímero constante). La concentración marcada como T1 en la figura corresponde a la CAC mientras que la T2 se asocia a la concentración a la cual todos los sitios de unión sobre el polímero han sido ocupados por el tensoactivo. Por encima de esta concentración los agregados se vuelven hidrofóbicos y se inicia una separación de fases, los agregados precipitan. En algunos sistemas, si se incrementa aún más la concentración, estos precipitados se redispersan [58], esta concentración corresponde a la T3 en la Figura 1.6, y es generalmente mayor a la CMC. La formación de agregados en volumen tiene una réplica en una propiedad interfacial, como la tensión superficial. La relación entre las propiedades en volumen y en la interfaz es de interés para el desarrollo de esta

tesis doctoral, ya que ambas propiedades se encuentran acopladas por la igualdad de los potenciales químicos de cada componente de la mezcla.

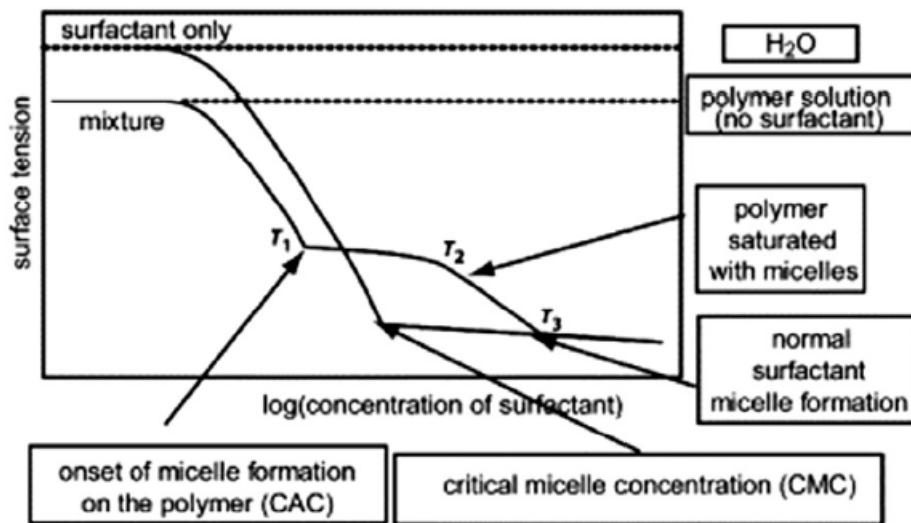


Figura 1.6: Isoterma de tensión superficial típica para mezclas de algunos polielectrolitos con tensoactivos

En relación con la estructura de los complejos, Hansson y Almgren [64–66] han mostrado que los agregados de moléculas de tensoactivos formados en presencia de un polielectrolito son similares a las micelas que se forman en disoluciones de tensoactivos puros, siendo la principal diferencia la concentración a la cual estas micelas se forman (CAC mucho menor que CMC), inducido por la presencia del polielectrolito. Estos resultados son los que dieron lugar al modelo de collar de perlas para los complejos polielectrolito-tensoactivo [67], que consiste en micelas de tensoactivo decorando las cadenas de polímeros, como las perlas de un collar (ver Figura 1.7). Sin embargo, hay numerosas evidencias experimentales que muestran que los complejos pueden ser compactos o suaves, monodispersos o polidispersos, tipo bastón o esféricos o con cualquier otra morfología, dependiendo de las características del polielectrolito y del tensoactivo [68]. Esta versatilidad es lo que los hace tan atractivos a la hora de encarar una aplicación nanomédica.

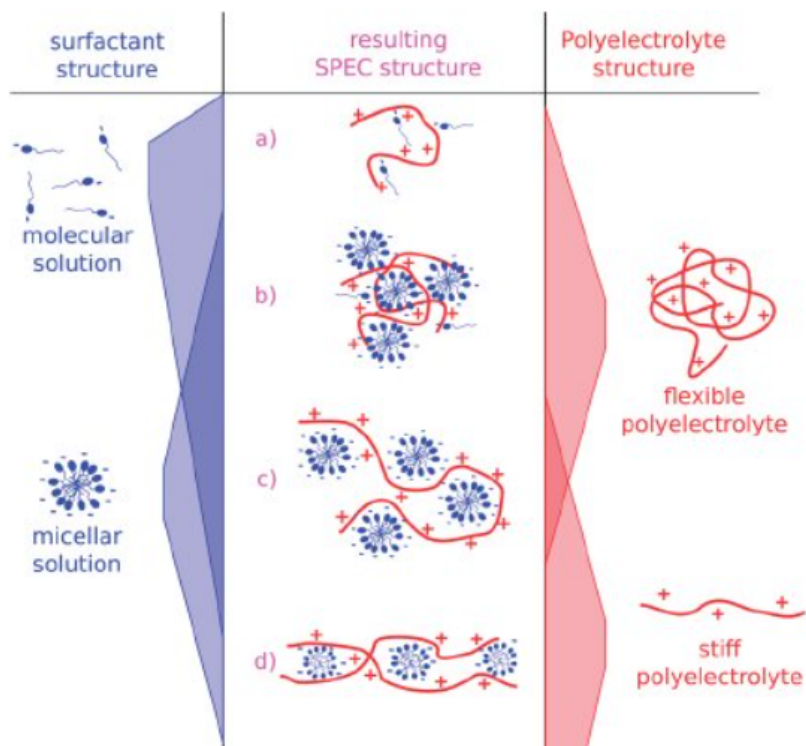


Figura 1.7: Descripción esquemática de posibles arreglos de complejos polielectrolito-surfactante: (a) polielectrolito decorado con surfactantes; (b) Micelas altamente empaquetadas unidas por un polielectrolito; (c) estructura tipo collar de perlas; (d) agregado tipo barra de micelas con un polielectrolito rígido.

Por último, dentro de las interacciones entre polielectrolitos de carga opuesta se mencionaran las características de los ensamblados en multicapas. Estos ensamblados se pueden utilizar para producir nanocápsulas con aplicación en nanomedicina [69]. El término multicapas de polielectrolitos hace referencia a sistemas construidos por la adsorción sucesiva y alternada de películas de polielectrolitos con carga opuesta sobre un sustrato cargado. Idealmente cada ciclo de ensamblado (como se explicará en el Capítulo 4) produce la liberación de moléculas pobremente ligadas y una sobrecompensación de la carga en la nueva capa, produciendo un cambio de signo en la misma [70]. Esto permite que en la siguiente deposición, el polielectrolito encuentre un entorno eléctrico favorable para la adsorción. El proceso da como resultado un sistema autoensamblado, siendo la fuerza electrostática la principal impulsora del ensamblado junto con efectos entrópicos debido a la liberación de los contraiones en la adsorción de la nueva capa [71, 72]. Para describir la sobrecompensación de cargas se han definido dos tipos de compensación, intrínseca y extrínseca [73, 74]. En la compensación intrínseca, las cargas de un polielectrolito son balanceadas por las cargas del polielectrolito de carga opuesta. En contraste, en la compensación extrínseca son balanceadas en parte por los contraiones de las soluciones salinas en las que están disueltos los polímeros. En

este último caso, la fuerza iónica juega un papel predominante en la arquitectura de las multicapas, logrando por ejemplo estructuras más estratificadas.

Durante el crecimiento de las multicapas, se han realizado modelos sobre la estructura básica de las mismas. El más aceptado postula que el crecimiento de multicapas da lugar a tres zonas [74] como se esquematiza en la Figura 1.8. Las tres zonas difieren entre sí tanto química como estructuralmente, sin embargo se pueden realizar algunas generalizaciones. La Zona I compuesta por las primeras capas, cuyo espesor dependerá de la naturaleza del sustrato. La Zona III está formada por las capas más cercanas a la superficie de la multicapas. En esta zona las características de la superficie externa están influenciadas por la interacción con el medio que rodea a la multicapa. Esta zona se desplaza a medida que se depositan sucesivas capas, ampliando de esta manera la Zona II. La Zona II, presenta unos límites difusos, constituye el seno de la multicapa y no se ve influenciada ni por el entorno exterior ni por el sustrato. En general, la Zona II muestra un carácter neutro, sin embargo las Zonas I y III presentan una cierta carga efectiva. El modelo expuesto anteriormente solo es adecuado cuando el número de capas depositadas es lo suficientemente grande ya que cuando el número de capas es bajo, el modelo se reduce exclusivamente a las Zonas I y III. A medida que se añaden sucesivas capas la Zona II se amplía poco a poco debido a que la nueva capa pasa a formar parte de la Zona III y la capa que se encuentra difusa entre la Zonas II y III pasa a formar parte de la Zona II.

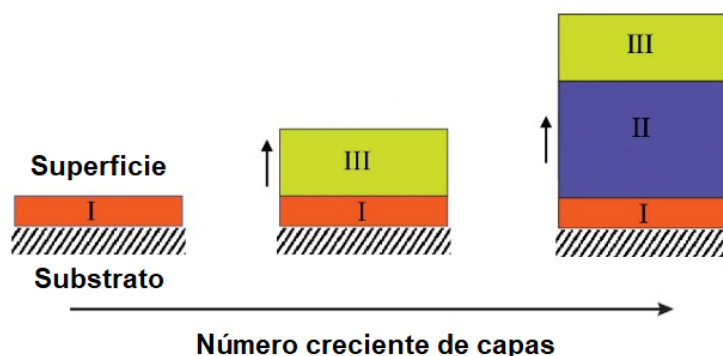


Figura 1.8: Modelo de las zonas para una multicapa de polielectrolitos. La zona I está contigua al sustrato, la zona II forma lo que se denomina el “bulk” de la multicapas y la zona III está próxima a la interfase film/solución o film/aire

Entre las propiedades más relevantes que caracterizan a cada multicapa hay que tener en cuenta el espesor, el cual depende de la naturaleza de la superficie sobre la que se deposita dicha capa, además de las condiciones de deposición. Otros parámetros importantes son la densidad de grupos cargados de las superficies de adsorción, su movilidad local (en el caso de una superficie polimérica) y su rugosidad. Por otro lado

los parámetros más importantes en el proceso de deposición son los siguientes: el tiempo de adsorción, la concentración de reactivo a depositar, la fuerza iónica del medio, la temperatura, el disolvente, el tiempo de lavado, secado, la agitación del sistema, entre otros. Es importante mantener constantes todos estos parámetros a la hora de realizar la deposición de las distintas capas para así obtener resultados reproducibles.

1.2. Objetivos y estructura de la tesis

El objetivo general de este trabajo de tesis es estudiar la interacción de polielectrolitos con analitos de carga opuesta, como surfactantes, sales y medicamentos; y las propiedades morfológicas y eléctricas de los sistemas de complejos que surgen de esa interacción para su potencial utilización como plataforma de transporte de fármacos.

Como objetivos específicos se plantean:

1. Preparar y caracterizar las mezclas en solución acuosa de polímeros y analitos tanto en volumen como en superficie.
2. Comprender y explicar el proceso de ensamblado y de responsividad frente a estímulos, a través del entendimiento de los mecanismos físicos que les dan origen.
3. Evaluar el potencial de las nanopartículas resultantes como plataformas para DDS inteligentes estudiando tamaño, carga y estabilidad frente al pH.
4. Implementar la técnica de efecto Kerr electroóptico sobre estos sistemas, haciendo uso de su sensibilidad aumentada del ambiente eléctrico de los complejos, dando información valiosa sobre el ensamblado de los nanocarriers.

A fin de abordar cada uno de los objetivos planteados, este trabajo de tesis doctoral está organizado en los siguientes capítulos principales:

En el Capítulo 2 se detallará el instrumental y la metodología utilizado para la caracterización fisicoquímica de los sistemas de estudio, incluyendo un breve resumen de los fundamentos de las técnicas.

En el Capítulo 3 se mostrarán los resultados obtenidos para complejos de Doxorubicina con polielectrolitos aniónicos utilizados como sensores de polaridad local en sistemas de multicapas de polielectrolitos ensambladas por *Layer-by-layer*. Se analizará esta propiedad a partir del cambio en la intensidad de los picos de fluorescencia distintivos de la doxorubicina mediante espectroscopía de fluorescencia estacionaria y de tiempo de vida.

El Capítulo 4 tratará extensivamente el sistema compuesto por un polielectrolito cuyo densidad de carga depende del pH, el ácido poliacrílico (PAA) y el tensoactivo iónico Gemini 12-2-12. Se expondrán resultados de caracterización volumétrica y en superficie del proceso de complejación en función de la variación de la cantidad de ten-

soactivo. También se detallará la responsividad del sistema frente al pH para su posible implementación en terapias tópicas.

El Capítulo 5 desarrollará la preparación de nanopartículas de polialilamina (PAN). Se estudiarán cinco sistemas producto de la mezcla de hidrocloreuro de polialilamina (PAH) con cinco sales de fosfato que varían en el número de grupos fosfato que las componen. Se compararán las propiedades morfológicas, eléctricas y termodinámicas de las PANs obtenidas y se seleccionará a las candidatas como potenciales DDS. Se evaluará la estabilidad de los sistemas seleccionados frente a un estímulo como el pH.

El Capítulo 6 tratará sobre complejos entre el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el tensoactivo catiónico bromuro de dodeciltrimetilamonio (DTAB), presentado como un sistema modelo para terapia génica. Se analizará por efecto Kerr la estructura del DNA libre y la modificación de la misma tras el agregado de distintas cantidades de DTAB.

Finalmente se ofrecerán las conclusiones generales respecto a los objetivos planteados y perspectivas futuras.

Bibliografía

- [1] Alec D Bangham, Malcolm M Standish, and Jeff C Watkins. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of molecular biology*, 13(1):238–IN27, 1965.
- [2] Volkmar Weissig, Tamer Elbayoumi, Beat Flühmann, and Amy Barton. The growing field of nanomedicine and its relevance to pharmacy curricula. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 85(8), 2021.
- [3] Samir Mitragotri, Twan Lammers, You Han Bae, Steven Schwendeman, Stefaan De Smedt, Jean Christophe Leroux, Dan Peer, Ick Chan Kwon, Hideyoshi Harashima, Akihiko Kikuchi, Yu Kyoung Oh, Vladimir Torchilin, Wim Hennink, Justin Hanes, and Kinam Park. Drug Delivery Research for the Future: Expanding the Nano Horizons and Beyond. *Journal of Controlled Release*, 246:183–184, 2017. ISSN 18734995. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.01.011.
- [4] Marissa E. Wechsler, Julia E. Vela Ramirez, and Nicholas A. Peppas. 110th Anniversary: Nanoparticle Mediated Drug Delivery for the Treatment of Alzheimer’s Disease: Crossing the Blood-Brain Barrier. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 58(33):15079–15087, aug 2019. ISSN 15205045. doi: 10.1021/acs.iecr.9b02196.
- [5] Susan Hua, Maria B.C. de Matos, Josbert M. Metselaar, and Gert Storm. Current trends and challenges in the clinical translation of nanoparticulate nanomedicines: Pathways for translational development and commercialization. *Frontiers in Pharmacology*, 9(JUL), jul 2018. ISSN 16639812. doi: 10.3389/fphar.2018.00790.
- [6] AC Anselmo and S Mitragotri. Nanoparticles in the clinic: An update. *bioengineering & translational medicine*, 4(3), e10143, 2019.
- [7] Heidi R. Culver, John R. Clegg, and Nicholas A. Peppas. Analyte-Responsive Hydrogels: Intelligent Materials for Biosensing and Drug Delivery. *Accounts of Chemical Research*, 50(2):170–178, feb 2017. ISSN 15204898. doi: 10.1021/acs.accounts.6b00533.
- [8] Shaobo Ruan, Xi Cao, Xingli Cun, Guanlian Hu, Yi Zhou, Yijia Zhang, Libao Lu,

- Qin He, and Huile Gao. Matrix metalloproteinase-sensitive size-shrinkable nanoparticles for deep tumor penetration and pH triggered doxorubicin release. *Biomaterials*, 60:100–110, 2015. ISSN 18785905. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.05.006.
- [9] John R. Clegg, Afshan S. Irani, Eric W. Ander, Catherine M. Ludolph, Abhijeet K. Venkataraman, Justin X. Zhong, and Nicholas A. Peppas. Synthetic networks with tunable responsiveness, biodegradation, and molecular recognition for precision medicine applications. *Science Advances*, 5(9), sep 2019. ISSN 23752548. doi: 10.1126/sciadv.aax7946.
- [10] Angela M. Wagner, Margaret P. Gran, and Nicholas A. Peppas. Designing the new generation of intelligent biocompatible carriers for protein and peptide delivery. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8(2):147–164, 2018. ISSN 22113843. doi: 10.1016/j.apsb.2018.01.013.
- [11] Tamás Németh, Markus Sperandio, and Attila Mócsai. Neutrophils as emerging therapeutic targets. *Nature reviews Drug discovery*, 19(4):253–275, 2020.
- [12] Lisa Sercombe, Tejaswi Veerati, Fatemeh Moheimani, Sherry Y. Wu, Anil K. Sood, and Susan Hua. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Frontiers in Pharmacology*, 6(DEC), 2015. ISSN 16639812. doi: 10.3389/fphar.2015.00286.
- [13] B Fonseca-Santos, MPD Gremião International Journal of . . . , and undefined 2015. Nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of Alzheimer’s disease. *ncbi.nlm.nih.gov*.
- [14] Owen S. Fenton, Katy N. Olafson, Padmini S. Pillai, Michael J. Mitchell, and Robert Langer. Advances in Biomaterials for Drug Delivery. *Advanced Materials*, 30(29), jul 2018. ISSN 15214095. doi: 10.1002/adma.201705328.
- [15] M Sarfraz, A Afzal, T Yang, Y Gai, S Raza, M Khan, Y Cheng, X Ma, and G Xiang. Development of dual drug loaded nanosized liposomal formulation by a reengineered ethanolic injection method and its pre-clinical pharmacokinetic studies, *pharmaceutics* 10 (2018) 151, 2018.
- [16] Mahsa Sedighi, Sandro Sieber, Fereshteh Rahimi, Mohammad Ali Shahbazi, Ali Hossein Rezayan, Jörg Huwyler, and Dominik Witzigmann. Rapid optimization of liposome characteristics using a combined microfluidics and design-of-experiment approach. *Drug Delivery and Translational Research*, 9(1):404–413, feb 2019. ISSN 21903948. doi: 10.1007/s13346-018-0587-4.
- [17] Renad Alyautdin, Igor Khalin, Mohd Ismail Nafeeza, Muhammad Huzaimi Haron, and Dmitry Kuznetsov. Nanoscale drug delivery systems and the blood-brain barrier. *International Journal of Nanomedicine*, 9(1):795–811, 2014. ISSN 11769114. doi: 10.2147/IJN.S52236.

-
- [18] Wenjie Yang, Huazheng Liang, Songhua Ma, Devin Wang, and Jun Huang. Gold nanoparticle based photothermal therapy: Development and application for effective cancer treatment. *Sustainable Materials and Technologies*, 22, 2019. ISSN 22149937. doi: 10.1016/j.susmat.2019.e00109.
- [19] Jianxin Wang, Andrea M. Potocny, Joel Rosenthal, and Emily S. Day. Gold Nanoshell-Linear Tetrapyrrole Conjugates for near Infrared-Activated Dual Photodynamic and Photothermal Therapies. *ACS Omega*, 5(1):926–940, jan 2020. ISSN 24701343. doi: 10.1021/acsomega.9b04150.
- [20] Daniel Bobo, Kye J. Robinson, Jiaul Islam, Kristofer J. Thurecht, and Simon R. Corrie. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharmaceutical Research*, 33(10):2373–2387, oct 2016. ISSN 1573904X. doi: 10.1007/s11095-016-1958-5.
- [21] Laís Salomão Arias, Juliano Pelim Pessan, Ana Paula Miranda Vieira, Taynara Maria Toito De Lima, Alberto Carlos Botazzo Delbem, and Douglas Roberto Monteiro. Iron oxide nanoparticles for biomedical applications: A perspective on synthesis, drugs, antimicrobial activity, and toxicity. *Antibiotics*, 7(2), 2018. ISSN 20796382. doi: 10.3390/antibiotics7020046.
- [22] Kuan Wei Huang, Fu Fei Hsu, Jiantai Timothy Qiu, Guann Jen Chern, Yi An Lee, Chih Chun Chang, Yu Ting Huang, Yun Chieh Sung, Cheng Chin Chiang, Rui Lin Huang, Chu Chi Lin, Trinh Kieu Dinh, Hsi Chien Huang, Yu Chuan Shih, Donia Alson, Chun Yen Lin, Yung Chang Lin, Po Chiao Chang, Shu Yi Lin, and Yunching Chen. Highly efficient and tumor-selective nanoparticles for dual-targeted immunogene therapy against cancer. *Science Advances*, 6(3), jan 2020. ISSN 23752548. doi: 10.1126/sciadv.aax5032.
- [23] Angela M. Wagner, Jennifer M. Knipe, Gorka Orive, and Nicholas A. Peppas. Quantum dots in biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, 94:44–63, 2019. ISSN 18787568. doi: 10.1016/j.actbio.2019.05.022.
- [24] Chang Xiong Zhang, Ying Cheng, Dao Zhou Liu, Miao Liu, Han Cui, Bang Le Zhang, Qi Bing Mei, and Si Yuan Zhou. Mitochondria-targeted cyclosporin A delivery system to treat myocardial ischemia reperfusion injury of rats. *Journal of Nanobiotechnology*, 17(1), jan 2019. ISSN 14773155. doi: 10.1186/s12951-019-0451-9.
- [25] Bella B. Manshian, Julio Jiménez, Uwe Himmelreich, and Stefaan J. Soenen. Personalized medicine and follow-up of therapeutic delivery through exploitation of quantum dot toxicity. *Biomaterials*, 127:1–12, 2017. ISSN 18785905. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.02.039.
- [26] Shannon B. Brown, Lei Wang, Ryan R. Jungels, and Blanka Sharma. Effects of cartilage-targeting moieties on nanoparticle biodistribution in healthy and os-
-

- teoarthritis joints. *Acta Biomaterialia*, 101:469–483, 2020. ISSN 18787568. doi: 10.1016/j.actbio.2019.10.003.
- [27] Yin Zhang, Si Meng, Jinhua Ding, Qiwen Peng, and Yanyan Yu. Transition metal-coordinated graphitic carbon nitride dots as a sensitive and facile fluorescent probe for β -amyloid peptide detection. *Analyst*, 144(2):504–511, 2019. ISSN 13645528. doi: 10.1039/c8an01620h.
- [28] Zhicheng Le, Yantao Chen, Honghua Han, Houkuan Tian, Pengfei Zhao, Chengbiao Yang, Zhiyu He, Lixin Liu, Kam W. Leong, Hai Quan Mao, Zhijia Liu, and Yongming Chen. Hydrogen-Bonded Tannic Acid-Based Anticancer Nanoparticle for Enhancement of Oral Chemotherapy. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(49):42186–42197, dec 2018. ISSN 19448252. doi: 10.1021/acsami.8b18979.
- [29] Chunbai He, Haimei Yue, Lu Xu, Yifu Liu, Yudong Song, Cui Tang, and Chunhua Yin. siRNA release kinetics from polymeric nanoparticles correlate with RNAi efficiency and inflammation therapy via oral delivery. *Acta Biomaterialia*, 103: 213–222, 2020. ISSN 18787568. doi: 10.1016/j.actbio.2019.12.005.
- [30] Libo Zhang, Andrew Beatty, Lin Lu, Akrm Abdalrahman, Thomas M. Makris, Guiren Wang, and Qian Wang. Microfluidic-assisted polymer-protein assembly to fabricate homogeneous functionalnanoparticles. *Materials Science and Engineering C*, 111, 2020. ISSN 18730191. doi: 10.1016/j.msec.2020.110768.
- [31] Mary Caldorera-Moore, Julia E. Vela Ramirez, and Nicholas A. Peppas. Transport and delivery of interferon- α through epithelial tight junctions via pH-responsive poly(methacrylic acid-grafted-ethylene glycol) nanoparticles. *Journal of Drug Targeting*, 27(5-6):582–589, jul 2019. ISSN 10292330. doi: 10.1080/1061186X.2018.1547732.
- [32] Frances C. Knight, Pavlo Gilchuk, Amrendra Kumar, Kyle W. Becker, Sema Sevimli, Max E. Jacobson, Naveenchandra Suryadevara, Lihong Wang-Bishop, Kelli L. Boyd, James E. Crowe, Sebastian Joyce, and John T. Wilson. Mucosal Immunization with a pH-Responsive Nanoparticle Vaccine Induces Protective CD8+ Lung-Resident Memory T Cells. *ACS Nano*, 13(10):10939–10960, oct 2019. ISSN 1936086X. doi: 10.1021/acsnano.9b00326.
- [33] Matthew S. Strand, Bradley A. Krasnick, Hua Pan, Xiuli Zhang, Ye Bi, Candace Brooks, Christopher Wetzal, Narendra Sankpal, Timothy Fleming, S. Peter Goedegebuure, David G. DeNardo, William E. Gillanders, William G. Hawkins, Samuel A. Wickline, and Ryan C. Fields. Precision delivery of RAS-inhibiting siRNA to KRAS driven cancer via peptide-based nanoparticles. *Oncotarget*, 10(46): 4761–4775, 2019. ISSN 19492553. doi: 10.18632/oncotarget.27109.
- [34] Sajan Jose, Thomas A. Cinu, Rosmy Sebastian, M. H. Shoja, N. A. Aleykutty, Alessandra Durazzo, Massimo Lucarini, Antonello Santini, and Eliana B. Sou-

- to. Transferrin-conjugated Docetaxel-PLGA nanoparticles for tumor targeting: Influence on MCF-7 cell cycle. *Polymers*, 11(11), 2019. ISSN 20734360. doi: 10.3390/polym11111905.
- [35] Xiaoyu Liu, Chang Li, Juan Lv, Fan Huang, Yingli An, Linqi Shi, and Rujiang Ma. Glucose and H₂O₂ Dual-Responsive Polymeric Micelles for the Self-Regulated Release of Insulin. *ACS Applied Bio Materials*, 3(3):1598–1606, mar 2020. ISSN 25766422. doi: 10.1021/acsabm.9b01185.
- [36] Cheng Xu, Jutaeck Nam, Hao Hong, Yao Xu, and James J. Moon. Positron emission tomography-guided photodynamic therapy with biodegradable mesoporous silica nanoparticles for personalized cancer immunotherapy. *ACS Nano*, 13(10):12148–12161, oct 2019. ISSN 1936086X. doi: 10.1021/acsnano.9b06691.
- [37] Maryam Afsharzadeh, Maryam Hashemi, Ahad Mokhtarzadeh, Khalil Abnous, and Mohammad Ramezani. Recent advances in co-delivery systems based on polymeric nanoparticle for cancer treatment. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(6):1095–1110, aug 2018. ISSN 2169141X. doi: 10.1080/21691401.2017.1376675.
- [38] Lisa R. Volpatti, Morgan A. Matranga, Abel B. Cortinas, Derfogail Delcassian, Kevin B. Daniel, Robert Langer, and Daniel G. Anderson. Glucose-Responsive Nanoparticles for Rapid and Extended Self-Regulated Insulin Delivery. *ACS Nano*, 14(1):488–497, jan 2020. ISSN 1936086X. doi: 10.1021/acsnano.9b06395.
- [39] Jayanta Kumar Patra, Gitishree Das, Leonardo Fernandes Fraceto, Estefania Vangelie Ramos Campos, Maria Del Pilar Rodriguez-Torres, Laura Susana Acosta-Torres, Luis Armando Diaz-Torres, Renato Grillo, Mallappa Kumara Swamy, Shivesh Sharma, Solomon Habtemariam, and Han Seung Shin. Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects 10 Technology 1007 Nanotechnology 03 Chemical Sciences 0306 Physical Chemistry (incl. Structural) 03 Chemical Sciences 0303 Macromolecular and Materials Chemistry 11 Medical and Health Sciences 1115 Pharmacology and Pharmaceutical Sciences 09 Engineering 0903 Biomedical Engineering Prof Ueli Aebi, Prof Peter Gehr. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1), sep 2018. ISSN 14773155. doi: 10.1186/s12951-018-0392-8.
- [40] Emeline Rideau, Rumiana Dimova, Petra Schwille, Frederik R. Wurm, and Katharina Landfester. Liposomes and polymersomes: a comparative review towards cell mimicking. *Chemical Society reviews*, 47(23):8572–8610, 2018. ISSN 14604744. doi: 10.1039/c8cs00162f.
- [41] Daniel Shae, Kyle W. Becker, Plamen Christov, Dong Soo Yun, Abigail K.R. Lytton-Jean, Sema Sevimli, Manuel Ascano, Mark Kelley, Douglas B. Johnson, Justin M. Balko, and John T. Wilson. Endosomolytic polymersomes increase the activity of cyclic dinucleotide STING agonists to enhance cancer immunotherapy.

- Nature Nanotechnology*, 14(3):269–278, 2019. ISSN 17483395. doi: 10.1038/s41565-018-0342-5.
- [42] Shin Wha Lee, Yong Man Kim, Chi Heum Cho, Young Tae Kim, Seok Mo Kim, Soo Young Hur, Jae Hoon Kim, Byoung Gie Kim, Seung Cheol Kim, Hee Sug Ryu, and Soon Beom Kang. An open-label, randomized, parallel, phase ii trial to evaluate the efficacy and safety of a cremophor-free polymeric micelle formulation of paclitaxel as first-line treatment for ovarian cancer: A Korean Gynecologic Oncology Group Study (KGOG-3021). *Cancer Research and Treatment*, 50(1):195–203, 2018. ISSN 20059256. doi: 10.4143/crt.2016.376.
- [43] Leyuan Xu, Hao Zhang, and Yue Wu. Dendrimer advances for the central nervous system delivery of therapeutics. *ACS Chemical Neuroscience*, 5(1):2–13, jan 2014. ISSN 19487193. doi: 10.1021/cn400182z.
- [44] Livia Palmerston Mendes, Jiayi Pan, and Vladimir P. Torchilin. Dendrimers as nanocarriers for nucleic acid and drug delivery in cancer therapy. *Molecules*, 22(9), 2017. ISSN 14203049. doi: 10.3390/molecules22091401.
- [45] R. M. Kannan, E. Nance, S. Kannan, and D. A. Tomalia. Emerging concepts in dendrimer-based nanomedicine: From design principles to clinical applications. *Journal of Internal Medicine*, 276(6):579–617, dec 2014. ISSN 13652796. doi: 10.1111/joim.12280.
- [46] Anupa R. Menjoge, Rangaramanujam M. Kannan, and Donald A. Tomalia. Dendrimer-based drug and imaging conjugates: design considerations for nanomedical applications. *Drug Discovery Today*, 15(5-6):171–185, 2010. ISSN 13596446. doi: 10.1016/j.drudis.2010.01.009.
- [47] Shu jun Cao, Shuo Xu, Hui ming Wang, Yong Ling, Jiahua Dong, Rui dong Xia, and Xiang hong Sun. Nanoparticles: Oral Delivery for Protein and Peptide Drugs. *AAPS PharmSciTech*, 20(5), jul 2019. ISSN 15309932. doi: 10.1208/s12249-019-1325-z.
- [48] Houkuan Tian, Zhiyu He, Chengxin Sun, Chengbiao Yang, Pengfei Zhao, Lixin Liu, Kam W. Leong, Hai Quan Mao, Zhijia Liu, and Yongming Chen. Uniform Core–Shell Nanoparticles with Thiolated Hyaluronic Acid Coating to Enhance Oral Delivery of Insulin. *Advanced Healthcare Materials*, 7(17), sep 2018. ISSN 21922659. doi: 10.1002/adhm.201800285.
- [49] Danielle M. Valcourt, Megan N. Dang, Mackenzie A. Scully, and Emily S. Day. Nanoparticle-Mediated Co-Delivery of Notch-1 Antibodies and ABT-737 as a Potent Treatment Strategy for Triple-Negative Breast Cancer. *ACS Nano*, 14(3): 3378–3388, mar 2020. ISSN 1936086X. doi: 10.1021/acsnano.9b09263.
- [50] M Mandel. Aqueous solutions of polyelectrolytes. In *Chemistry and Technology of*

- Water-Soluble Polymers*, pages 179–192. Springer, 1983.
- [51] Gerald S Manning and Jolly Ray. Counterion condensation revisited. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 16(2):461–476, 1998.
- [52] P-Gd De Gennes, P Pincus, RM Velasco, and F Brochard. Remarks on polyelectrolyte conformation. *Journal de physique*, 37(12):1461–1473, 1976.
- [53] Paul J Flory. *Principles of polymer chemistry*. Cornell university press, 1953.
- [54] Paul J Flory and M Volkenstein. *Statistical mechanics of chain molecules*, 1969.
- [55] Pierre-Gilles De Gennes and Pierre-Gilles Gennes. *Scaling concepts in polymer physics*. Cornell university press, 1979.
- [56] Lennart Piculell. Understanding and exploiting the phase behavior of mixtures of oppositely charged polymers and surfactants in water. *Langmuir*, 29(33):10313–10329, 2013.
- [57] Azat Bilalov, Ulf Olsson, and Björn Lindman. Complexation between dna and surfactants and lipids: phase behavior and molecular organization. *Soft Matter*, 8(43):11022–11033, 2012.
- [58] ED Goddard. und hannan, rb: J. *Amer. Oil Chem. Soc*, 54:561–566, 1977.
- [59] Hernán Ritacco and David H Kurlat. Critical aggregation concentration in the pamps (10 %)/dtab system. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 218(1-3):27–45, 2003.
- [60] H Ritacco, D Kurlat, and D Langevin. Properties of aqueous solutions of polyelectrolytes and surfactants of opposite charge: surface tension, surface rheology, and electrical birefringence studies. *The Journal of Physical Chemistry B*, 107(34):9146–9158, 2003.
- [61] Yakov Lapitsky, Maider Parikh, and Eric W Kaler. Calorimetric determination of surfactant/polyelectrolyte binding isotherms. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(29):8379–8387, 2007.
- [62] Katumitu Hayakawa, J Paul Santerre, and Jan CT Kwak. Study of surfactant-polyelectrolyte interactions. binding of dodecyl-and tetradecyltrimethylammonium bromide by some carboxylic polyelectrolytes. *Macromolecules*, 16(10):1642–1645, 1983.
- [63] ED Goddard. Polymer-surfactant interaction: Part ii. polymer and surfactant of opposite charge. In *Interactions of surfactants with polymers and proteins*, pages 171–202. CRC Press, 2018.
- [64] Per Hansson and Mats Almgren. Polyelectrolyte-induced micelle formation of ionic

- surfactants and binary surfactant mixtures studied by time-resolved fluorescence quenching. *The Journal of Physical Chemistry*, 99(45):16684–16693, 1995.
- [65] Per Hansson and Mats Almgren. Interaction of c n tab with sodium (carboxymethyl) cellulose: Effect of polyion linear charge density on binding isotherms and surfactant aggregation number. *The Journal of Physical Chemistry*, 100(21):9038–9046, 1996.
- [66] Per Hansson and Mats Almgren. Interaction of alkyltrimethylammonium surfactants with polyacrylate and poly (styrenesulfonate) in aqueous solution: phase behavior and surfactant aggregation numbers. *Langmuir*, 10(7):2115–2124, 1994.
- [67] B Cabane and R Duplessix. Decoration of semidilute polymer solutions with surfactant micelles. *Journal de Physique*, 48(4):651–662, 1987.
- [68] Leonardo Chiappisi, Ingo Hoffmann, and Michael Gradzielski. Complexes of oppositely charged polyelectrolytes and surfactants—recent developments in the field of biologically derived polyelectrolytes. *Soft Matter*, 9(15):3896–3909, 2013.
- [69] Marta Ruano, Ana Mateos-Maroto, Francisco Ortega, Hernan Ritacco, Jose EF Rubio, Eduardo Guzman, and Ramon G Rubio. Fabrication of robust capsules by sequential assembly of polyelectrolytes onto charged liposomes. *Langmuir*, 37(20):6189–6200, 2021.
- [70] Wiebe M de Vos, Laura LE Mears, Robert M Richardson, Terence Cosgrove, Robert Barker, and Stuart W Prescott. Nonuniform hydration and odd–even effects in polyelectrolyte multilayers under a confining pressure. *Macromolecules*, 46(3):1027–1034, 2013.
- [71] Katsuhiko Ariga, Jonathan P Hill, and Qingmin Ji. Layer-by-layer assembly as a versatile bottom-up nanofabrication technique for exploratory research and realistic application. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 9(19):2319–2340, 2007.
- [72] David E Bergbreiter and Kang-Shyang Liao. Covalent layer-by-layer assembly—an effective, forgiving way to construct functional robust ultrathin films and nanocomposites. *Soft Matter*, 5(1):23–28, 2009.
- [73] Stephan T Dubas and Joseph B Schlenoff. Factors controlling the growth of polyelectrolyte multilayers. *Macromolecules*, 32(24):8153–8160, 1999.
- [74] Joseph B Schlenoff and Stephan T Dubas. Mechanism of polyelectrolyte multilayer growth: charge overcompensation and distribution. *Macromolecules*, 34(3):592–598, 2001.

Capítulo 2

Métodos experimentales

En este capítulo se presenta una descripción sucinta de las técnicas utilizadas para caracterizar los sistemas de interés para esta tesis, en volumen y en superficie. A su vez, se incluyen los principios físicos necesarios para el correcto desarrollo de la medición y el análisis de datos. Los datos sobre los sistemas químicos estudiados se detallarán en el capítulo correspondiente.

2.1. Técnicas de caracterización de superficies

2.1.1. Balanza de Langmuir

La balanza de Langmuir es una técnica clásica en física de superficies líquidas que permite estudiar monocapas moleculares adsorbidas a las interfaces líquido-gas o líquido-líquido. El montaje experimental se esquematiza en la Figura 2.1:

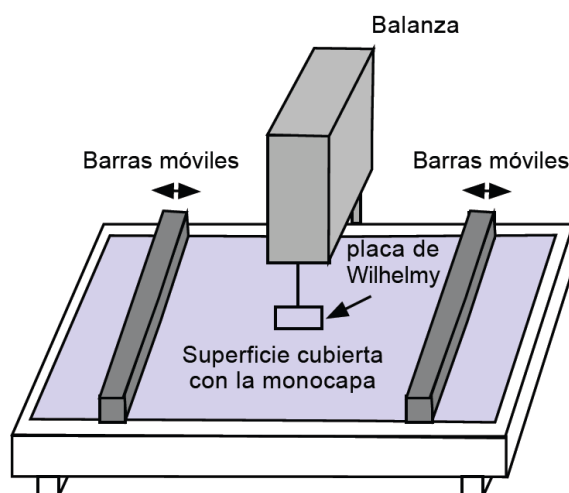


Figura 2.1: Esquema de una balanza de Langmuir

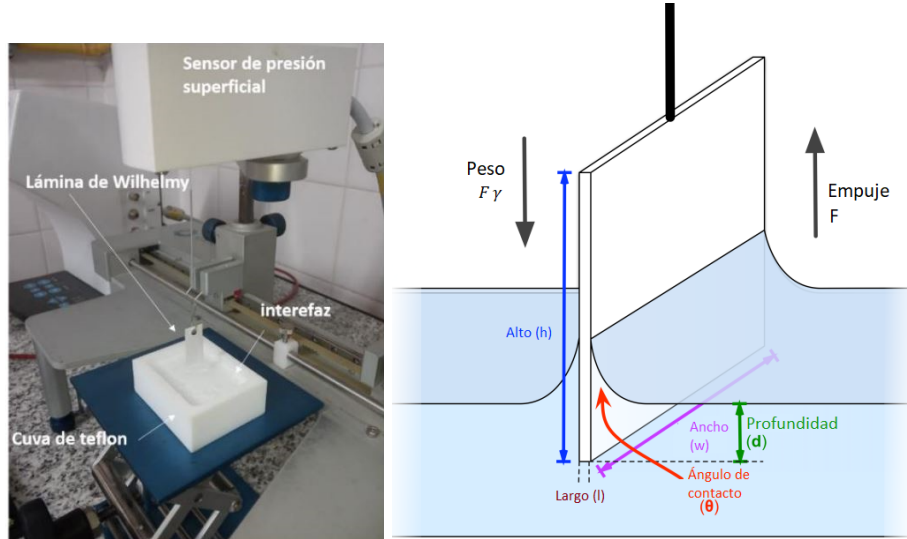
Se compone de una cubeta hidrofóbica, generalmente de Teflon, donde se coloca el líquido sobre cuya superficie se adsorbe una monocapa molecular. Esta puede estar formada por moléculas insolubles, en cuyo caso se denominan monocapas de Langmuir (ej. monocapas lipídicas), o por moléculas solubles, como los tensoactivos, en cuyo caso se denominan monocapas de Gibbs. La balanza contiene dos barreras móviles, colocadas justo sobre la superficie de forma tal que al moverse pueden comprimir o expandir la monocapa adsorbida cambiando el área superficial (A). A su vez, una sonda, generalmente una lámina de platino, se pone en contacto con la interfaz a través de un sensor de fuerza que permite medir la presión superficial, $\Pi = \gamma_0 - \gamma$, siendo γ_0 y γ la tensión superficial del solvente puro y de la monocapa adsorbida respectivamente. La balanza de Langmuir permite realizar lo que se conoce como isothermas de compresión, Π vs A , el equivalente en 2D a los diagramas presión-volumen en gases, por ejemplo. También permite realizar experimentos de reología superficial como veremos más adelante. Las mediciones fueron realizadas en una balanza KSV LB5000 (KSV NIMA) controlada por una PC y una cubeta compuesta por una única pieza de poli(tetrafluoroetileno) o PTFE (también conocido comercialmente como Teflon). Se utilizaron sondas de papel estandarizado descartables como también una placa de Whilhemly de platino. En esta tesis se usó la Balanza de Langmuir para medir isothermas de tensión superficial de equilibrio y para experimentos de reología interfacial por Compresión-Expansión súbita, los cuales se describirán brevemente a continuación.

Tensión superficial de equilibrio

La tensión superficial, definida como la derivada de la energía libre de Gibbs respecto al área a T y P constante, $(\frac{\partial G}{\partial A})_{T,P}$ se mide a través de un sensor que mide la fuerza total sobre una placa inmersa en un líquido, la cual se encuentra transversal a la interface líquido-aire. En la ecuación 2.1 se resumen los efectos sobre la placa:

$$F = (\rho_w l_w h_w w_w)g - (\rho_l l_w d_w w_w)g + 2(h_w + w_w)\gamma \cos(\theta_w) \quad (2.1)$$

ρ_w y ρ_l son las densidades de la placa y del líquido respectivamente, l_w , h_w , w_w son las dimensiones de la placa de Whilhelmy (largo, alto y ancho), la longitud sumergida d_w y el ángulo de mojado θ . Esta ecuación representa la fuerza total debido al peso de la placa, el empuje y la influencia de la tensión superficial, como se muestra en la Figura 2.2(b). Las medidas consisten en medir F y, agregando los parámetros de la placa en la ecuación 2.1, obtener el valor de la tensión superficial γ .



(a) Imagen del montaje para medición de tensión superficial de equilibrio, sin control de temperatura. (b) Esquema con los parámetros de la ecuación 2.1, mostrando el balance de fuerzas para alcanzar la condición estática.

Figura 2.2: Montaje y esquema para la determinación de tensión superficial de equilibrio

Reología interfacial por compresión/Expansión súbita

Cuando una perturbación mecánica ocurre en la interfaz agua-aire (como ser una compresión) las moléculas adsorbidas poseen distintas vías para relajar este aumento en la concentración superficial (pueden difundir al seno del fluido y luego volverse a adsorber, o pueden almacenar y disiparla energía a través de procesos elásticos-viscosos entre las partículas). Por lo tanto, para entender los procesos de transferencia de materia en la interfaz se pueden realizar experimentos de compresión de barreras. La técnica consiste en someter a la interfaz a una perturbación como es la reducción o el aumento de su área, de forma instantánea, súbita. La función respuesta definida como el cambio en tiempo real de la tensión superficial (o de la presión interfacial) se colecta a través de una placa de Wilhemy de la misma forma que se expuso en la sección anterior. A través de esta función se pueden obtener los módulos interfaciales dilacionales: elásticos E' , definidos como la capacidad del sistema de almacenar energía de manera elástica, acercando las moléculas unas con otras; y viscosos E'' relacionados a los procesos de pérdida, tales como transferencia de calor al medio o la difusión de materia al seno del líquido. Un ejemplo del resultado de una medición se observa en la Figura 2.3. Si se asume una perturbación instantánea, la relajación de la tensión superficial se puede modelar como una sumatoria de exponenciales decrecientes, moduladas por el tiempo característico de los procesos de relajación involucrados [1]:

$$\gamma(t) = \sum_n \gamma_n e^{-t/\tau_n} \tag{2.2}$$

Donde γ_n y τ_n son la tensión superficial y tiempo de relajación de equilibrio para el n -ésimo modo presente. A priori, la cantidad de modos presentes no es posible de determinar, por lo tanto se define la distribución de relajaciones, $H(\ln\tau)$, y se relaciona con la respuesta del sistema a través de:

$$\frac{\Delta\Pi(t)}{\Pi_0} = \int_{-\infty}^{\infty} H(\ln\tau)e^{-t/\tau}d\ln\tau \quad (2.3)$$

La presente ecuación se corresponde con una transformada de Laplace en la variable τ y por lo tanto, realizando la antitransformada es posible obtener la distribución de relajaciones H . Una vez obtenida, se pueden calcular los módulos elásticos y viscosos a través de las relaciones [2]:

$$E' = \int_{-\infty}^{\infty} H(\ln\tau) \frac{\omega^2\tau^2}{1 + \omega^2\tau^2} d\ln\tau \quad (2.4)$$

$$E'' = \int_{-\infty}^{\infty} H(\ln\tau) \frac{\omega\tau}{1 + \omega^2\tau^2} d\ln\tau \quad (2.5)$$

Para la obtención de la transformada inversa de Laplace se utilizó el programa CONTIN (Constrained Regularization Method) desarrollado por Provencher [3]. Para realizar las mediciones se llenó la cubeta de Teflon con 125 ml de solución y se colocó en la balanza un papel calibrado (ángulo de contacto $\theta = 0$, ver ec. 2.1) como sonda para registrar la tensión superficial instante a instante. Se realizó una compresión (o expansión) a la máxima velocidad de las barreras, produciendo un cambio relativo en el área total de un 10 %. El software de la balanza adquirió los datos hasta que el usuario lo detuvo manualmente. El criterio de corte considerado fue una variación menor a 0.1 mN/m en un intervalo de 30 minutos. Para tiempos de relajación muy superiores a las 2hs el experimento se consideró comprometido por efectos de la evaporación y por lo tanto, en dichos casos también se detuvo la medida.

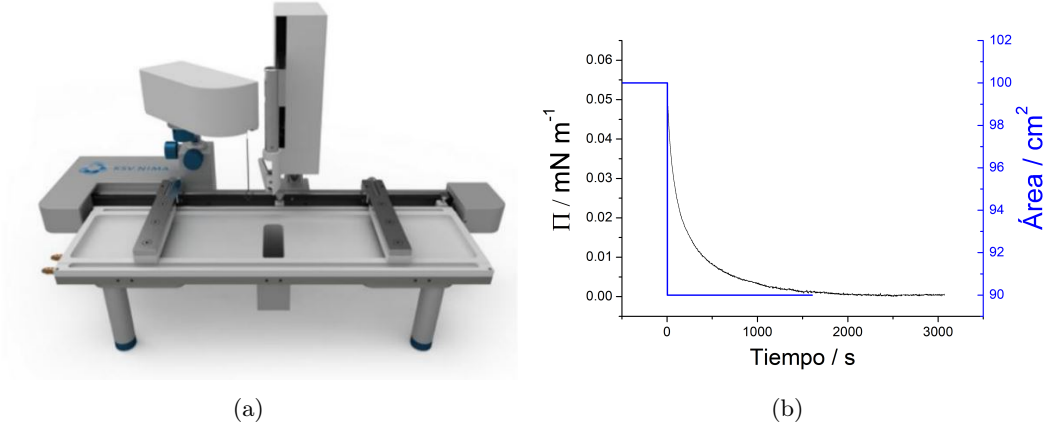


Figura 2.3: (a) Equipo comercial KSV NIMA utilizado en las mediciones de tensión superficial y reología interfacial. (b) Datos obtenidos mediante un proceso de compresión súbita del área superficial (curva azul) y la respuesta temporal de la interfaz en términos de presión interfacial (curva negra)

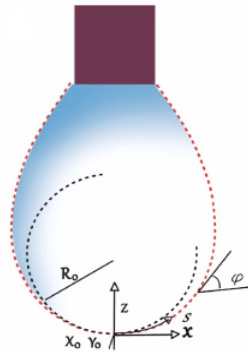
Para la ejecución de ambas técnicas se utilizó una balanza de Langmuir comercial KSV NIMA como la que se muestra en la Figura 2.3(a).

2.1.2. Tensión superficial dinámica: gota pendiente

La técnica de gota pendiente se basa en la determinación del perfil de una gota colgando de la punta de un capilar (o también de una burbuja, en geometría invertida). La forma de dicho perfil es consecuencia de un balance entre gravedad y tensión interfacial y en equilibrio obedece la ecuación de Young-Laplace [4]:

$$-\gamma\left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2}\right) = \Delta P = \Delta P_0 - \Delta\rho g z \quad (2.6)$$

donde r_1, r_2 son los radios principales de curvatura de la interfaz; $\Delta P = P_{in} - P_{out}$, es la diferencia de presión a través de la interfaz de la gota o burbuja; esta última se puede expresar a través de la $\Delta\rho$ que es la diferencia de densidad entre la gota/burbuja y el medio continuo. La diferencia de presión se puede escribir en términos de una presión de referencia, ΔP_0 a $z=0$ y la presión hidrostática, $\Delta\rho g z$. Teniendo en cuenta que la gota suspendida es axisimétrica, la ecuación de Young-Laplace se puede escribir en coordenadas cilíndricas r, z y el ángulo tangente ϕ . Lo que se obtiene es un conjunto acoplado de ecuaciones diferenciales adimensionales en términos de la longitud de arco s , medido desde el ápex de la gota:



$$\begin{aligned} \frac{d\varphi}{d\bar{s}} &= 2 - B_0 z - \frac{\sin(\varphi)}{\bar{r}} \\ \frac{d\bar{r}}{d\bar{s}} &= \cos(\varphi) \\ \frac{d\bar{z}}{d\bar{s}} &= \sin(\varphi) \end{aligned} \tag{2.7}$$

Figura 2.4: Esquema de la gota pendiente y sus variables geométricas.

donde las barras indican cantidades adimensionales escaladas por R_0 , el radio de curvatura del ápex de la gota. Para el caso de una esfera la solución es analítica, pero el resultado es trivial, pues requiere una tensión interfacial infinita. Para las demás geometrías, la resolución es numérica. B_0 es el número de Bond definido como:

$$B_0 = \frac{\Delta\rho g R_0^2}{\gamma} \tag{2.8}$$

El número de Bond [5] representa la relación entre fuerza gravitatoria y de tensión interfacial. Experimentalmente, el perfil de la gota, una vez formada, se sigue mediante una cámara CCD rápida (100 cuadros por segundo) y las imágenes se guardan para análisis. Cada imagen se ajusta mediante la ecuación diferencial previa, de la cual se obtiene el número de Bond en función del tiempo, y por lo tanto la tensión interfacial en función del tiempo, $\gamma(t)$. Con esta información es posible dilucidar el proceso de adsorción interfacial, así como las dinámicas internas en la interfaz.

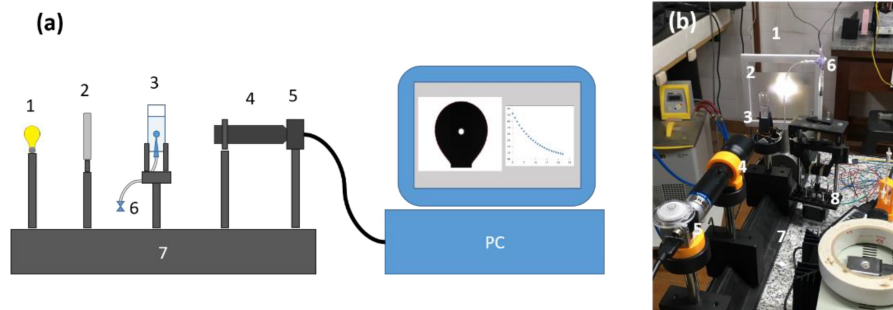


Figura 2.5: Configuración del tensiómetro de gota pendiente. (a) esquema del dispositivo; (b) foto del mismo dispositivo. (1) fuente de luz (2) difusor de luz (3) celda de medición (4) lente telecéntrica (5) cámara CCD (6) válvula (7) banco óptico. (8) Sistema automatizado de bomba de jeringa

El tensiómetro de gota pendiente se diseñó y construyó en nuestro grupo de investigación (Figura 2.5). Este consta de una cámara CCD Basler acA1300-30um con lente telecéntrico, modelo 0.50X TL de Edmund Optics, con un sistema de iluminación por led verde. Las gotas se forman al final de una punta Optifit de 10 μl de Sartorius. Todos los elementos fueron montados sobre un banco óptico. Para calcular la tensión superficial se utilizó el complemento ImageJ desarrollado por Daerr [6].

2.1.3. Reflectometría de rayos X (XRR)

La reflectometría es una técnica que permite determinar el espesor, rugosidad y densidad electrónica de films delgados uniformes. Usualmente, se consideran delgados cuando el espesor total es menor a 1 μm , impuesto por las especificaciones técnicas del equipo. Es una técnica precisa que también puede ser utilizada para medir propiedades no superficiales de los films, tales como interfaces interiores, permitiendo el estudio de films delgados multicapa. A su vez, con una adaptación del portamuestras, se ha logrado medir en monocapas soportadas en interfaces aire-líquido, como se mostrará más adelante. Las medidas consisten en iluminar sobre una muestra plana y recolectar la señal especular reflejada. Usualmente se pueden observar dos regímenes: por debajo de un ángulo crítico θ_c el haz incidente es completamente reflejado y la intensidad normalizada equivale a 1. Este fenómeno se conoce como reflexión total y el ángulo crítico depende directamente del índice de refracción del material. Si el haz incidente está compuesto de rayos X, el índice de refracción depende de la densidad electrónica del material, mientras que para un haz de neutrones dependerá de la densidad de longitud de dispersión. El otro régimen se da por encima del ángulo crítico, la tendencia general es una intensidad detectada que decrece a medida que el ángulo incidente aumenta debido a que el haz penetra el material. El ángulo del haz refractado sigue la ley de Snell:

$$n_i \cos \theta = n_2 \cos \phi \quad (2.9)$$

donde θ y ϕ son los ángulos incidente y refractado respectivamente, medidos desde la superficie; n_1 es el índice de refracción del aire o el vacío, que es normalmente tomado como 1 y n_2 es el índice de refracción del material, usualmente $n_2 = n$ es un número complejo. La parte imaginaria se relaciona con el proceso de absorción del haz en el medio, sin embargo en experimentos con rayos X, la absorción es despreciable y usualmente se la toma tendiendo a cero. La parte real, δ , corresponde a la interpretación proveniente de la óptica geométrica y se relaciona con la velocidad de fase dentro del material. Es importante mencionar que n siempre será menor a 1 para experimentos de rayos X; por lo tanto siempre habrá un ángulo crítico y se podrá observar reflexión total debajo de él. En estas condiciones, la ley de Snell puede ser expresada como $\cos(\theta_c) = n = 1 - \delta$, considerando que θ_c es suficientemente chico, se puede encontrar la siguiente expresión $(\theta_c)^2/2 = \delta$. Más aún, lejos de la frecuencia de resonancia atómica δ es proporcional a la densidad electrónica ρ . Combinando ambas expresiones, se obtiene que θ_c es proporcional a $\sqrt{\rho}$.

Las ecuaciones de Fresnel describen las reflexión y refracción de luz en interfaces uniformes y planas. La intensidad de reflexión puede ser expresada en términos del vector de scattering q [7]:

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\theta) \quad (2.10)$$

dando como resultado [8]:

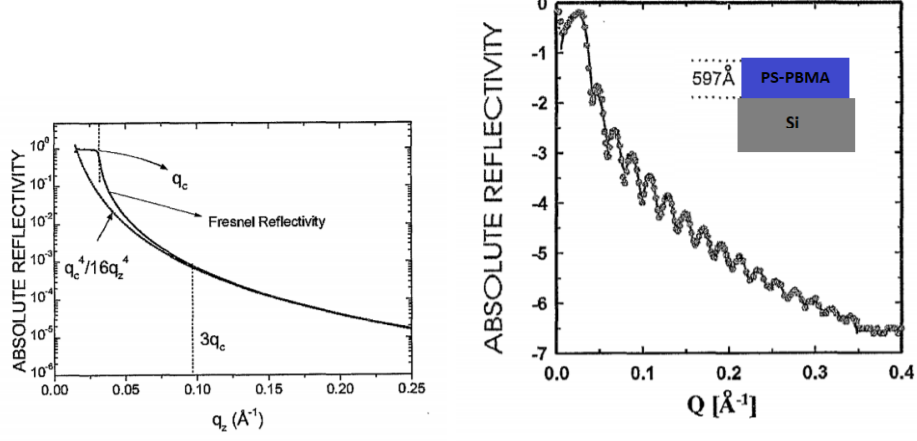
$$R(q) = \left| \frac{q - \sqrt{q^2 - [q_c]^2 - \frac{32i\pi^2\beta}{\lambda^2}}}{q - \sqrt{q^2 + [q_c]^2 - \frac{32i\pi^2\beta}{\lambda^2}}} \right| \quad (2.11)$$

Cuando el vector de scattering es grande en comparación a q_c , se observa el siguiente comportamiento asintótico:

$$R = \frac{q_c^4}{16q^4} \quad (2.12)$$

Como ejemplo la Figura 2.6(a) muestra la reflectividad calculada para un waffer de silicio y la curva de la ley de potencia asintótica:

Si sobre un sustrato ideal plano se deposita una capa uniforme de otro material, con índice de refracción distinto, y por lo tanto, con una densidad electrónica distinta,



(a) Reflectividad calculada para un wafer plano de silicio. (b) Perfil de reflectividad de una capa de copolímero PS-PBMA sobre sustrato de silicio.

Figura 2.6: Ejemplos de perfiles de reflectividad

la intensidad reflejada especularmente será la suma de las dispersiones electrónicas individuales de ambos materiales. La onda reflejada por ambos materiales puede interferir para dar lugar a oscilaciones en la intensidad. Estas oscilaciones son las llamadas franjas de Kiessing [9]. En la Figura 2.6(b) se observa la curva de reflectividad para una superficie de silicio cubierta con una capa de copolímero PS-PBMA de 59.7 nm de espesor. La “frecuencia” de las oscilaciones es una medida cuantitativa del espesor, cuanto mayor es este, menor es el espaciamiento entre franjas de Kiessing. La amplitud en intensidad de estas oscilaciones dependerá de la densidad electrónica del material. En el caso de que los materiales soportados presenten inhomogeneidades del perfil electrónico en las interfaces, se podrá observar un efecto de borroneo en la reflectividad. En resumen, la técnica permite obtener información sobre espesores de multicapas, su perfil densidad electrónica en la dirección de crecimiento y la rugosidad de la/s interfaz/ces.

La reflectividad en multicapas se puede expresar con una función recurrente, en la que la reflectividad R toma la forma [10]:

$$\begin{aligned}
 R_{j,j+1} &= \frac{R_{j+1,j+2} + F_{j+1,j+2}}{R_{j+1,j+2} \times F_{j+1,j+2} + 1} a_j^4 \\
 F_{j,j+1} &= \frac{g_j - g_{j+1}}{g_j + g_{j+1}} \exp\left(\frac{-8\pi^2 g_j g_{j+1} \sigma_{j+1}^2}{\lambda^2}\right) \\
 a_j &= \exp\left(\frac{-i\pi g_j d_j}{\lambda}\right) \\
 g_j &= \sqrt{n_i^2 - \cos^2\theta}
 \end{aligned} \tag{2.13}$$

La capa $j = 1$ corresponde a la fase gas, cada capa en la multicapa es numerada a partir de $j = 2$. El sustrato corresponde a la capa $j=N+1$, donde N es el número total de capas. El coeficiente de reflexión entre las capas j y $j+1$, es $R_{j,j+1}$, que se calcula de forma recurrente comenzando en el sustrato y subiendo hasta la interfaz entre el film y el aire. En las ecuaciones previas, λ es la longitud de onda de los rayos X, d_j el espesor de la capa j , a_j el factor de amplitud, $F_{j,k}$ son los coeficientes de Fresnel para reflexión. La resolución iterativa de estas ecuaciones se hace utilizando softwares específicos a tal fin. En esta tesis se utilizó StochFit [11], que además de permitir el ajuste con modelos de capas, como el descrito, también permite el ajuste modelo-independiente mediante transformadas inversas de Laplace.

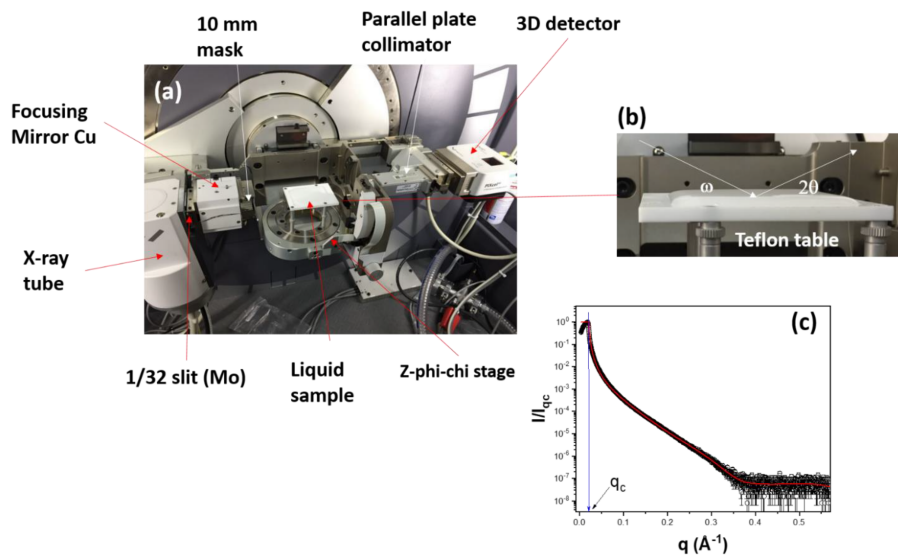


Figura 2.7: (a) Imagen de la configuración del equipo Empyrean III para para experimentos de XRR sobre monocapas en interfaz líquido-aire. (b) Cuba de teflon cubierta de solución, la altura del líquido debe sobrepasar el alto del recipiente. (c) Medidia de XRR para una monocapa de Gemini 12-2-12, se marca el módulo de vector de scattering crítico q_c

Las mediciones de reflectometría de rayos X se realizaron en un equipo Empyrean III (Malvern-Panalytical) de la Universidad Nacional del Sur, mostrado en la Figura 2.7. El instrumento utiliza un tubo de rayos X de cobre sellado como fuente de rayos X ($\lambda=1,54 \text{ \AA}$) en combinación con un espejo focalizante de rayos X (colimación de línea. ranura de 1/32 de Molibdeno). El dispositivo está equipado con un detector PIXcel3D utilizado en modo 0D con solo 3 canales activos (longitud de área activa de 0,165) y equipado con un colimador de placa paralela (PPC). El ángulo ω - 2θ se varió entre $0,1^\circ$ y 8° con un tamaño de paso de $0,0016^\circ$ y un tiempo de medición de 1.5 s / paso, siendo el rango del vector de onda explorado, q de aproximadamente $0.004 < q < 0.57 \text{ \AA}^{-1}$. El montaje fue adaptado para realizar mediciones en interfaces líquidas

(ver Figura 2.7). Se diseñaron y construyeron cubetas de Teflón para colocar la fase líquida, de forma tal que sobrepasara la altura de las mismas por aproximadamente 1 mm. La cubeta fue atornillada a una cuna de Euler para poder encontrar con precisión la interfaz líquida y alinear correctamente la óptica.

2.1.4. Microbalanza de cuarzo con control de disipación (QCM-D)

La microbalanza de cuarzo es una técnica superficial que permite detectar en tiempo real los cambios en la masa depositada sobre un sensor con resolución de nanogramos. Esencialmente son balanzas que permiten medir interacciones molécula-sustrato, molécula-molécula como cambios en la masa a medida que las moléculas se adsorben o liberan. Además de la variación de masa, QCM-D detecta disipación de energía en la muestra. Esto permite obtener información acerca de la viscoelasticidad del sistema bajo estudio y puede revelar la estructura así como cambios conformacionales, como colapso de capas o hidratación de las mismas.

El núcleo del funcionamiento es una unidad oscilante, un disco delgado de cuarzo con electrodos depositados a ambos lados. A través de la aplicación de un voltaje alterno sobre los electrodos se produce la oscilación de la pieza de cuarzo por piezoelectricidad. En particular, se puede excitar en resonancia y la frecuencia a la que sucede se relaciona con la masa del disco. Si el espesor cambia, también lo hará la frecuencia f . Por lo tanto, a través del monitoreo de los cambios en la frecuencia de resonancia Δf , es posible detectar los cambios de masa mencionados previamente. También QCM-D permite detectar la disipación de energía ΔD , obteniéndose para un proceso simple e ideal de adsorción un gráfico como se muestra en la Figura 2.8

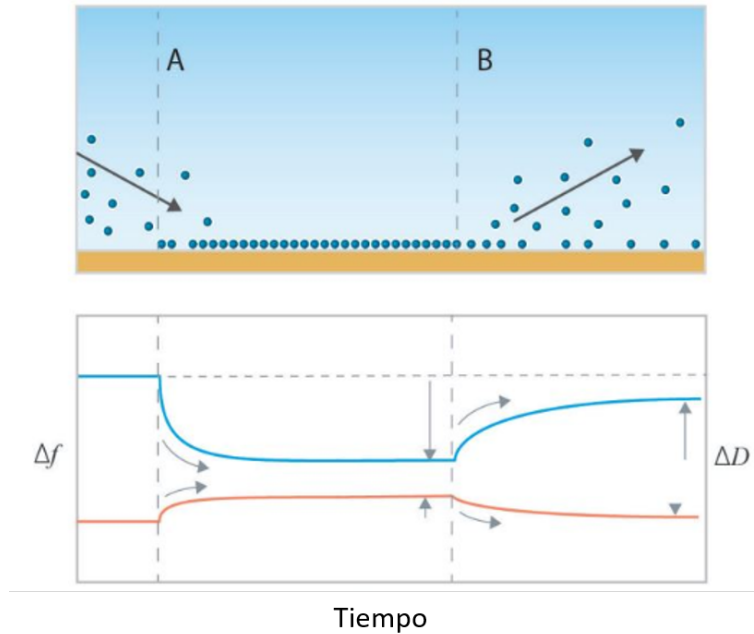


Figura 2.8: Esquema de (A) la adsorción de moléculas sobre un sustrato y (B) su desorción. En el panel inferior se observa la caracterización obtenida del proceso por QCM-D.

Para obtener cuantitativamente el cambio en la masa se utiliza la relación de Sauerbrey [12]:

$$\Delta m = -C \cdot \frac{\Delta f}{n} \tag{2.14}$$

donde C es la constante relacionada con las propiedades del cuarzo, llamada de sensibilidad de masa y $n = 1,3,5\dots$ es el número de armónico utilizado.

Los fenómenos de fricción en la muestra (pérdidas viscosas), producidos como consecuencia de la hidratación de los films conducen al amortiguamiento de la oscilación del cristal, lo que lleva a la necesidad de obtener información no solo de las variaciones de frecuencia sino también de la disipación de energía durante el proceso de oscilación, es decir del factor de disipación, D . Esta limitación impide utilizar el formalismo de Sauerbrey en la descripción de las películas adsorbidas desde fluidos. Dicho factor de disipación, D , se obtiene del decaimiento de la oscilación tras una conexión-desconexión periódica, de la diferencia de potencial que se aplica sobre el cristal, a la frecuencia de resonancia. Mediante un ajuste del decaimiento (amortiguamiento en ausencia de diferencia de potencial aplicado), se puede obtener tanto la frecuencia de resonancia como la disipación de energía del cristal de cuarzo y por tanto el factor de disipación.

Para traducir esta información en propiedades físicas la ecuación de Sauerbrey no es suficiente. Se ha desarrollado mediante la aplicación de modelos mecánicos continuos (modelo de Voigt o el formalismo acústico de multicapas) un formalismo que permite relacionar los datos experimentales de cambios de frecuencia, Δf , y de disipación, ΔD . Con el mismo, es posible cuantificar y separar las componentes viscoelásticas (elasticidad y viscosidad de cizalla) de los films [13, 14]. A su vez, también es habitual aplicar el modelo de Johannsmann [15–17]. La base de este modelo es realizar una aproximación basada en circuitos eléctricos equivalentes para realizar un análisis cuantitativo del espectro de impedancias. Debido a que la utilización de la técnica en este trabajo es meramente cualitativa, no se ahondará en la descripción de ambos modelos.



Figura 2.9: Equipo QSense Analyzer conectado a la bomba peristáltica para circulación de las soluciones, al lado el equipo desarmado mostrando las cuatro balanzas y los cristales de cuarzo

El equipo utilizado fue un QSense Analyzer de cuatro canales, lo que permite la medida simultánea con cuatro QCM-D. Se utilizaron los cuatro canales para realizar la misma experiencia y de esta forma hacer estadística. Para hacer circular las soluciones se utilizó una bomba peristáltica Ismatec de cuatro canales. El montaje puede observarse en la Figura 2.9. Se utilizaron cristales de cuarzo con electrodos de oro para soportar las multicapas.

2.2. Técnicas de caracterización en volumen

2.2.1. Efecto Kerr electroóptico

Efecto Kerr es una técnica no comercial desarrollada en el curso de esta tesis doctoral. El efecto electroóptico fue descubierto por el clérigo escocés John Kerr en 1875. Él encontró que una sustancia transparente e isotrópica se vuelve birrefringente cuando se la somete a un campo eléctrico E [18, 19]. El medio toma las características de un cristal uniaxial cuyo eje óptico corresponde a la dirección del campo aplicado [8]. El índice de refracción asociado n puede descomponerse en las componentes paralelas y perpendiculares al campo eléctrico, n_{\parallel} and n_{\perp} respectivamente. Su diferencia Δn es la birrefringencia y se relaciona con el campo eléctrico a través de la ley de Kerr:

$$\Delta n = \lambda_0 B E^2 \quad (2.15)$$

donde B es la constante de Kerr. La validez de esta ecuación es limitada ya que para campos eléctricos intensos el sistema satura su orientación y la birrefringencia adopta un valor constante.

Kerr también observó que para líquidos, la birrefringencia aparecía y desaparecía casi instantáneamente cuando el campo se encendía o apagaba, un resultado que difería de sus previas observaciones en sólidos como el vidrio o el cuarzo, para los cuales la birrefringencia aparecía o desaparecía en tiempos del orden de los segundos. Después de Kerr, otros desarrollaron la teoría del efecto y extendieron su aplicación a otros sistemas. Benoit, a lo largo de su doctorado, exploró la aplicación de estas técnicas en sistemas coloidales y fue el primero en medir la birrefringencia del ADN [20].

La base de la técnica consiste en medir la intensidad de luz que atraviesa una muestra ubicada entre dos polarizadores cruzados entre sí. Si la muestra no es birrefringente, la onda emerge de la muestra como entró, linealmente polarizada y se extingue en el segundo polarizador, cruzado respecto del primero. Pero al aplicar un campo eléctrico sobre la muestra se puede inducir una orientación preferencial de los dominios ópticos de la misma, convirtiéndose en birrefringente. En este caso, al atravesar la muestra, la onda electromagnética adquiere una fase extra en la dirección de los dominios. Por lo tanto, la luz emerge de la misma elípticamente polarizada y puede atravesar el segundo polarizador para ser detectada por un fotodetector. A partir de la medición de la intensidad de luz transmitida se puede obtener la birrefringencia. Los detalles del montaje y la conversión de intensidad a birrefringencia se desarrollarán en la siguiente sección.

El fenómeno subyacente consiste en lo siguiente: en ausencia de fuerzas externas, las partículas se orientan aleatoriamente por agitación térmica. Por lo tanto, la orientación de las mismas es isotrópica, sin ninguna dirección preferencial, con lo que $\Delta n = 0$. Sin embargo, el mismo sistema en un campo eléctrico no nulo presenta una orientación de las partículas anisotrópicas debido a la presencia de dipolos (permanentes o inducidos). En este contexto el índice de refracción es diferente si se mide perpendicular o paralelo al campo, por lo que $\Delta n \neq 0$. Es de destacar que las partículas deben presentar anisotropía óptica y eléctrica, por ejemplo una esfera rígida ideal es perfectamente isotrópica y no es orientable en un campo eléctrico, por esta razón no se induce birrefringencia en ella.

Este comportamiento emerge de un proceso complejo y, como se mostrará en breve, la determinación y análisis del origen de la birrefringencia en coloides involucra una combinación de efectos que se dan en simultáneo, de tipo eléctricos (que dan origen a la orientación del sistema) y ópticos, como se ejemplifica en la Figura 2.10. En ella se observa que tanto el establecimiento de dipolos inducidos (signos + y -) o la presencia de permanentes (flechas rojas) darán lugar a una dirección de orientación, marcada por el momento dipolar total (flecha gris), y además influirán en la orientación final

de la partícula. Suponiendo una partícula con simetría axial, la combinación de estos momentos puede orientarla de modo que el eje principal termine en cualquier posición entre paralelo y perpendicular a la dirección del campo. Al mismo tiempo, la anisotropía óptica de la partícula dará cuenta de esta orientación; si el eje principal óptico coincide con el de la partícula, una configuración paralela al campo dará una polarización óptica total en dicha dirección y se establecerá una dirección preferencial al paso de la luz, resultando en $\Delta n > 0$. En cambio, si la orientación resultante es tal que el eje principal queda perpendicular al campo, el eje óptico también lo estará y se establecerá dicha dirección como preferencial al paso de la luz, resultando en $\Delta n < 0$. El origen de estos efectos dependerá de las propiedades de cada sistema en particular.

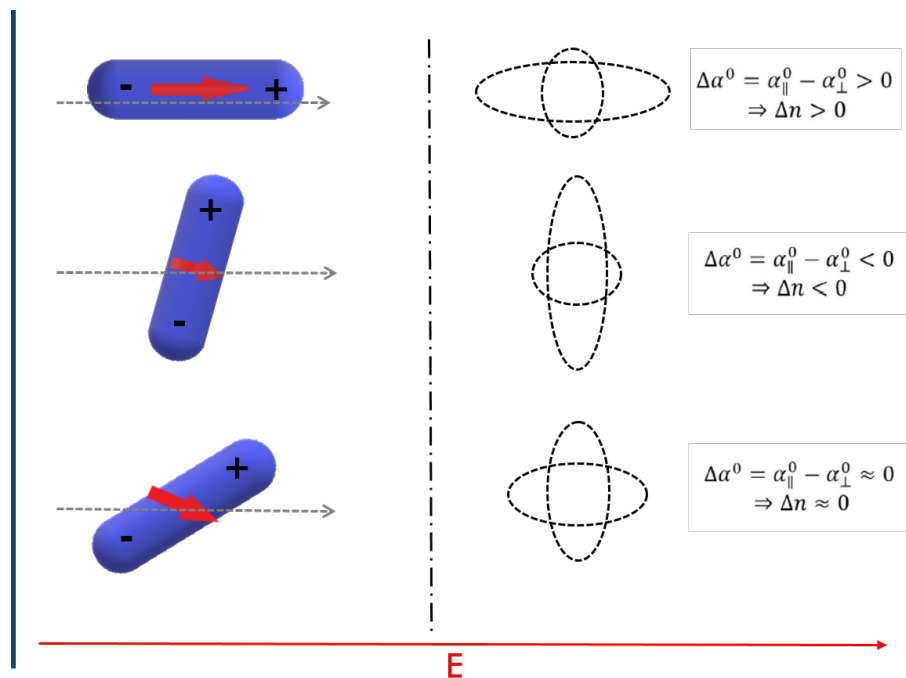


Figura 2.10: El signo de la birrefringencia depende de el momento dipolar eléctrico total (flecha punteada) resultante de los dipolos inducidos (signos \pm) y permanentes (flecha roja) y de la anisotropía óptica de las partículas (elipses punteadas). Las partículas se reorientan debido al dipolo eléctrico total, por lo tanto el eje óptico principal puede terminar en cualquier dirección entre paralelo ($\Delta n > 0$) o perpendicular ($\Delta n < 0$) al campo eléctrico.

Como se puede notar, la birrefringencia electroóptica condensa información extremadamente útil sobre las propiedades eléctricas, ópticas e incluso morfológicas de coloides, agregados, partículas, etc pero el desarrollo teórico para explicar el fenómeno ha sido realizado para muy pocos casos, ideales y de alta simetría que no abarcan la totalidad de configuraciones que dan lugar a lo medido. A pesar de ello, la descripción

cuantitativa de las mediciones también es valiosa para lograr dar una explicación más acabada de las propiedades de los coloides.

En esta tesis se utilizarán resultados teóricos desarrollados para sistemas axi-simétricos, tipo barra o cilindro y para elipsoides. Los supuestos del desarrollo son que las partículas constituyentes son rígidas simétricas, las cuales pueden ser orientadas por momentos dipolares inducidos o permanentes a lo largo del eje principal. Por lo tanto la birrefringencia puede ser expresada en los siguientes términos:

$$\Delta n(t) = \Delta\alpha^0] \Phi(t) \quad (2.16)$$

donde $\Delta\alpha^0 = \alpha_{\parallel}^0 - \alpha_{\perp}^0$ es la anisotropía óptica intrínseca de las partículas (la polarizabilidad de los electrones a la frecuencia de la fuente de luz) y Φ se define como el *factor de orientación*, el cual da cuenta del grado de orientación de las partículas en el campo eléctrico. Φ es la conexión entre las propiedades eléctricas que dan origen a las propiedades ópticas, por lo tanto depende del campo orientador E , de la anisotropía de las polarizabilidades eléctricas de las partículas $\Delta\alpha^e = \alpha_{\parallel}^e - \alpha_{\perp}^e$ y de la presencia de dipolos permanentes μ . Se define como:

$$\Phi = \int_0^{\pi} f(\theta) \left(\frac{3\cos^2\theta - 1}{2} \right) 2\pi \sin\theta d\theta \quad (2.17)$$

donde θ es el ángulo entre el campo eléctrico E y el eje de la partícula y $f(\theta)$ es la función distribución de orientación angular que depende de la energía electrostática U . En el caso más simple, en el que el eje de simetría de la partícula coincide con el dipolo permanente, a baja intensidad de campo, U se puede expresar:

$$U = -\mu E'(t) \cos\theta - \frac{1}{2}(\alpha_{\parallel}^e - \alpha_{\perp}^e) E(t)^2 \cos^2\theta \quad (2.18)$$

En ausencia de campo, Φ es cero y la partículas se encuentran orientadas aleatoriamente debido a la agitación térmica, resultado en birrefringencia nula. Si se aplica un campo eléctrico muy alto ($E \rightarrow \infty$) las partículas se orientarán completamente en la dirección del campo y por lo tanto $\Phi \rightarrow 1$. En cambio, si el campo tiene un valor finito, las moléculas adoptarán una orientación de equilibrio caracterizada por una birrefringencia estacionaria, la cual dependerá de la intensidad del campo.

En experimentos de birrefringencia transitoria (ver próximo apartado) se identifican dos fenómenos transitorios. El primero que corresponde al proceso de orientación de las partículas posterior al momento en que se enciende el campo; la birrefringencia aumenta hasta que alcanza el valor de birrefringencia estacionaria. Este proceso se lo conoce como relajación de *build up* (o de subida) y depende de los mecanismos de orientación, p.ej. la presencia de dipolos permanentes o inducidos. El segundo proceso

inicia al momento en el que se retira el campo eléctrico y corresponde a la relajación de las partículas hacia el estado aleatorio isotrópico inicial. Se lo conoce como birrefringencia de relajación y es independiente del proceso de orientación. Para una solución monodispersa de moléculas axialmente simétricas, la relajación esta dada por

$$\frac{\Delta n(t)}{\Delta n_\infty} = \exp(-t/\tau) \quad (2.19)$$

donde Δn_∞ es la birrefringencia estacionaria y τ el tiempo característico de relajación del sistema al estado isotrópico. Este tiempo se relaciona con la constante de difusión rotacional D_r a través de:

$$\tau = 1/6D_r \quad (2.20)$$

Para partículas cilíndricas, Broersma dedujo una ecuación que relaciona esta información con la longitud l y el diámetro d de las partículas [21]:

$$\tau = \frac{\pi\nu l^3}{18k_B T} \left[\ln \left(2 \frac{l}{d} \right) - 1,57 + 7 \left(\frac{1}{\ln \left(2 \frac{l}{d} \right)} - 0,28 \right)^2 \right]^{-1} \quad (2.21)$$

donde ν es la viscosidad del solvente y k_B la constante de Boltzmann. En los capítulos correspondientes se exhibirán los modelos utilizados para reproducir lo observado en las señales de birrefringencia. A continuación se detallará el montaje experimental y las configuraciones de medición implementados en este trabajo.

Descripción del experimento y montaje experimental

El montaje experimental utilizado se muestra en la figura 2.11. La luz de un laser pasa a través de un polarizador que se encuentra a 45° de la dirección del campo externo. La luz linealmente polarizada ingresa a la celda que contiene la muestra y dos placas paralelas conectadas a una fuente de tensión. En ausencia de campo eléctrico, la luz polarizada pasa por la celda, sin sufrir ninguna modificación. En este caso, ambas componentes de la luz, E_{\parallel} y E_{\perp} , están en fase, lo que resulta en una polarización lineal. La misma se extingue debido a un segundo polarizador (llamado analizador) cuyo eje principal se encuentra cruzado a 90° respecto del primero. Un detector fotodiodo se ubica después del analizador para coleccionar la intensidad de luz. Sin embargo cuando se aplica un campo eléctrico a la muestra entre las placas, esta se vuelve birrefringente y la luz incidente adquiere una fase distinta en alguna de sus componentes, obteniéndose ya no una polarización lineal a la salida de la celda sino elíptica. Luego de pasar por el analizador, esta componente sobrevive y se detecta una señal no nula en el fotodetector. Entre la salida de la celda y el analizador se coloca una lámina de cuarto de onda

para distinguir birrefringencia positiva ($n_{\parallel} > n_{\perp}$) de la negativa ($n_{\parallel} < n_{\perp}$). Como se ha expuesto, la intensidad de la luz transmitida es proporcional a la magnitud de la anisotropía óptica de la muestra y a la intensidad del campo eléctrico externo aplicado (el grado de orientación de las partículas típicamente aumenta con la fuerza del campo eléctrico).

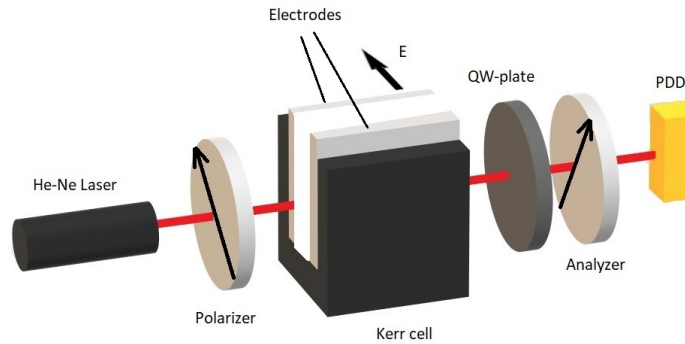


Figura 2.11: Esquema del diseño experimental para medición de efecto Kerr electroóptico

El sistema óptico puede ser tratado teóricamente y encontrarse la relación entre la intensidad de luz medida y la birrefringencia Δn como se exhibe en la ecuación 2.22 [8]:

$$I - I_0 = I_0(\text{sen}^2(\alpha + \delta/2) - \text{sen}^2\alpha) \quad (2.22)$$

$$\delta = 2\pi l_c \Delta n / \lambda = K_c \Delta n \quad (2.23)$$

donde I_0 es la intensidad de luz incidente, α es el ángulo de apertura del analizador respecto de la posición totalmente cruzada y δ la fase extra agregada por la birrefringencia de la muestra. Esta cantidad se puede traducir en Δn a través de la ecuación 2.23 relacionadas por K_c , la constante de celda que condensa los parámetros ópticos y geométricos del montaje: l_c es el largo de la celda de Kerr, λ la longitud de onda incidente. Esta cantidad usualmente emerge de la calibración del sistema óptico con varios líquidos puros y sus constantes de Kerr que son conocidas (agua, octanol, tolueno, entre otros)

A través de la variación de la magnitud de los campos eléctricos orientadores y utilizando la ley de Kerr, la constante B de una solución coloidal desconocida puede ser determinada. Sin embargo, las dinámicas de orientación, que dependen en parte de las propiedades morfológicas de los coloides se encuentran codificadas en las relajaciones

de subida y de bajada, como se ha mencionado previamente. La colección y el análisis de estas señales da lugar a la técnica de Birrefringencia eléctrica transitoria o TEB por sus siglas en inglés. En este tipo de medidas, el campo eléctrico aplicado es un pulso cuadrado, fijo, de micro/mili segundos de duración. El montaje experimental utilizado se esquematiza en la Figura 2.12. Al montaje general descrito en la sección previa, se le agrega un generador de pulsos fabricado para este propósito en el Centro Científico Tecnológico de Bahía Blanca, el cual se conecta a los electrodos ubicados en la celda Kerr para que se aplique el pulso cuadrado orientador. Esto produce un comportamiento *ON-OFF* en la birrefringencia de la muestra. El detector adquiere la señal de respuesta, la cual se observa y almacena en un osciloscopio conectado al fotodiodo.

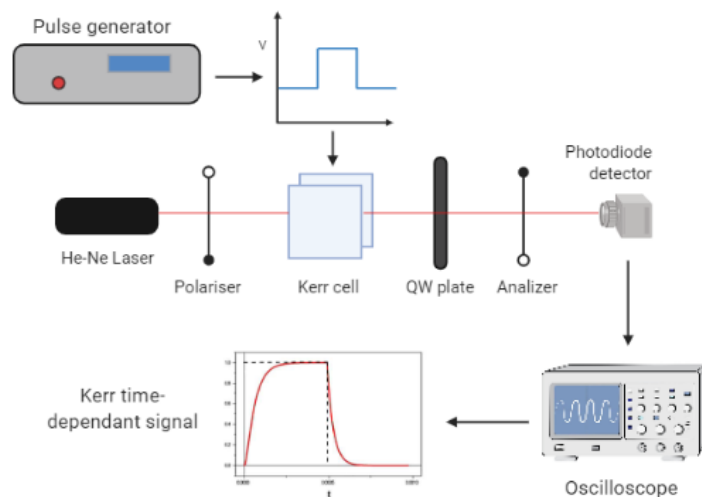


Figura 2.12: Esquema del montaje experimental para mediciones de TEB.

En resumen, el equipo ensamblado en el laboratorio cuenta con un láser de He-Ne de 15 mW situado sobre un banco óptico. El haz atraviesa un primer polarizador Thorlabs ubicado con su eje óptico a 45° respecto de la horizontal. Luego el mismo incide sobre la muestra termalizada por un baño térmico contenido en una cubeta de acero aislada por un cobertor de teflon. La muestra se encuentra contenida entre dos electrodos de placas rectangulares paralelas de acero no magnetizable separadas por $(2,0 \pm 0,1)$ mm. Los mismos se encuentran conectados a fuente de alta tensión pulsada construida en UAT-CCT. La señal medida en el detector fotodiodo se visualiza en un osciloscopio GWinstek GDS1152A conectado a la PC y, a través de un software escrito en C++, se adquiere la totalidad de los datos sensados en la ventana temporal medida y cinco promedios de la tensión medida por el detector en la zona de aplicación del campo para cinco intervalos de tiempo equiespaciados. El código se encuentra reproducido en el Anexo correspondiente a este capítulo en el Apéndice.

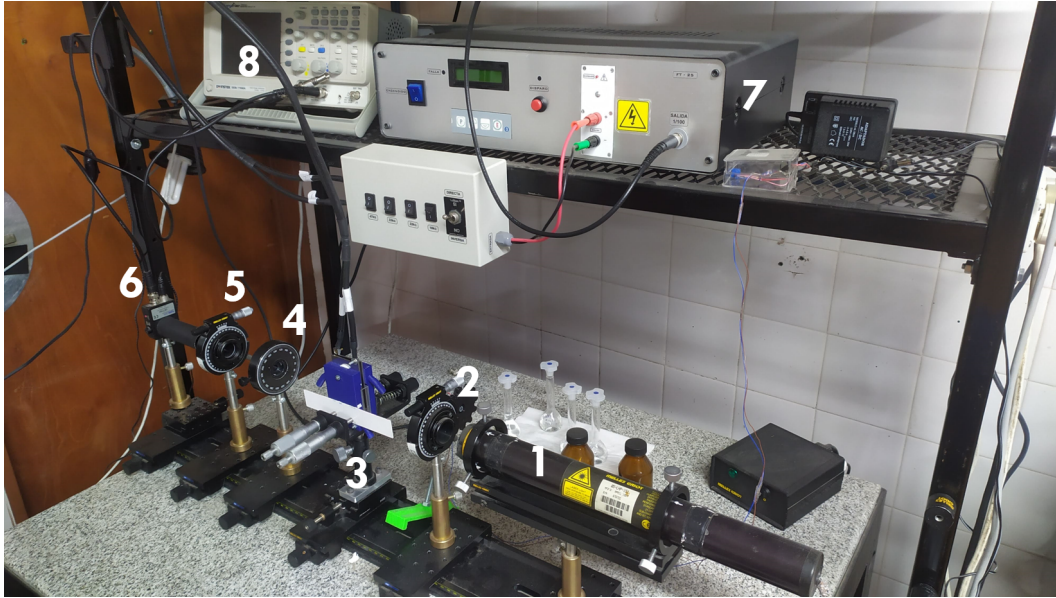


Figura 2.13: Equipo utilizado para la medición de efecto Kerr (1) Laser de He-Ne, (2) polarizador, (3) celda Kerr sobre posicionador micrométrico, (4) Lámina de cuarto de onda, (5) analizador (polarizador cruzado), (6) Detector fotodiodo, (7) Fuente de tensión de pulsos, (8) Osciloscopio.

2.2.2. Técnicas de dispersión de luz

Dispersión de luz dinámica (DLS)

Es una técnica ampliamente usada en la caracterización de suspensiones coloidales [22]. La técnica se basa en la correlación temporal de las fluctuaciones de intensidad de luz dispersada por la suspensión coloidal y a través de ella, obtener información sobre las partículas suspendidas, como el coeficiente de difusión traslacional o la polidispersidad de la muestra. Las partículas coloidales suspendidas en un líquido poseen un movimiento aleatorio debido a fluctuaciones térmicas de densidad, llamado movimiento Browniano. El desarrollo del experimento consiste en incidir con una fuente de luz sobre el volumen de una muestra, a un ángulo fijo, se coloca un detector para medir las variaciones de intensidad de luz dispersada. Por lo tanto, los centros dispersores y las posiciones intraparticulares cambian con el tiempo como así también la intensidad detectada, la cual fluctúa alrededor de un valor medio $\langle I \rangle$.

Para analizar cuantitativamente la movilidad de las partículas es conveniente expresar estas fluctuaciones en términos de funciones de correlación. La intensidad dispersada se multiplica por sí misma luego de un corrimiento temporal τ , y este producto se promedia sobre el tiempo total de medida. El resultado es τ -dependiente: $\langle I_s(q, t)I_s(q, t + \tau) \rangle$; donde q es el módulo del vector de scattering definido como:

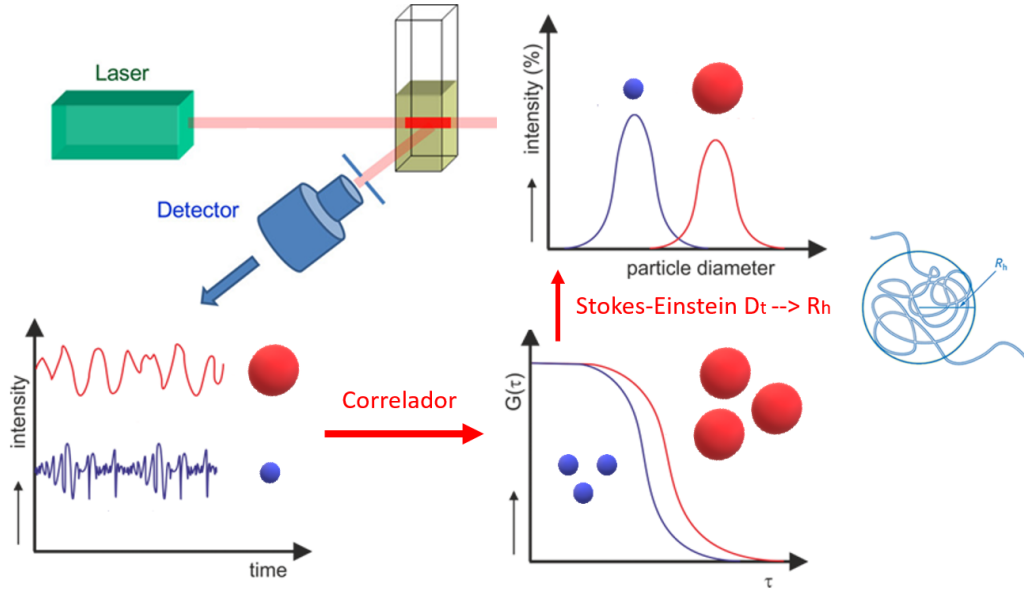


Figura 2.14: Esquema del proceso de medición del Radio hidrodinámico por DLS. Se puede observar que las partículas más grandes tardan más tiempo en descorrelacionar que las pequeñas. Esta medida puede ser traducida en el coeficiente de traslación difusional D_t y a través de la ecuación 2.30 obtener el R_h .

$$q(\theta) = \frac{4\pi n_d \sin(\theta/2)}{\lambda_0} \quad (2.24)$$

donde n_d es el índice de refracción del solvente, θ el ángulo de dispersión y λ_0 la longitud de onda del haz incidente. Siguiendo, se puede normalizar la función de autocorrelación de intensidades obteniéndose:

$$g_2(q, \tau) = \frac{\langle I_s(q, t) I_s(q, t + \tau) \rangle}{\langle |I_s(q, t)|^2 \rangle} \quad (2.25)$$

A medida que τ se hace mayor, las partículas coloidales se mueven unas respecto de las otras y su configuración espacial se diferencia progresivamente respecto a la original a tiempo t (se descorrelacionan) y por lo tanto, la función de autocorrelación ec. 2.25 disminuye desde 1 (correlación perfecta), a cero, completamente descorrelacionado. La velocidad con la cual la función de correlación decae está directamente relacionada con la velocidad con la cual se mueven las partículas coloidales, es decir, con el coeficiente de difusión traslacional D_t

A través de la relación de Siegert [23] g_2 puede relacionarse con el factor de estructura dinámico $g_1(q, \tau)$:

$$g_2(q, \tau) = 1 + \beta |g_1(q, \tau)|^2 \quad (2.26)$$

$$g_1(q, \tau) = \frac{\langle E_s(q, t) E_s^*(q, t + \tau) \rangle}{\langle |E_s(q, t)|^2 \rangle} \quad (2.27)$$

Tipicamente, el factor de estructura dinámico contiene información acerca del coeficiente de difusión traslacional D_t . Para una muestra monodispersa g_1 se expresa simplemente como:

$$g_1(q, \tau) = \exp(-\Gamma\tau) \quad (2.28)$$

Con la tasa de decaimiento Γ definida como:

$$\Gamma = q^2 D_t \quad (2.29)$$

Con todo esto, el desarrollo de una medida de DLS consiste en medir la intensidad de luz dispersada por una muestra en función del tiempo a un ángulo fijo, luego a través de un correlador, obtener la autocorrelación de intensidades, obtener la función g_2 (Ec. 2.25) y a través de algún ajuste obtener los parámetros que la definen y relacionarla con el coeficiente D_t . Con este dato y a través de la ecuación de Stokes-Einstein [24], se puede obtener el radio hidrodinámico R_h :

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_t} \quad (2.30)$$

con k_B la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta y η la viscosidad del medio. El radio hidrodinámico se define como el radio que corresponde a una esfera con el mismo coeficiente de difusión que el coloide medido, lo cual significa que R_h es igual al tamaño solo si la partícula coloidal es una esfera rígida. El procedimiento se esquematiza en la Figura 2.14.

La validez de esta ecuación es limitada ya que en el desarrollo se aceptaron ciertas hipótesis sobre el sistema, como la esfericidad de las partículas y la homogeneidad de la viscosidad del medio. Más aún, el coeficiente de difusión sólo puede obtenerse por DLS para soluciones muy diluidas. En los casos de soluciones más concentradas, la interacción entre partículas no puede ser despreciada y puede tener una influencia importante en la movilidad de las partículas. En estos casos hablaremos de un coeficiente de difusión D_t aparente.

Para muestras polidispersas, se deben hacer modificaciones en el análisis de los datos. Primeramente, se deberá introducir una distribución de tamaños $P(R_h)$, relacionada experimentalmente con una función de distribución de coeficientes de difusión $P(D_t)$, la cual no sólo depende del número de especies i , n_i , sino también de la masa molar M_i y el factor de forma $P(q)$. Consecuentemente, el factor de forma dinámico se expresa siguiendo la relación:

$$g_1(\tau, q) = \int_0^\infty P(D_t) \exp(-D_t q^2 \tau) dD_t \quad (2.31)$$

En la práctica se utiliza el método de cumulantes, el ajuste multiexponencial o el método CONTIN previamente mencionado [3] para obtener la distribución de coeficientes de difusión. Se describirá brevemente el método de cumulantes. En teoría estadística, la función cumulante $\kappa(t)$ se obtiene tomando logaritmo natural de la función característica de una distribución de probabilidad, en nuestro caso $g_1(\tau)$ y $P(D_t)$ [25]. Los cumulantes $K_i(q)$ se definen como los coeficiente de una expansión en serie de $\kappa(\tau, q)$ en serie de MacLaurin [26]:

$$\kappa(\tau, q) = \sum_{i=1}^{\infty} K_i(q) \frac{(-\tau)^i}{i!} \quad (2.32)$$

De esta forma, los cumulantes se pueden relacionar con los momentos M_i de $P(D_t)$, donde M_1 es el valor medio y $M_{i,i>1}$ son los momentos centrales. En particular, $K_1 = \langle D_t \rangle q^2$ es el coeficiente de difusión promedio y a través de la relación de 2.30 se puede obtener el radio hidrodinámico $\langle R_h \rangle$. El segundo cumulante da una medida cuantitativa de la polidispersidad de la función distribución de coeficientes de difusión, también llamado índice de polidispersidad PDI , definido como:

$$PDI = \frac{K_2}{K_1^2} \quad (2.33)$$

Los límites de este análisis están restringidos a sistemas con polidispersidades pequeñas $\Delta R_h/R_h \leq 20\%$.

Dispersión de luz electroforética (ELS)

El principio de medición es el mismo que para DLS, autocorrelacionar la intensidad de la luz dispersada por partículas. La diferencia principal radica en que los centros dispersores ya no se encuentran en régimen Browniano sino bajo la influencia de un campo eléctrico externo. De esta forma una partícula cargada positivamente tenderá a moverse hacia el cátodo pero los iones que forman parte de la doble capa eléctrica (ver Figura 2.15) tenderán a moverse hacia el ánodo, produciendo un efecto de arrastre.

Cuando estos efectos se compensan y se alcanza el equilibrio, las partículas se desplazan a velocidad constante. Con la información extraída del movimiento relativo de las partículas con respecto al medio se puede lograr alcanzar una visión completa de la densidad de carga y el potencial en la inmediación de las mismas. Para la determinación de la velocidad de las partículas se utiliza el método de análisis de fase de la luz dispersada (PALS). La frecuencia de luz dispersada por las mismas difiere de la incidente y es proporcional a su velocidad, por lo tanto, realizando una comparación con una señal de referencia (una porción del haz incidente).

Con esta información se puede determinar la movilidad electroforética μ de la siguiente forma [27]:

$$\mu_E = \frac{V_p}{E} \quad (2.34)$$

donde V_p es la velocidad promedio y E el campo eléctrico aplicado. La relación entre esta magnitud y los parámetros que describen la electrodinámica de los sistemas coloidales tales como el potencial ζ no son triviales debido a la complejidad de los mismos y la interconexión entre fenómenos eléctricos y fluidodinámicos. La ecuación de Henry condensa dicha relación [28]:

$$\mu_E = \frac{2\epsilon\zeta f(\kappa a)}{3\eta} \quad (2.35)$$

con ϵ y η la permitividad eléctrica y la viscosidad del medio y la función de Henry $f(\kappa a)$ como la función que resume la relación de las propiedades geométricas de las partículas (radio a) y de la doble capa eléctrica (longitud de Debye $1/\kappa$). Existen dos casos límites en los que esta última función adquiere valores triviales y se puede obtener una relación simple entre μ y ζ . El primer caso corresponde a la aproximación de Smoluchowsky, donde se asume que la doble capa es delgada en comparación con el radio de la partícula, κ es mucho menor que 1 y en consecuencia el valor de la función de Henry se reemplaza por 1.5. Para sistemas en soluciones acuosas, con partículas mayores a 200 nm y con una fuerza iónica moderada (mayor a 10^{-3} M) se utiliza esta aproximación. El otro límite corresponde al caso opuesto, partículas pequeñas en comparación con la doble capa eléctrica, dando lugar a la aproximación de Hückel. En este caso la función de Henry toma el valor de 1 y se utiliza comúnmente en sistemas dispersos en soluciones no polares [29]

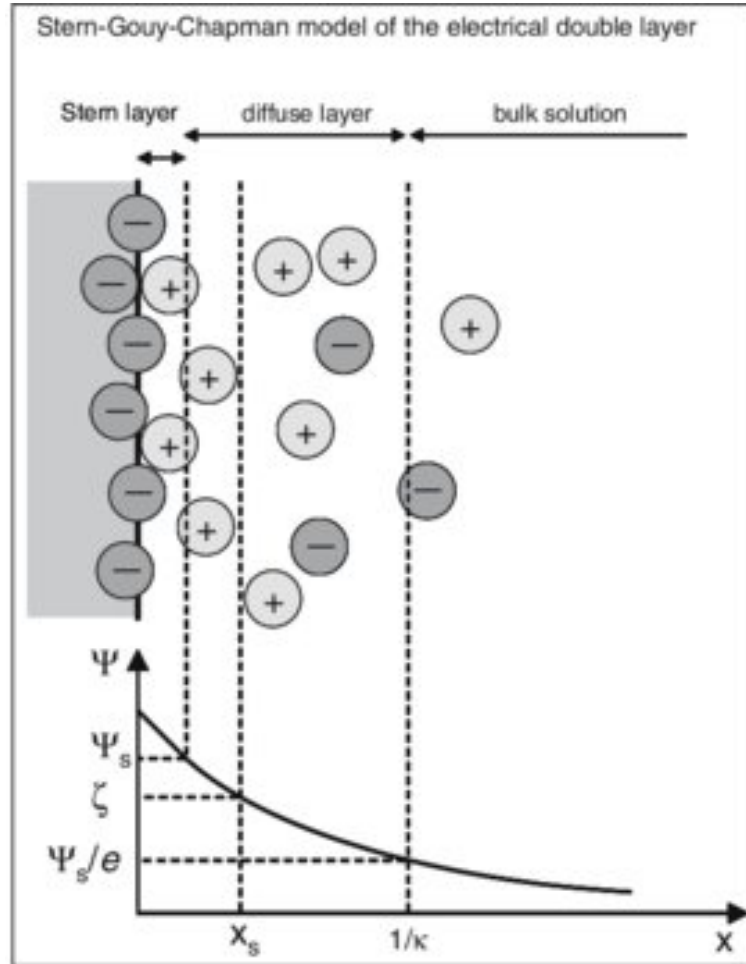


Figura 2.15: Diagrama esquemático que muestra la doble capa eléctrica sobre la superficie de una partícula, con los diferentes potenciales de interés. Notar que la longitud de Debye $1/\kappa$ es donde el potencial de Stern disminuye a $1/e$ veces su valor

Para la realización de las medidas de DLS y ELS se utilizó un equipo comercial Malvern Zetasizer Nano. El mismo contiene dos detectores ubicados en los ángulos de dispersión 173° y $13,4^\circ$. La fuente de luz proviene de una laser monocromático polarizado de 632.8 nm y una potencia de 4 mW. En la Figura 2.16 se observa el equipo junto con las cubetas utilizadas para las mediciones de DLS y ELS respectivamente.



Figura 2.16: Equipo Malvern Zetsizer Nano junto con cubetas descartables para medidas de DLS (izquierda) y ELS (derecha)

2.2.3. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)

La técnica permite cuantificar la afinidad entre ligandos. A su vez, se puede medir directamente la estequiometría de la reacción de binding ¹. Un experimento de ITC se realiza a temperatura constante mientras se titula uno de los ligandos contenido en una celda de muestra, con el otro ligando que se encuentra contenido en una jeringa. Previo al agregado este último, se mantiene una celda de referencia llena con el solvente utilizado en las muestras a temperatura constante. Luego de la adición de una pequeña alícuota del titulante, en el límite de titulación infinitesimal [30], se mide el calor absorbido o liberado en la celda de muestra con respecto a la de referencia. En una reacción exotérmica, la temperatura de la celda de muestra aumentará con el agregado de ligando. Esto causa una retroalimentación para disminuir la potencia suministrada en la celda de muestra, para mantener la misma temperatura en las dos celdas. En una reacción endotérmica ocurre lo opuesto, el circuito de retroalimentación aumenta la potencia para mantener la temperatura constante. El experimento se realiza enteramente bajo control de computadora.

Un calorímetro se esquematiza en la Figura 2.17, compuesto por dos celdas idénticas hechas de un material altamente eficiente para la conductividad térmica y químicamente inerte, como lo es la aleación Hastelloy u oro, rodeado por una camisa adiabática [31]. Se utilizan circuitos de termopilas/termocuplas muy sensibles para detectar las diferencias de temperatura entre las celdas.

¹Tipo de reacción entre dos componentes, uno compuesto de moléculas pequeñas llamado ligandos, que se unen a otro llamado receptor.

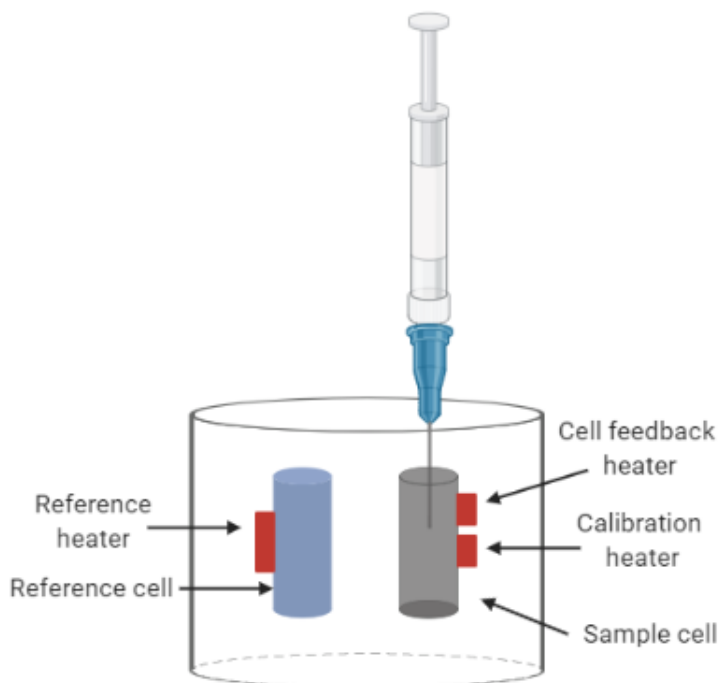
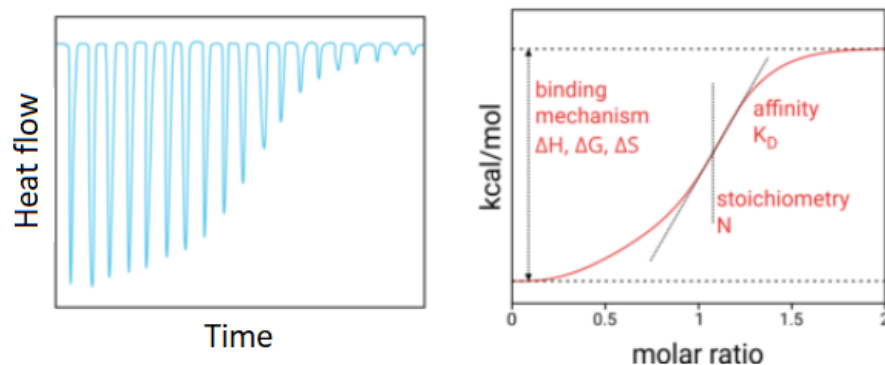


Figura 2.17: Esquema del equipo de ITC

Usualmente es necesario desgasar las muestras para obtener medidas precisas ya que la presencia de burbujas de gas dentro de la celda de muestra provoca gráficos anormales en los resultados adquiridos. Una limitación específica de ITC es que el rango útil de medidas de afinidades es estrecho, típicamente con constantes de binding K_a ² en el rango de $0.1-10 \mu\text{m}^{-1}$, si se compara con otras técnicas [32]. Sin embargo, la técnica es muy sensible y permite que tales medidas sean realizadas en condiciones ambiente y para soluciones relativamente diluidas, representando sistemas reales.

El resultado de la medida es la potencia necesaria para mantener las celdas a igual temperatura en función del tiempo. Como se observa en la Figura 2.18(a) los datos crudos experimentales consisten en una serie de picos de flujo de calor (potencia); cada pico corresponde a un volumen de inyección del ligando. Estos picos de flujo se integran con respecto al tiempo y se obtiene el calor total intercambiado por inyección. Este patrón en función del ratio molar [ligando]/[molécula objetivo], como se observa en la figura 2.18(b), puede ser analizado para obtener los parámetros termodinámicos de la interacción estudiada.

²En una reacción de binding que llegó al equilibrio la constante de binding K_a queda definida como el cociente entre las concentraciones de los componentes ligados sobre las concentraciones de los componentes libres.



(a) Flujo de calor a la celda muestra *vs.* tiempo. (b) Integral del calor *vs.* Ratio molar ratio.

Figura 2.18: Datos obtenidos en un experimento de ITC

La constante de binding (K_a), la entropía y entalpía de binding molar (Δs_0 , Δh_0) se pueden determinar directamente de los datos permitiendo el cálculo de la energía libre de Gibbs. Estos parámetros son propiedades del sistema y reflejan las distintas contribuciones a la reacción de binding, desde cambios morfológicos en las moléculas durante la asociación hasta cambios en la interacción entre moléculas y solvente. La magnitud relativa del cambio en la entalpía, refleja la fuerza de las interacciones del ligando con las moléculas objetivo, incluyendo van der Waals, puentes salinos, puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas; mientras que en la entropía se asocia a la reorganización del solvente y otras contribuciones entrópicas como reemplazo de contraiones o la orientación y ensamblado de grupos no polares para evitar el contacto con el agua [33].

Se utilizó un calorímetro VP-ITC MicroCalorimeter con celdas de Halesstoy. El procedimiento de medición se detallará en la sección correspondiente.

2.2.4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Esta técnica utiliza un haz de electrones como sonda para *observar* la muestra. Los electrones interactúan con la materia de muchas maneras, pero los transmitidos son colectados por un detector. Este tipo de medidas implica un desarrollo y un montaje más complejo que el que necesita un microscopio electrónico de escaneo (SEM). Los electrones deben ser acelerados a altas energías para traspasar la muestra y ser detectados (del orden de cientos de keV). Más aún, la muestra no puede tener más de 100 nm de espesor debido al aumento en la probabilidad de retrodispersión. Sin embargo, la técnica logra resolución atómica permitiendo estudios morfológicos y estructurales detallados. En el presente trabajo, TEM se configuró en modo transmisión para obtener imágenes de alta resolución de partículas orgánicas autoensambladas y así acceder a

su distribución morfológica y comparar con otras técnicas. TEM es altamente útil para muestras no orgánicas y cristalinas; para muestras orgánicas el protocolo de preparación es crucial para mejorar el contraste. En el caso de complejos cargados, lo que se realizó fue la carga de una grilla metálica con la carga opuesta al complejo. Posteriormente, se colocaron $2 \mu\text{l}$ de solución con el complejo y se le extrajo el líquido con un papel de secar. Debido a que las muestras orgánicas tienen poco contraste debido a su baja conductividad, se las recubrió con molibdato de amonio. La microscopía se realizó con un microscopio JEOL JEM 1010 operado a una tensión de aceleración de 100 kV.

2.2.5. Espectroscopía de fluorescencia

Esta técnica se basa en explotar la propiedad de fluorescencia de los compuestos que lo sean y realizar un análisis cualitativo o cuantitativo de propiedades de los mismos, sus estados vibracionales y las modificaciones que sufren por los cambios de entorno o conformacionales. Las aplicaciones son innumerables y dependen del sistema a estudiar, sin embargo el principio teórico en el que se basa es el mismo: primeramente se excita el material a través de la absorción de un fotón, que lo lleva del estado fundamental electrónico a uno de sus estados vibracionales dentro del estado electrónico excitado. Luego debido a pérdidas de energía por colisiones (pérdidas no radiativas), decaerá a algún estado vibracional menor; para luego decaer nuevamente al nivel energético fundamental provocando la emisión de un fotón. Este último no necesariamente tendrá la misma energía que el absorbido ya que perdió energía en el proceso y parte de un estado vibracional menor que el excitado como se observa en la Figura 2.19. Como la diferencia de energía puede variar debido a la aleatoriedad de las pérdidas por colisiones, cada fotón emitido va a poseer una energía o longitud de onda diferente, lo que causa que se obtenga un espectro de emisión.

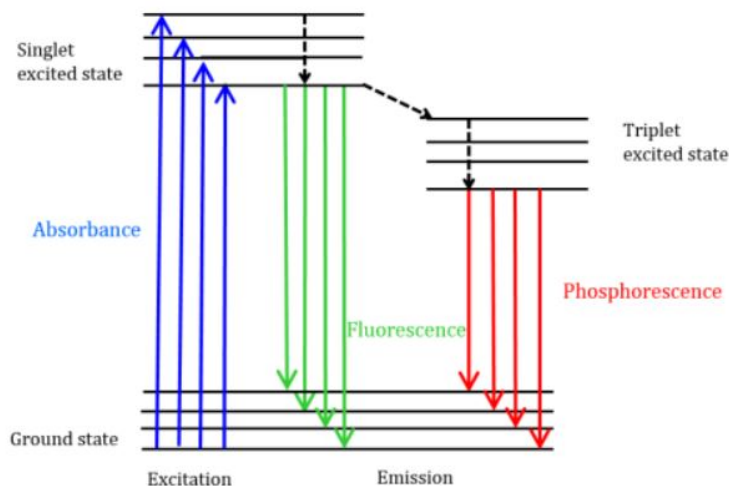


Figura 2.19: Diagrama de Jablonsky que ilustra las diferentes transiciones entre los estados de energía de una molécula. Las líneas punteadas representan decaimientos no radiativos.

La espectroscopia de fluorescencia estacionaria consiste en excitar continuamente la muestra con una longitud de onda fija y coleccionar la emisión en un rango amplio de longitudes de onda para fabricar el espectro. Para ello se utilizó un espectrofluorómetro Fluorolog[®]-3 (Horiba-Jobin Yvon) como el que se observa en la Figura 2.20

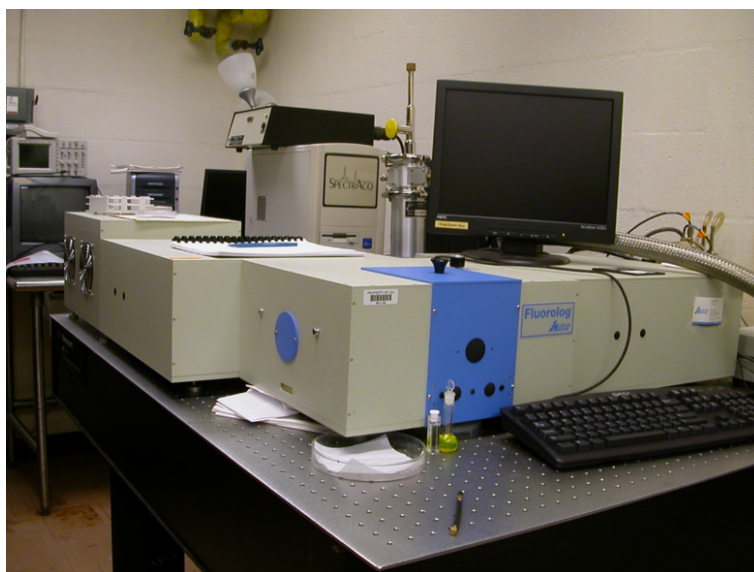


Figura 2.20: Espectrofluorómetro Fluorolog-3

El proceso de emisión radiativa por fluorescencia tiene una ventana temporal característica en la que sucede. En el caso más simple e ideal, este decaimiento temporal de la señal de fluorescencia del estado excitado de una molécula al fundamental puede ser expresado en términos de:

$$I(t) = I_0 \exp(-t/\tau) \tag{2.36}$$

donde I_0 es la intensidad al momento de la excitación y τ es la tasa de decaimiento o tiempo de vida. Este proceso tiene lugar en la escala de tiempo de nanosegundos y τ puede ser influenciada por distintos procesos moleculares, por ejemplo, la emisión de un fluoróforo puede verse afectada por su entorno o por la presencia de otras moléculas que interactúan con él. Por lo tanto, las técnicas de determinación del tiempo de vida puede ser útil para dilucidar cambios en el nanoentorno, tales como pH, viscosidad, *polaridad*, solvatación como tamaños de partículas, interacciones moleculares, etc.

En particular, la técnica de conteo de fotones individuales correlacionados en el tiempo (*Time-correlated single photon counting*) permite la reconstrucción del perfil de intensidades de fluorescencia en función del tiempo $I(t)$ con gran precisión. La técnica se basa en la medición del tiempo transcurrido entre la excitación y la detección de un único fotón. Para ello, una fuente pulsada excita la muestra iniciando el cronómetro, el cuál se detiene con la llegada de un único fotón al detector como se esquematiza en la Figura 2.21. La diferencia de tiempo entre estas dos señales se deposita entonces en un histograma que consiste en intervalos de tiempo con un ancho fijo (Δt). Así, las señales que llegan dentro de $t+\Delta t$ se contabilizan en un bin específico. Este proceso de excitación-emisión se repite muchas veces, como para construir un histograma de frecuencia vs. tiempo, el cual es representativo del decaimiento en la intensidad de fluorescencia.

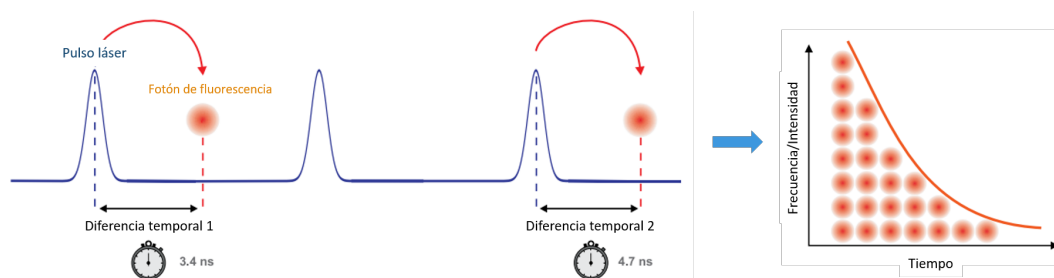


Figura 2.21: Esquema del proceso de medición. Se excita con una fuente pulsada y detecta un único fotón. A través de una electrónica veloz se pueden traducir las señales en tiempo y con la repetición generar una estadística que reproduzca el perfil de tiempo de vida de fluorescencia del sistema.

La frecuencia del láser o LED pulsado utilizado como fuente de excitación (típicamente entre 10 kHz y 100 MHz) se sincroniza con el tiempo al que el fotón llega

al detector (p.ej. un tubo fotomultiplicador). Se utilizan electrónicas precisas para la conversión y registro de estos eventos encadenados hasta que se colecta lo suficiente como para dar una buena estadística y reconstruir el decaimiento. Luego, el decaimiento se ajusta con una función (en muchos casos, multiexponenciales) para modelarlo y obtener el tiempo de vida de fluorescencia τ . Esta técnica se utiliza para medir tiempos de vida de fluorescencia que van desde los picosegundos a los microsegundos. Para este trabajo se utilizó un equipo no comercial, montado en la Universidad de Roma la Sapienza, por el grupo del Dr Mauro Giustini. Los detalles del equipo se encuentran en la referencia [34]

Bibliografía

- [1] Haim Diamant and David Andelman. Adsorption kinetics of surfactants at fluid-fluid interfaces. In *Amphiphiles at Interfaces*, pages 51–59. Springer, 1997.
- [2] Francisco Monroy, Francisco Ortega, and Ramón G Rubio. Dilatational rheology of insoluble polymer monolayers: Poly (vinylacetate). *Physical Review E*, 58(6):7629, 1998.
- [3] Stephen W Provencher. Contin: a general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. *Computer Physics Communications*, 27(3):229–242, 1982.
- [4] J Pellicer, V Garcia-Morales, and MJ Hernandez. On the demonstration of the young-laplace equation in introductory physics courses. *Physics Education*, 35(2):126, 2000.
- [5] Shuoqi Li, Mingchao Liu, Dorian Hanaor, and Yixiang Gan. Dynamics of viscous entrapped saturated zones in partially wetted porous media. *Transport in Porous Media*, 125(2):193–210, 2018.
- [6] Adrian Daerr and Adrien Mogne. Pendent_drop: an imagej plugin to measure the surface tension from an image of a pendent drop. *Journal of Open Research Software*, 4(1), 2016.
- [7] LA Feigin, Dimitrij I Svergun, et al. *Structure analysis by small-angle X-ray and neutron scattering*, volume 1. Springer, 1987.
- [8] E. Hecht. *Optics*. Pearson Education, Incorporated, 2017.
- [9] Heinz Kiessig. Untersuchungen zur totalreflexion von röntgenstrahlen. *Annalen der Physik*, 402(6):715–768, 1931.
- [10] L. G. Parratt. Surface studies of solids by total reflection of x-rays. *Phys. Rev.*, 95:359–369, Jul 1954.
- [11] Stephen M. Danauskas, Dongxu Li, Mati Meron, Binhua Lin, and Ka Yee C. Lee.

- Stochastic fitting of specular x-ray reflectivity data using stochfit. *Journal of Applied Crystallography*, 41(6):1187–1193, 2008.
- [12] Günter Sauerbrey. Verwendung von schwingquarzen zur wägung dünner schichten und zur mikrowägung. *Zeitschrift für physik*, 155(2):206–222, 1959.
- [13] Marina V Voinova, M Rodahl, M Jonson, and B Kasemo. Viscoelastic acoustic response of layered polymer films at fluid-solid interfaces: continuum mechanics approach. *Physica Scripta*, 59(5):391, 1999.
- [14] Michael Rodahl, Fredrik Höök, Anatol Krozer, Peter Brzezinski, and Bengt Kasemo. Quartz crystal microbalance setup for frequency and q-factor measurements in gaseous and liquid environments. *Review of Scientific Instruments*, 66(7):3924–3930, 1995.
- [15] D Johannsmann, K Mathauer, G Wegner, and W Knoll. Viscoelastic properties of thin films probed with a quartz-crystal resonator. *Physical Review B*, 46(12):7808, 1992.
- [16] Diethelm Johannsmann. Viscoelastic analysis of organic thin films on quartz resonators. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 200(3):501–516, 1999.
- [17] Diethelm Johannsmann. Viscoelastic, mechanical, and dielectric measurements on complex samples with the quartz crystal microbalance. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 10(31):4516–4534, 2008.
- [18] John Kerr. Xl. a new relation between electricity and light: Dielectrified media birefringent. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 50(332):337–348, 1875.
- [19] John Kerr LL.D. Xxii. measurements and law in electro-optics. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 9(55):157–174, 1880.
- [20] H Benoit. Sur un dispositif de mesure de leffet kerr par impulsions electriques isolees. *COMPTES RENDUS HEBDOMADAIRES DES SEANCES DE L ACADEMIE DES SCIENCES*, 228(22):1716–1718, 1949.
- [21] S Broersma. Rotational diffusion constant of a cylindrical particle. *The Journal of Chemical Physics*, 32(6):1626–1631, 1960.
- [22] R Pecora. Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *Journal of nanoparticle research*, 2(2):123–131, 2000.
- [23] Jan KG Dhont. *An introduction to dynamics of colloids*. Elsevier, 1996.
- [24] Katherine N Clayton, Janelle W Salameh, Steven T Wereley, and Tamara L Kinzer-

- Ursem. Physical characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry. *Biomicrofluidics*, 10(5):054107, 2016.
- [25] Dennis E Koppel. Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy: the method of cumulants. *The Journal of Chemical Physics*, 57(11):4814–4820, 1972.
- [26] Nicole Ostrowsky, D Sornette, Pat Parker, and ER Pike. Exponential sampling method for light scattering polydispersity analysis. *Optica Acta: International Journal of Optics*, 28(8):1059–1070, 1981.
- [27] J Lyklema et al. Fundamentals of interface and colloid science. *Kolloidnyi Zhurnal*, 56(2):303–398, 1994.
- [28] DC Henry. Electrokinetic flow in ultrafine capillary slits. *Proc. R. Soc. London Ser*, 133(821):106–129, 1931.
- [29] Robert J Hunter. *Foundations of colloid science*. Oxford university press, 2001.
- [30] Jean-Pierre E Grolier and José Manuel del Río. Isothermal titration calorimetry: A thermodynamic interpretation of measurements. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 55:193–202, 2012.
- [31] JRH Tame, R O’Brien, and JE Ladbury. Isothermal titration calorimetry of biomolecules. John Wiley & Sons Ltd., 1998.
- [32] Allan Matte, Guennadi Kozlov, Jean-François Trempe, Mark A. Currie, David Burk, Zongchao Jia, Kalle Gehring, Irena Ekiel, Albert M. Berghuis, and Mirosław Cygler. Preparation and characterization of bacterial protein complexes for structural analysis. In Andrzej Joachimiak, editor, *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, volume 76 of *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, pages 1 – 42. Academic Press, 2009.
- [33] Stephanie Leavitt and Ernesto Freire. Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Current opinion in structural biology*, 11(5):560–566, 2001.
- [34] Marta Airoldi, Giampaolo Barone, Giuseppe Gennaro, Anna Maria Giuliani, and Mauro Giustini. Interaction of doxorubicin with polynucleotides. a spectroscopic study. *Biochemistry*, 53(13):2197–2207, 2014. PMID: 24641674.

Parte II

Resultados y discusión

Capítulo 3

Polaridad local en multicapas de polielectrolitos determinada por fluorescencia de Doxorrubicina

3.1. Introducción

La técnica capa por capa (layer-by-layer LbL) es una herramienta muy conocida para la funcionalización no covalente de superficies y la fabricación de films delgados [1, 2]. De acuerdo a lo mencionado en el Capítulo 1, LbL se basa en el ensamblado alterado de polielectrolitos de carga opuesta a través de interacciones electrostáticas [3–5] facilitadas por la ganancia de entropía debida a la liberación de contraiones durante el proceso de ensamble [6, 7]. Las multicapas de polielectrolitos (PEMs) fabricadas por la técnica de LbL presentan una composición controlada en la escala nanométrica en la dirección vertical [8, 9]. Las propiedades de las multicapas pueden seleccionarse variando el número de capas de polielectrolitos y a través de la elección de policationes-polianiones, los cuales pueden ser a su vez complementados por otras moléculas o nanomateriales, incorporándose en la capa deseada de polielectrolito [10–14]. Las PEMs tienen muchas aplicaciones: como transporte de fármacos [15–20], como capas protectoras tanto como para fabricación de sensores [21–23], como membranas para nanofiltración [24–27] y ósmosis inversa [28] por mencionar solo algunas. Las propiedades fisicoquímicas de los films y los mecanismos de autoensamblado de las PEMs han sido sujeto de múltiples estudios [29, 30]. Se ha caracterizado ampliamente la cinética de ensamblado [31–34], el contenido de agua de las multicapas [35], las propiedades mecánicas [36] y eléctricas [37] como la difusión molecular en las capas [38]. Sin embargo, un aspecto de las PEMs ha sido estudiado en menor medida y es la polaridad [39]. La polaridad juega un rol importante en aplicaciones de las PEMs, como en las nanomedicinas, ya que la polaridad interior de los films determinará que tipo de moléculas puede ser retenidas en cada capa y cómo difunden a través de ellas. En el marco de esta tesis, las moléculas de interés

son los fármacos para liberación controlada. El concepto de polaridad es complicado de describir; da información de si un medio molecular presenta características de un medio orgánico o acuoso [40]. Es más, la polaridad engloba todas las interacciones que definen la afinidad de un entidad molecular con el medio [41, 42] como la electrostática, dipolar, multipolar, interacciones de fuerzas dispersivas, transferencia electrónica de carga, puente de hidrógeno, transferencia de protones, entre otras. La polaridad en volumen es usualmente asociada a la constante dieléctrica del medio. En la técnica LbL, los polielectrolitos se ensamblan desde un medio polar, una solución acuosa con fuerza iónica definida, usualmente entre 100 y 500 mM NaCl [43–45]. Cuando se produce el ensamblado sobre una superficie, los polielectrolitos retienen algo de agua asociada a los grupos cargados del polímero y las cadenas de la capa superior de las PEMs permanecen expuestas al volumen de solución acuosa [46]. Sin embargo, al momento de depositar una nueva capa de polielectrolito, la capa inferior enfrenta un medio diferente. Las cargas de esta capa son compensadas por lo menos parcialmente por la nueva capa ensamblada [47, 48]. A medida que el número de capas de la PEM aumenta, las capas interiores se empaquetan más densamente y la mayoría de sus cargas son compensadas por las capas superiores [49]. Se ha observado que los films se vuelven más densos a medida que el número de capas aumenta y los defectos en las capas se van rellenando. La polaridad debe cambiar durante la construcción del film y una capa particular enfrentará un cambio en la polaridad a medida que se depositan sucesivamente capas por encima debido a la compensación de cargas, a un arreglo más denso de las cadenas poliméricas y a los pocos defectos estructurales en la multicapa que atrapan agua del volumen.

En un trabajo excelente, Tedeschi et al. estudiaron la micropolaridad de multicapas de polielectrolitos a través de la fluorescencia del pireno [39]. El espectro de emisión $\pi * \pi$ del pireno monomérico presenta cinco bandas perfectamente distinguibles entre 370 y 400 nm. Debido al acoplamiento de los estados electrónicos y vibracionales, la primera banda experimenta un aumento significativo en su intensidad en comparación con la tercera banda cuando se aumenta la polaridad del solvente [50, 51]. Esta característica espectroscópica del pireno ha sido utilizada extensamente para estudios de polaridad. Tedeschi et al. estudiaron la polaridad de films de hidrocloreuro de polialilamina (PAH)/sulfonato sódico de poliestireno (PSS) y de cloruro de polidialildimetilamonio (PDACMAC)/PSS. Los autores obtuvieron un valor promedio de la polaridad a medida que mojaban los films en solución de pireno. El pireno es una molécula neutra, tiene baja solubilidad en agua y a pesar de que penetra en las multicapas lo hace en muy bajas concentraciones. Por estas razones los autores analizaron los films con muchas capas de polielectrolito para asegurar una concentración de pireno en el film lo suficientemente grande como para obtener una señal de fluorescencia detectable. A su vez el pireno difunde en las multicapas de forma no específica. En consecuencia, no es posible utilizar pireno para estudiar la polaridad de una capa determinada de los films. La polaridad podría cambiar en capas interiores de las PEMs respecto de las capas exteriores, provocando por ejemplo, en aplicaciones biomédicas diferencias en los tiempos de liberación y cantidad liberada de fármacos contenidos entre las multicapas (ya sea por difusión o por desensamblado progresivo de las capas). Además es interesante desde

un punto de vista fundamental, para entender como cambia la polaridad dentro del film durante el ensamblado de las capas, estudiando como la organización y el contenido de agua de las capas internas puede cambiar con el agregado de capas adicionales en la parte superior.

Para realizar este estudio, se ha utilizado hidrocloreuro de doxorubicina (DX) en lugar de pireno para estudiar la polaridad. DX es un antibiótico utilizado en terapias para el cáncer, perteneciente a la familia de las antraciclinas¹, cuyas propiedades espectroscópicas, en particular la fluorescencia, se ven afectadas por la polaridad del solvente [52]. La Figura 3.1 muestra los espectros de emisión típicos de la DX en solventes de diferente polaridad: agua, pentanol y hexano. Como se observa, la relación de intensidades entre las bandas de fluorescencia de DX 560 nm (I_1) y 590 nm (I_2) ha mostrado ser altamente influenciado por la constante dieléctrica del solvente [53]. La doxorubicina en agua tiene un cociente I_1/I_2 de 0.8, el cual aumenta en ambientes menos polares que el agua. Como la DX tiene carga positiva en solución, puede ser ensamblada electrostáticamente entre capas de polielectrolitos o formarse complejos con polielectrolitos cargados negativamente [54]. Por lo tanto, sería posible ubicar selectivamente DX en una determinada posición de la multicapa, sólo ensamblándola sobre el polianión de la capa elegida o formar un complejo con el polianión y luego ensamblar la capa. Ubicando con precisión la DX en una determinada posición de las PEMs, permitirá demostrar que es posible medir la polaridad localmente.

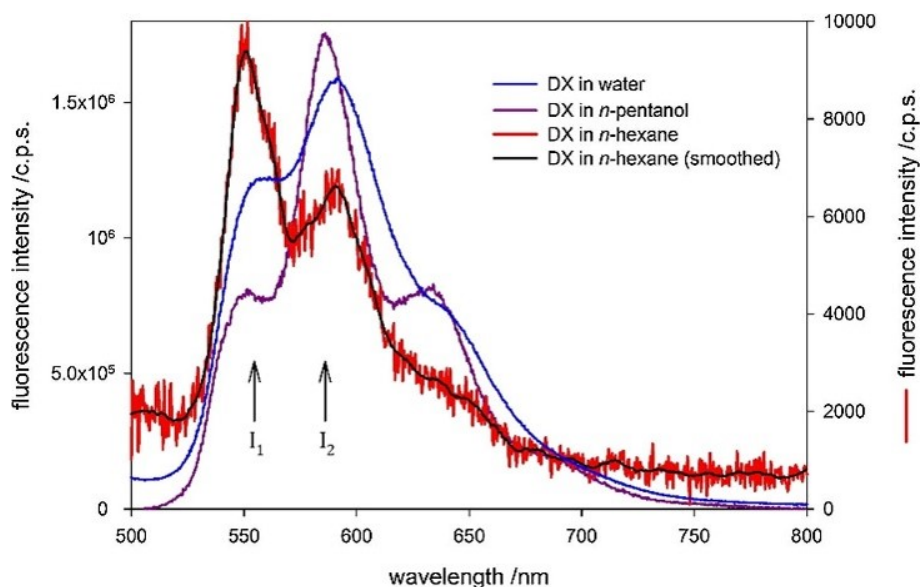


Figura 3.1: Variación del espectro de fluorescencia de la DX con el solvente.

En el marco de esta tesis y con el fin de lograr un entendimiento mayor de

¹Las antraciclinas son antibióticos citotóxicos utilizados en el tratamiento de diferentes cánceres. Se unen al ADN e interfieren en la síntesis de ácidos nucleicos

las propiedades de dispositivos PEMs para aplicaciones biomédicas, se mostrarán los resultados obtenidos para la micro polaridad en films de PAH/PSS y PAH/ácido poliacrílico (PAA) en la cuarta y octava capa de los films. Para ello, se armaron soluciones de complejos polielectrolito-fármaco: DX/PSS y DX/PAA que se ensamblaron en las PEMs correspondientes y en las dos posiciones mencionadas. Se realizaron estudios de fluorescencia estacionaria y tiempo de vida de fluorescencia para estudiar la evolución de la polaridad en los films con el agregado de capas sucesivas.

3.2. Materiales y metodología

3.2.1. Materiales

Hidrocloruro de polialilamina (PAH, Mw 15 kDa), sal de sulfonato de poliestireno sódico (PSS, Mw 70 kDa), ácido poliacrílico (PAA, Mw 15 kDa), hidrocloruro de doxorubicina (DX, Mw 579.98 g/mol) y el cloruro de sodio fueron adquiridos de Sigma Aldrich. La fórmula química de la DX y los polielectrolitos se muestran en la Figura 3.2

3.2.2. Preparación de las PEMs

Se limpiaron portamuestras de vidrio en una cámara UV por 20 minutos. Luego se sumergieron en etanol y luego agua por 3 minutos. Los últimos lavados se realizaron en una solución 0.5 M NaCl por 3 minutos. Las soluciones de PAH, PAA y PSS se prepararon a una concentración de 1 mg/ml en una solución salina 0.5 M NaCl. Todas las soluciones se dejaron equilibrar a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego filtradas a través de una membrana con tamaño de poro de 0.22 mm. Se preparó una solución acuosa de 10^{-3} M de DX. Los complejos DX/polielectrolito aniónico se prepararon a una relación molar de 2, con la molaridad de los polianiones correspondiente a la concentración de monómeros. Los soportes de vidrio se sumergieron en las soluciones de polielectrolito, comenzando con el PAH, dejando equilibrar por 15 minutos y luego se limpiaron con agua tres veces previo al ensamblado de la siguiente capa de polielectrolito.

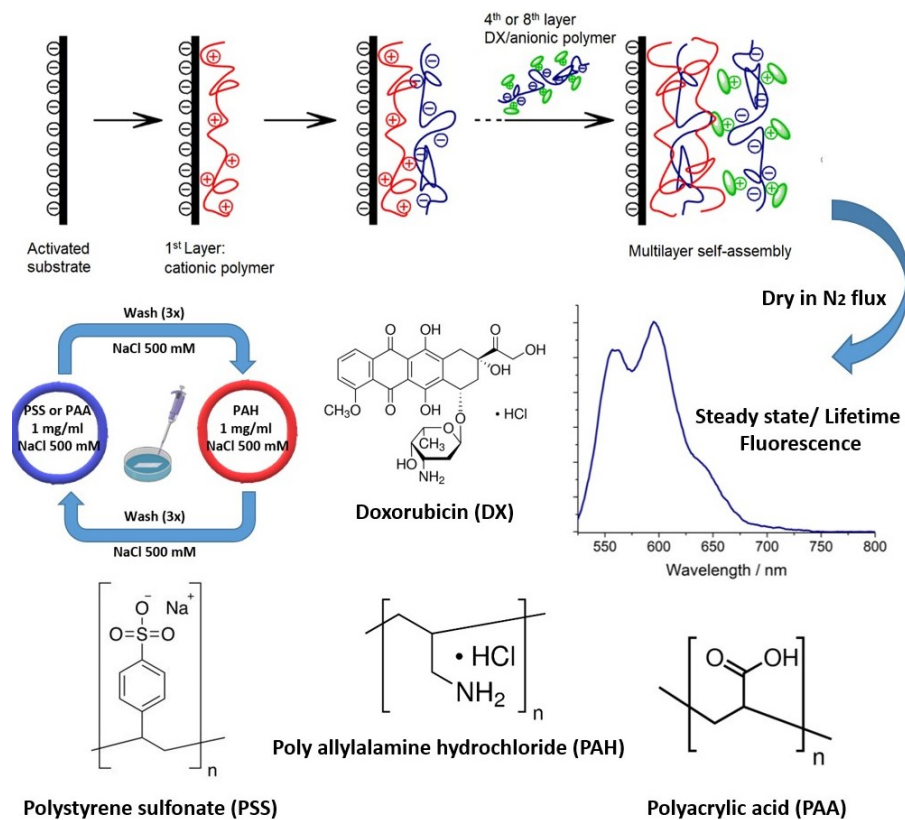


Figura 3.2: Esquema del proceso experimental de ensamblado de PEMs y de medición. También se muestran las estructuras de los compuestos utilizados

3.2.3. Mediciones de fluorescencia

Como se especificó en el Capítulo 2, las medidas de fluorescencia estacionaria se realizaron en un espectrofluorómetro Fluorolog®-3 (Horiba-Jobin Yvon) usando un soporte para muestras sólidas con un ángulo incidente de 50°. La longitud de onda de excitación se fijó en 500 nm con una apertura de 10 nm. El espectro de emisión correspondiente fue adquirido desde 500 a 800 nm con una velocidad de barrido de 1200 nm.min⁻¹ y una apertura de 10 nm. Las muestras se secaron antes de las medidas utilizando una corriente de nitrógeno por 5 minutos y luego colocándolas bajo presión reducida por una hora. Posteriormente las muestras se montaron en el soporte vertical y se colocaron en el equipo como se observa en la Figura 3.3.

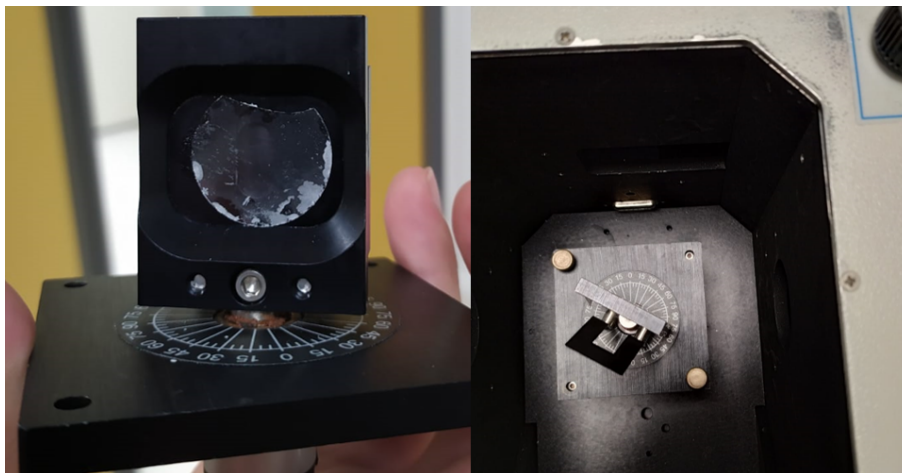


Figura 3.3: Soporte para muestras sólidas con una muestra montada en él y posteriormente colocado en el espectrofluorómetro

Las medidas de tiempo de vida se realizaron con la técnica de conteo de fotones individuales correlacionados en el tiempo (TCSPC) con el equipo descrito previamente en el Capítulo 2.

3.3. Resultados

Los complejos de polianiones, PSS o PAA, con DX se realizaron a una relación molar de DX con polianión (monómeros) de 2:1 y se ensamblaron en las PEMs en las posiciones cuatro y ocho del film para sensar la polaridad en dos posiciones distintas. La cuarta capa se encuentra cercana a la superficie del soporte de vidrio, y al momento del ensamblado la multicapa se encuentra en un estado inicial caracterizado por capas de polielectrolitos menos definidas. Para la octava se espera que el film haya alcanzado un crecimiento regular y una densificación de las capas [49].

La fluorescencia estacionaria se midió luego del ensamblado de la capa DX/polianión y luego de cada capa depositada por encima. Los films siempre se midieron secos. En la Figura 3.4 se muestra un esquema de las PEMs junto con el espectro de fluorescencia de la multicapa de PAH/PSS con la cuarta capa de DX/PSS en tres situaciones: sin capas por encima, con tres capas por encima y con 6 capas por encima. Se puede observar que el espectro de fluorescencia cambia a medida que se aumenta el número de capas adicionales. A pesar de que la intensidad de la emisión de la banda de 590 nm de la DX no cambia, la intensidad de la banda de 560 nm aumenta progresivamente. Se obtuvo el cociente entre la intensidad de los picos, $I_1/I_2 = 0.8$ para la capa DX/PSS en contacto con el aire, coincidiendo con el valor que se obtiene para la DX libre en agua. Este resultado implica que el complejo DX/PSS enfrenta un entorno con una polaridad análoga a la del agua, lo que se explica por el hecho de que los complejos no tienen

capas por encima para compensar las cargas negativas propias y retienen moléculas de agua, incluso luego del secado del film (además de cierta condensación de humedad del aire sobre la capa superior). El agregado de tres capas de polielectrolito por encima resulta en un aumento significativo del cociente I_1/I_2 a un valor de 1.12 (Figura 3.4 b). Este valor coincide con el obtenido para la DX en un entorno no polar. Finalmente, el ensamblado de tres capas más (total de 6 capas por encima) resulta en un valor aún mayor, de 1.2, que significa que el entorno sensed por la DX ubicada en la cuarta capa es aún más apolar. El valor de $I_1/I_2 = 1.2$ se corresponde para la DX libre disuelta en n-heptano, lo que indica que las regiones interiores de la multicapa se convierten en apolares a medida que la PEM crece.

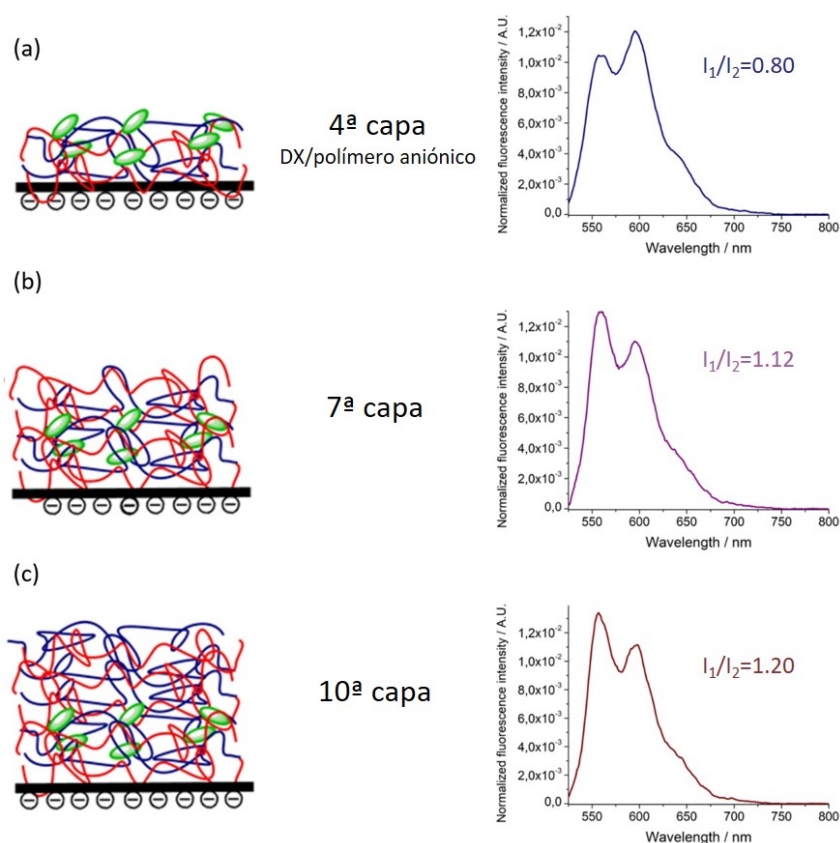


Figura 3.4: Espectros de fluorescencia estacionaria correspondientes a la DX/PSS ubicada en la cuarta capa (a) como capa superior, (b) con 3 capas por encima, (c) con 6 capas por encima

Los espectros de fluorescencia (normalizados por el área) de las PEMs con DX/PSS ubicados en la cuarta y octava capa, se muestran en la Figura 3.5 junto con un gráfico de la evolución del cociente I_1/I_2 para los dos casos. Para ambos sistemas, se

observó el mismo I_1/I_2 de 0.8 cuando la capa del complejo era la superior. Esto significa que en ambos casos la DX en la PEM enfrenta un entorno con polaridad similar al del agua. El agregado de PAH sobre la capa DX/PSS tiene el mismo efecto para ambos sistemas, el cociente aumenta a 1. Esta variación es la mayor observada luego de la deposición de una única capa por encima. A medida que se aumenta el número de capas depositadas, se observa un incremento continuo pero menos escalonado de I_1/I_2 . Luego de ensamblar cuatro capas de polielectrolito por encima, el cociente de intensidades no cambia perceptiblemente. Esto es indicativo de que la deposición de capas adicionales no parece jugar ningún rol en la polaridad, ya que tanto el contenido de agua como el arreglo de polímeros alrededor de la capa que lleva la DX no se ve afectado [47, 55]. El valor final medido de I_1/I_2 , luego de agregar 6 capas de polielectrolito, es mayor para la DX ubicada en la cuarta capa que para la ubicada en la octava, 1.20 ± 0.01 vs 1.04 ± 0.05 .

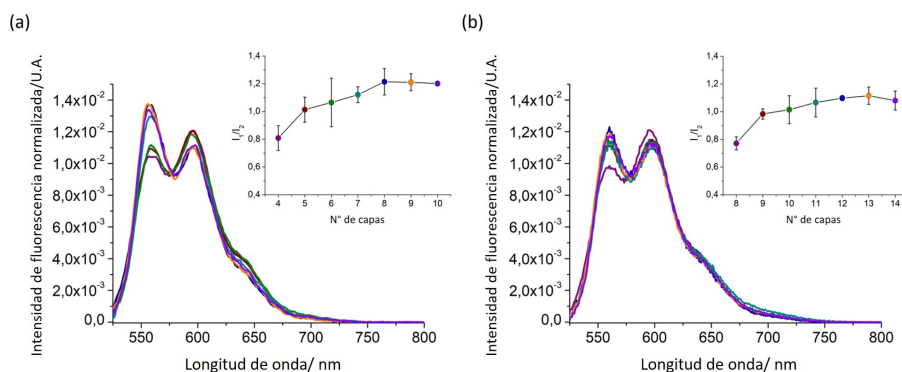


Figura 3.5: Espectros de fluorescencia normalizados para el sistema PAH/PSS con la capa de DX/PSS ubicada en (a) cuarto lugar y (b) octavo lugar. Inset: evolución del ratio I_1/I_2 con el número de capas

Esta diferencia en los dos valores se puede deber a un entorno más densamente empaquetado o que los polielectrolitos se encuentran más interconectados en la cuarta capa que en la octava, lo cual es de esperarse ya que las primeras capas son menos homogéneas, menos estratificadas y no cubren el total de la superficie. Se ha demostrado que los sistemas PAH/PSS tienen un crecimiento lineal, donde la cantidad de polímero depositado por capa es prácticamente constante. Sin embargo, estudios con microbalanza de cuarzo con disipación (QCM-D) demostraron que el crecimiento lineal comienza a partir de la cuarta capa ensamblada [35]. En la Figura 3.6 se observa el cambio en frecuencia tras el ensamblado sucesivo de polielectrolitos en función del tiempo en la fabricación simultánea de dos multicapas (curvas negra y roja de tendencia descendente). El cambio en frecuencia indica deposición de masa en la microbalanza de cuarzo como se explicó en el apartado correspondiente en el Capítulo 2. Las líneas punteadas indican el momento donde se hizo circular la solución de poli-ión sobre la multicapa para depositarlo, y en todos los casos se puede observar que posterior al agregado del poli-ión se produce un

descenso en la frecuencia, indicando la deposición de masa sobre el ensamblado. En las tres primeras capas se nota un aumento progresivo en masa depositada, reflejado en un salto en frecuencia cada vez mayor. A partir de la cuarta capa se llega a un régimen en el que el crecimiento evidenciado por el cambio de frecuencia es el mismo bicapa tras bicapa (par de capas PAH/PSS). Esto marca una diferencia estructural: la cuarta capa es menos homogénea y por lo tanto se encuentra menos estratificada respecto a la arquitectura observada en una octava capa. Por lo tanto, los complejos de DX/PSS depositados en la cuarta posición ocuparán los espacios libres dejados por las capas inferiores, lo que resulta en una diferencia del entorno respecto al de la octava capa, donde el crecimiento de la multicapa es más regular y se puede esperar un ensamblado de la DX/PSS más estratificado. Lo más notable de estos resultados, es el incremento del cociente I_1/I_2 desde 0.8 a 1 luego del agregado de una única capa de PAH, ensamblada por encima de la capa de DX/PSS. Un valor de 1 significa que el entorno que sensa la DX se vuelve bastante más apolar. En un trabajo previo [35] se ha estudiado la evolución del contenido de agua en capas de PAH/PSS combinando QCMD con elipsometría. Mientras que la masa húmeda de la PEM era medida por QCMD, por elipsometría se obtenía la masa seca. Combinando estos dos valores, se podía determinar la hidratación de las PEM por capa. Luego de la cuarta capa ensamblada, se obtuvo que la hidratación permanecía constante, independientemente del número de capas sucesivas que se depositaran por encima. Esto podría significar que cuando una capa es depositada por encima, la cual lleva su propia agua de hidratación, produce una remoción de agua en la PEM, proveniente de la capa que está inmediatamente por debajo. El cambio en la polaridad medido por los complejos DX/PSS se correlaciona bastante bien con los datos obtenidos por QCMD y elipsometría y por lo tanto, se puede asociar el cambio en el valor I_1/I_2 a la remoción de agua del PSS de la capa superior cuando se ensambla el PAH por encima.

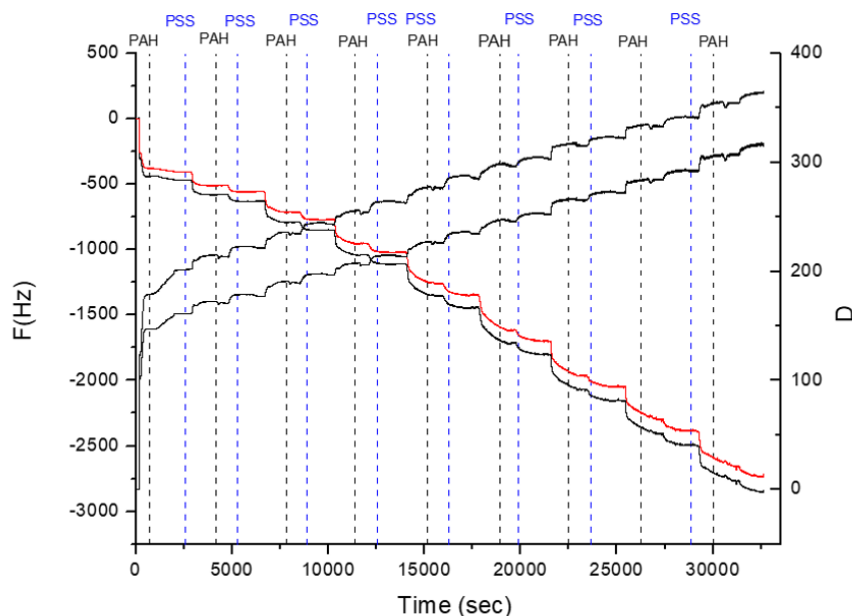


Figura 3.6: Ensamblado de multicapas de PAH/PSS seguido por QCM-D. Se observa el cambio en frecuencia y disipación tras la deposición de 17 capas de polielectrolito. La PEM muestra un crecimiento regular desde la cuarta capa y se puede observar una frecuencia y disipación prácticamente constante luego de cada capa depositada.

El hecho que el agregado de una capa de PAH es suficiente para crear un entorno apolar para la DX en la capa superior de PSS indica que el agua asociada con el PSS disminuye significativamente alrededor de los grupos sulfatos. Tedeschi et al.[39] han reportado que la polaridad para los films de PAH/PSS con pireno puede ser ubicada entre metanol y acetonitrilo (un ambiente moderadamente polar), pero no se ha tenido en cuenta que los autores prepararon una PEM y la colocaron en contacto con una solución metanólica de pireno. Esto significa que las moléculas de pireno estaban tanto en la interface de la PEM como en su interior y el espectro de emisión promedió todos los entornos que rodeaban al pireno. En este trabajo, la DX está ubicada estrictamente en la capa donde el complejo DX/PSS se ha depositado, sensando únicamente el entorno alrededor de esa única capa. En el mencionado trabajo, también ensamblaron una capa de ácido poliacrílico marcada covalentemente con 1-pirenometilamina (PAA-MePY) sobre un film de PAH/PSS para sensar localmente la polaridad, obteniendo valores cercanos a los que evidencia la sonda en agua. Este resultado es debido probablemente al hecho de que el PAA es un polímero altamente hidratado y el pireno sensa la polaridad del PAA y no la del film de PAH/PSS.

Para evaluar la utilidad del método y lograr un mayor conocimiento del fenó-

meno de la polaridad, en este trabajo de tesis se han fabricado PEMs estructuralmente distintas con PAA como polianión en lugar de PSS, pero manteniendo el PAH como polication e incluyendo DX con el mismo método que para los films de PAH/PSS. Se formaron complejos de DX con PAA y se ensamblaron en la cuarta u octava capa de los films. Se agregaron capas de PAH/PAA por encima y luego de cada deposición, se midió la fluorescencia de la DX.

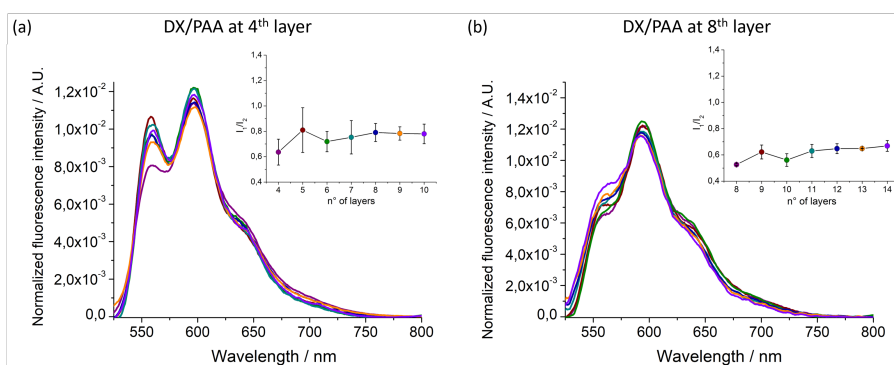


Figura 3.7: Espectros de fluorescencia normalizados para el sistema PAH/PAA con la capa de DX/PAA ubicada en (a) cuarto lugar y (b) octavo lugar. Inset: evolución del ratio I_1/I_2 con el número de capas

A diferencia de los experimentos con PAH/PSS, se encontró un valor I_1/I_2 de 0.6 para el complejo DX/PAA ubicado en la cuarta capa, sin capas adicionales por encima. Dicho valor indica que la DX se encuentra en un entorno más polar que el agua. El PAA es un polímero altamente hidratado y a pH 6.5, que se utilizó para el ensamblado, es razonable asumir que los grupos carboxilato se encuentran mayormente desprotonados [56, 57]. Se observa un incremento en el cociente I_1/I_2 a medida que se ensamblan capas adicionales de PAH/PAA por encima de la capa de DX/PAA (Fig 3.7). Al alcanzar el valor de 0.8, el cociente permanece constante hasta las seis capas por encima. Para el sistema PAH/PAA, los experimentos de QMCD han demostrado un crecimiento más lento de la multicapa en comparación con la de PAH/PSS, como se observa en la Figura 3.8. Esto es debido a que el ensamblado de PAA en multicapas es muy dependiente del pH, y a pH 6.5, se puede esperar que las moléculas de PAA se encuentren desprotonadas, altamente hidratadas y menos propensas al ensamblaje, ya que en volumen estarían más hidratadas que en la PEM [58]. En total, se observa un incremento de frecuencia de 700 Hz para el sistema PAH/PAA mientras que para el PAH/PSS, para el mismo número de capas, hay un incremento de 2000 Hz. Los grupos carboxilatos del PAA se encuentran altamente hidratados y se puede esperar que retengan más agua y que absorban más moléculas de agua del aire que el PSS. Esto parece razonable ya que de esta forma, el PAA proveería un entorno polar para la DX, sumada a la contribución a la polaridad proveniente de los grupos carboxilatos a los cuales la DX está unida. Los grupos carboxilatos, comparados con los sulfonatos, presentan una carga más localizada que también podrían afectar la polaridad medida

por la DX. Para el sistema con los complejos DX/PAA ubicados en la octava capa, el cociente I_1/I_2 permanece prácticamente sin cambios y cerca a 0.6, confirmando un entorno que rodea a la DX más polar que el agua. La principal diferencia en la polaridad de los films de PAH/PSS y PAH/PAA parece provenir de la alta capacidad de los grupos carboxilatos de retener el agua [59, 60], la cual no es alterada por la interacción con el PAH.

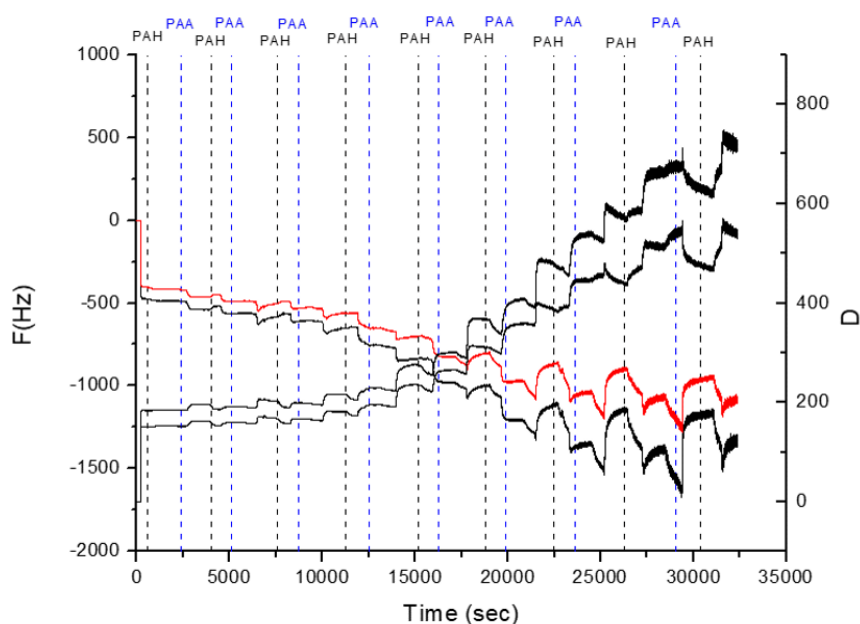


Figura 3.8: Ensamblado de multicapas PAH/PAA seguido por QCM-D. Se observa el cambio de frecuencia y la disipación tras la deposición de 17 capas. Las capas de PAH/PAA muestran un crecimiento menos regular que las de PAH/PSS evidenciado por los cambios en frecuencia y disipación. La frecuencia decrece alrededor de 700 Hz en la última capa depositada mientras que para el sistema PAH/PSS corresponde a 2000 Hz la misma capa. La disipación es mayor debido probablemente a la hidratación de las capas de PAA.

Sin embargo, de las mediciones de fluorescencia estacionaria no es posible discernir si la DX enfrenta más de un entorno, obteniéndose solamente una respuesta espectral promedio. Para tener un mayor conocimiento del entorno sentido por la DX en las diferentes PEMs, se realizaron medidas de tiempo de vida de fluorescencia. El tiempo de vida de la DX es extremadamente sensible a la polaridad del ambiente. En agua, la fluorescencia de la DX decae con un típico tiempo de vida de 1.0 ns [61]; en entornos apolares los tiempos de vida pueden ser tan largos como 4.3 ns [62] o tan cortos como 170 ps para agregados cilíndricos densamente empaquetados formados por DX a

alta concentración de sal y fármaco [63]. Un decaimiento multiexponencial implica la exposición del material fluorescente a más de un entorno con diferente polaridad. El ajuste de los decaimientos hace posible la obtención tanto de los tiempos de vida como la contribución de cada componente de los mismos. Las curvas de decaimiento medidas para todas las PEMs con DX se describen en cualquier instancia con dos componentes exponenciales. Debido a la poca cantidad de DX incorporada en las PEMs la relación señal-ruido de los decaimientos no es muy alta, impidiendo realizar una descripción precisa de los procesos de relajación de la fluorescencia de la DX en las PEMs. El ajuste de los datos se realizó en dos pasos. En el primero, se ajustaron los datos con la suma de dos exponenciales. Para aumentar la relevancia estadística del análisis, las PEMs se ubicaron a diferentes alturas en el soporte de la celda para medir distintas porciones de la superficie de la multicapa (el láser incidente cubre una pequeña área de 1 mm²) y se realizaron 3 mediciones de cada muestra. La presencia de una componente rápida, con un tiempo de vida menor a 1.0 ns sugiere que una fracción de la DX se encuentra en contacto con los grupos cargados (carboxilatos o sulfonatos según el polianión) y el aumento global en el tiempo de vida promedio apunta a un cambio en el entorno de la DX a medida que se depositan capas por encima de las capas de DX/PAA o DX/PSS. Estos datos se observan en la Figura 3.9 para la DX en la cuarta y octava capa junto con una curva representativa de decaimiento del tiempo de vida de fluorescencia. Los cambios observados sugieren que la DX se encuentra en un ambiente menos polar a medida que se depositan capas por encima. En el caso del sistema PAH/PSS, los resultados obtenidos para los complejos en la cuarta y octava capa han sido comparables.

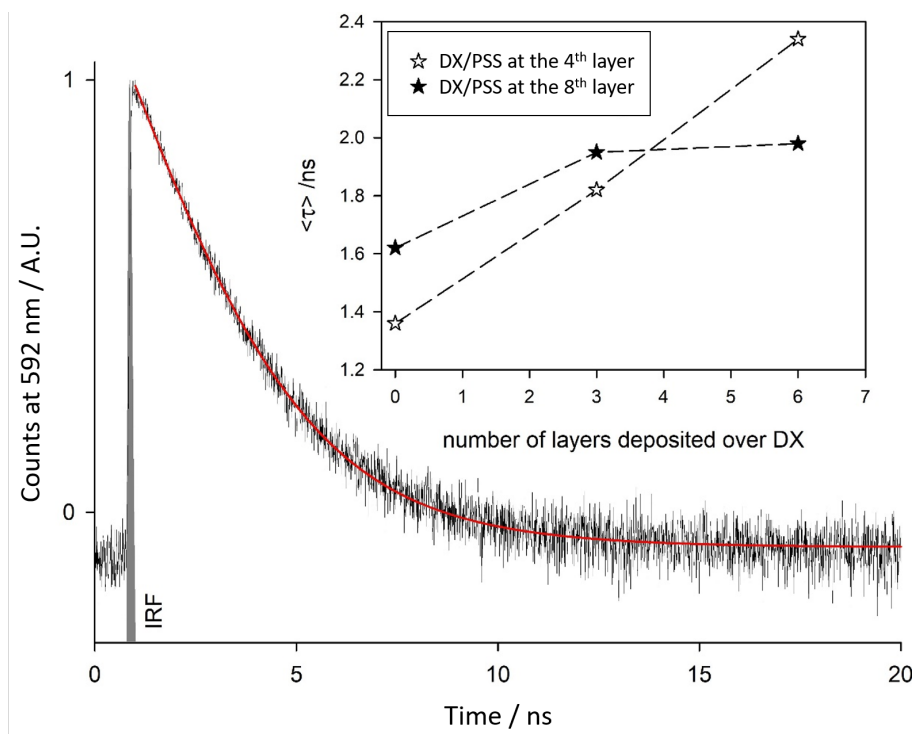


Figura 3.9: Decaimiento del tiempo de vida de fluorescencia correspondiente a DX/PSS en la cuarta capa y con seis capas de polielectrolito por encima. (inset) Intensidad promediada del tiempo de vida como función de las capas de polímero depositadas por encima de la de DX/PSS para PEMs de PAH/PSS.

De la Figura 3.9 se pueden sacar algunas conclusiones. Se puede observar que el tiempo de vida promedio se incrementa con el número de capas. Cuando la DX/PSS se encuentra formando la cuarta capa, el tiempo de vida promedio es menor que cuando se encuentra como capa superior en la octava posición. Luego del agregado de 6 capas de polielectrolito por encima de la DX/PSS, la situación se invierte con el tiempo de vida siendo más largo para el sistema complejo ubicado en la cuarta capa. La razón para este comportamiento puede deberse a que, como previamente se expuso, la multicapa no está homogéneamente ensamblada con cuatro capas únicamente.

Con esto, los resultados de las medidas de tiempo de vida de la DX se encuentran en la misma línea que los obtenidos para la fluorescencia estacionaria, ambos dando cuenta de un ambiente polar para la capa superior de las PEMs de PAH/PSS y mucho más apolar para las regiones internas.

El tiempo de vida de la DX también se midió para los films de PAH/PAA, sin embargo debido a la poca cantidad de DX depositada, sólo se pudo obtener un buen ajuste para el sistema con seis capas por encima de la capa de DX/PAA. En ambos casos, para los sistemas con los complejos en la cuarta y la octava, se obtuvo que el

tiempo de vida promedio era menor a 1 ns, indicando que los complejos de DX/PAA se encontraban en un ambiente más polar, coincidiendo nuevamente con lo obtenido por fluorescencia estacionaria.

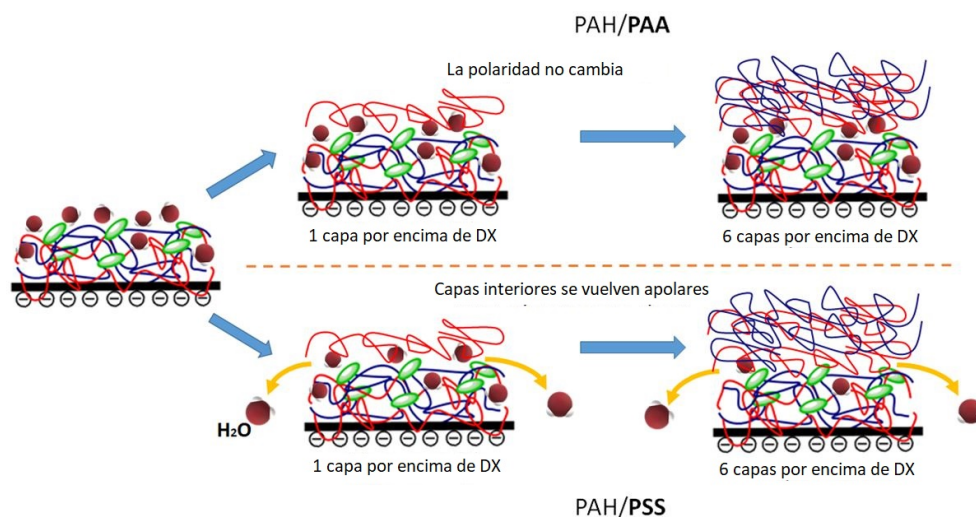


Figura 3.10: Esquema de los resultados experimentales PEMs con DX (óvalos verdes) y diferentes números de capas por encima retienen distintas cantidades de agua (moléculas rojas y blancas)

Los resultados muestran claramente que la polaridad en las regiones interiores de las PEMs varían con la naturaleza del polianión elegido. La capas superiores de las PEMs se encuentran en entornos polares debido a las cargas no compensadas y al agua asociada a estas cargas. Eligiendo el PAA como polianión, un polímero capaz de retener grandes cantidades de agua, el entorno polar se mantiene en la capa que contiene los complejos DX/PAA aún luego del ensamblado de seis capas por encima. En el caso de los films de PAH/PSS, se observa en cambio que la deposición de capas por encima resulta en el decrecimiento de la polaridad asociada a la capa de DX/PSS. De hecho, al momento en que la capa de DX/PSS se encuentra como capa superior, el cociente I_1/I_2 corresponde a la DX en agua, para que luego de agregadas seis capas por encima el entorno medido corresponda a una solución n-heptano. El ensamblado de capas de polielectrolito por encima de DX/polianión disminuirá el agua asociada con los grupos aniónicos de PSS, creando un entorno menos polar a través de la compensación de cargas y la densificación de las capas. La compensación de cargas también tiene lugar para el ensamblado de PAA y PAH, pero los grupos carboxilatos del PAA tienen la capacidad de retener el agua de hidratación a medida que se agregan polielectrolitos por encima, resultando en una compensación de naturaleza extrínseca según lo expuesto en el Capítulo 1. El esquema en la Figura 3.10 resume los resultados obtenidos y nuestras hipótesis. El polication elegido debe tener un impacto en el agua retenida en las capas y en la hidrofobicidad de la capa de DX/polianión tanto como que diferentes pares de polímeros pueden resultar en distintos grados de compensación de cargas, lo cual

afectaría la cantidad de agua retenida. Se esperaría que las aminas cuaternarias como las presentes en PDACMAC creen un entorno más hidrofóbico que las aminas primarias del PAH, las cuales interactúan con agua a través de puentes de hidrógeno. Se necesitan estudios variando la composición de las PEMs, tanto de polielectrolitos catiónicos como aniónicos para lograr un entendimiento completo de como la química y la interacción de los polielectrolitos afecta la polaridad

3.4. Conclusiones

A través de la medición de la polaridad de capas de polielectrolitos en diferentes posiciones de PEMs, se ha obtenido información acerca de los cambios de arquitectura en las multicapas durante el ensamblado de los polielectrolitos que las constituyen. Para PEMs formadas con PAH/PSS, la densificación de las capas y la compensación de carga hace que las regiones interiores de las multicapas sean más apolares, mientras que para las formadas con PAH/PAA, las capas de PAA altamente hidratadas crean un entorno muy polar que permanece prácticamente sin cambios con el número de capas. En el caso de PEMs de PAH/PSS se han observado diferencias apreciables en la polaridad de la interface de la multicapa con agua cuando la capa de DX/PSS es la superior respecto de cuando se encuentra en regiones interiores; siendo el entorno en el primer caso mucho menos apolar que en el segundo.

En ambos sistemas de PEMs estudiados, el PAH actuó como polication; sin embargo, cambiando el polianión, PSS o PAA, se obtiene una gran diferencia en la polaridad interna de la PEM. Esto se debe a la diferencia las propiedades intrínsecas entre ambos sistemas, entre ellas la organización del par de polielectrolitos, el empaquetado de las capas, el agua asociada a las cadenas y las interacciones electrostáticas. La combinación de todos estos factores resulta en que las capas interiores del PAH/PSS sean apolares mientras que las del PAH/PAA sean muy polares. En la literatura se encuentran pocos ejemplos de estudios de polaridad en PEMs. Este trabajo se diferencia de los estudios previos en que se ha podido detectar la polaridad en una única capa de polielectrolito y seguir la evolución de la misma con el ensamblado de las capas sucesivas. Como resultado global, se ha ganado conocimiento en la estructura interna y propiedades de las PEMs y como éstas propiedades cambian en el proceso de crecimiento.

Los próximos trabajos se enfocarán en el estudio de la polaridad de otras combinaciones de polielectrolitos en PEMs, como por ejemplo, el uso de otros policationes en vez de PAH, y polielectrolitos de origen biológico. Creemos que estos estudios serán de relevancia para mejorar los dispositivos de nanofiltración y ósmosis inversa basados en multicapas de polielectrolitos, así como en la comprensión de la dinámica de liberación de moléculas activas encapsuladas en PEMs en el contexto del diseño de terapias nanomédicas.

Bibliografía

- [1] R. K. Iler. Multilayers of colloidal particles. *Journal of Colloid And Interface Science*, 21(6):569–594, 1966.
- [2] Shuang Zhao, Frank Caruso, Lars Dahne, Gero Decher, Bruno G. De Geest, Jinchun Fan, Neus Feliu, Yury Gogotsi, Paula T. Hammond, Mark C. Hersam, Ali Khademhosseini, Nicholas Kotov, Stefano Leporatti, Yan Li, Fred Lisdat, Luis M. Liz-Marzan, Sergio Moya, Paul Mulvaney, Andrey L. Rogach, Sathi Roy, Dmitry G. Shchukin, Andre G. Skirtach, Molly M. Stevens, Gleb B. Sukhorukov, Paul S. Weiss, Zhao Yue, Dingcheng Zhu, and Wolfgang J. Parak. The Future of Layer-by-Layer Assembly: A Tribute to ACS Nano Associate Editor Helmuth Mohwald. *ACS Nano*, 13(6):6151–6169, 6 2019.
- [3] Gero Decher and Jong-Dal -D Hong. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process, 1 consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles on charged surfaces. *Makromolekulare Chemie. Macromolecular Symposia*, 46(1):321–327, 1991.
- [4] Yu Lvov, G. Decher, and G. Sukhorukov. Assembly of Thin Films by Means of Successive Deposition of Alternate Layers of DNA and Poly(allylamine). *Macromolecules*, 26(20):5396–5399, 1993.
- [5] Gero Decher. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science*, 277(5330):1232–1237, 1997.
- [6] Joseph B. Schlenoff, Amir H. Rmaile, and Claudiu B. Bucur. Hydration contributions to association in polyelectrolyte multilayers and complexes: Visualizing hydrophobicity. *Journal of the American Chemical Society*, 130(41):13589–13597, 10 2008.
- [7] N. A. Kotov. Layer-by-layer self-assembly: the contribution of hydrophobic interactions. Technical Report 5, 1999.
- [8] Juan Méndez Garza, Pierre Schaaf, Sylvaine Muller, Vincent Ball, Jean François Stoltz, Jean Claude Voegel, and Philippe Lavalle. Multicompartment films made of

- alternate polyelectrolyte multilayers of exponential and linear growth. *Langmuir*, 20(17):7298–7302, 8 2004.
- [9] Stephan T. Dubas and Joseph B. Schlenoff. Factors controlling the growth of polyelectrolyte multilayers. *Macromolecules*, 32(24):8153–8160, 11 1999.
- [10] N. A. Kotov, I. Dekany, and J. H. Fendler. Layer-by-layer self-assembly of polyelectrolyte-semiconductor nanoparticle composite films. *Journal of physical chemistry*, 99(35):13065–13069, 1995.
- [11] Marta Ruano, Ana Mateos-Maroto, Hernán Ritacco, and Francisco Ortega. Fabrication of Robust Capsules by Sequential Assembly of Polyelectrolytes onto Charged Liposomes Langmuir monolayers View project Interfacial dynamics View project. *ACS Publications*, 37(20):6189–6200, 5 2021.
- [12] João Borges, José A. Ribeiro, Elisa M. Pereira, Cátia A. Carreira, Carlos M. Pereira, and Fernando Silva. Preparation and characterization of DNA films using oleylamine modified Au surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 358(2):626–634, 2011.
- [13] Jayant Kumar, Jin-An He, Ravi Mosurkal, Lynne A Samuelson, and Lian Li. Dye-sensitized Solar Cell Fabricated by Electrostatic Layer-by-Layer Assembly of Amphoteric TiO₂ Nanoparticles Terahertz Waveguide View project Photoinduced Surface Relief View project Dye-sensitized Solar Cell Fabricated by Electrostatic Layer-by-Layer Assembly of Amphoteric TiO₂ Nanoparticles. *ACS Publications*, 19(6):2169–2174, 3 2003.
- [14] Yuri Lvov, Gero Decher, and Möhwald Mohwald. Assembly, Structural Characterization, and Thermal Behavior of Layer-by-Layer Deposited Ultrathin Films of Poly(vinyl sulfate) and Poly(allylamine). *Langmuir*, 9(2):481–486, 1993.
- [15] Omar S. Sakr and Gerrit Borchard. Encapsulation of enzymes in layer-by-layer (LbL) structures: Latest advances and applications, 7 2013.
- [16] Roman Heuberger, Gleb Sukhorukov, Janos Vörös, Marcus Textor, and Helmuth Möhwald. Biofunctional polyelectrolyte multilayers and microcapsules: Control of non-specific and bio-specific protein adsorption. *Advanced Functional Materials*, 15(3):357–366, 3 2005.
- [17] Edwin Donath, Gleb B Sukhorukov, Frank Caruso, Sean A Davis, and Helmuth Möhwald. Novel Hollow Polymer Shells by Colloid-Templated Assembly of Polyelectrolytes**. Technical Report 16, 1998.
- [18] Anna Szarpak, Di Cui, Fré Dé, Ric Dubreuil, Bruno G De Geest, Liesbeth J De Cock, Catherine Picart, and Rachel Auzé Ly-Velty. Designing Hyaluronic Acid-Based Layer-by-Layer Capsules as a Carrier for Intracellular Drug Delivery. *ACS Publications*, 11(3):713–720, 3 2010.
-

- [19] Uttam Manna and Satish Patil. Dual drug delivery microcapsules via layer-by-layer self-assembly. *Langmuir*, 25(18):10515–10522, 9 2009.
- [20] Yuki Itoh, Michiya Matsusaki, Toshiyuki Kida, and Mitsuru Akashi. Locally controlled release of basic fibroblast growth factor from multilayered capsules. *Biomacromolecules*, 9(8):2202–2206, 8 2008.
- [21] Jodie L. Lutkenhaus and Paula T. Hammond. Electrochemically enabled polyelectrolyte multilayer devices: From fuel cells to sensors. *Soft Matter*, 3(7):804–816, 6 2007.
- [22] Antonia Mallardi, Mauro Giustini, Francesco Lopez, Manuela Dezi, Giovanni Venturoli, and Gerardo Palazzo. Functionality of photosynthetic reaction centers in polyelectrolyte multilayers: Toward an herbicide biosensor. *Journal of Physical Chemistry B*, 111(12):3304–3314, 3 2007.
- [23] Mauro Giustini, Mattia Autullo, Mauro Mennuni, Gerardo Palazzo, and Antonia Mallardi. Polymer-photosynthetic protein multilayer architectures for herbicide optical detection. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 163(1):69–75, 3 2012.
- [24] Regine V. Klitzing and Bernd Tiede. *Polyelectrolyte Membranes*, 2004.
- [25] Nithya Joseph, Pejman Ahmadiannamini, Richard Hoogenboom, and Ivo F.J. Vankelecom. Layer-by-layer preparation of polyelectrolyte multilayer membranes for separation. *Polymer Chemistry*, 5(6):1817–1831, 2014.
- [26] Matthew D. Miller and Merlin L. Bruening. Controlling the nanofiltration properties of multilayer polyelectrolyte membranes through variation of film composition. *Langmuir*, 20(26):11545–11551, 12 2004.
- [27] Oishi Sanyal and Ilsoon Lee. Recent progress in the applications of layer-by-layer assembly to the preparation of nanostructured ion-rejecting water purification membranes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14(3):2178–2189, 2014.
- [28] Wanqin Jin, Ali Toutianoush, and Bernd Tiede. Use of polyelectrolyte layer-by-layer assemblies as nanofiltration and reverse osmosis membranes, 4 2003.
- [29] C. Picart, J. Mutterer, L. Richert, Y. Luo, G. D. Prestwich, P. Schaaf, J. C. Voegel, and P. Lavalle. Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(20):12531–12535, 10 2002.
- [30] Frank Caruso, Edwin Donath, Helmuth Möhwald, and Radostina Georgieva. Fluorescence studies of the binding of anionic derivatives of pyrene and fluorescein to cationic polyelectrolytes in aqueous solution. *Macromolecules*, 31(21):7365–7377, 10 1998.

- [31] Claudine Porcel, Philippe Lavalle, Vincent Ball, Gero Decher, Bernard Senger, Jean Claude Voegel, and Pierre Schaaf. From Exponential to Linear Growth in Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir*, 22(9):4376–4383, 4 2006.
- [32] Eduardo Guzmán, Hernán Ritacco, Francisco Ortega, Tatiana Svitova, C. J. Radke, and Ramón G. Rubio. Adsorption kinetics and mechanical properties of Ultrathin polyelectrolyte multilayers: Liquid-supported versus solid-supported films. *Journal of Physical Chemistry B*, 113(20):7128–7137, 5 2009.
- [33] Eduardo Guzmán, Hernán Ritacco, José E.F. Rubio, Ramón G. Rubio, and Francisco Ortega. Salt-induced changes in the growth of polyelectrolyte layers of poly(diallyl-dimethylammonium chloride) and poly(4-styrene sulfonate of sodium). *Soft Matter*, 5(10):2130–2142, 5 2009.
- [34] Eduardo Guzmán, Hernán Ritacco, Francisco Ortega, and Ramón G. Rubio. Evidence of the influence of adsorption kinetics on the internal reorganization of polyelectrolyte multilayers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 384(1-3):274–281, 2011.
- [35] Jagoba J. Iturri Ramos, Stefan Stahl, Ralf P. Richter, and Sergio E. Moya. Water content and buildup of poly(diallyldimethylammonium chloride)/poly(sodium 4-styrenesulfonate) and poly(allylamine hydrochloride)/poly(sodium 4-styrenesulfonate) polyelectrolyte multilayers studied by an in situ combination of a quartz crystal microbalance with dissipation monitoring and spectroscopic ellipsometry. *Macromolecules*, 43(21):9063–9070, 11 2010.
- [36] Ozzy Mermut, Julie Lefebvre, Derek G Gray, and Christopher J Barrett. Structural and Mechanical Properties of Polyelectrolyte Multilayer Films Studied by AFM. *ACS Publications*, 2003.
- [37] Sérgio V.P. Barreira, Vladimir García-Morales, Carlos M. Pereira, José A. Manzanares, and Fernando Silva. Electrochemical impedance spectroscopy of polyelectrolyte multilayer modified electrodes. *Journal of Physical Chemistry B*, 108(46):17973–17982, 2004.
- [38] E. Donath, I. Vardanyan, S. Meyer, R. A. Murray, S. E. Moya, Z. Navoyan, and V. Arakelyan. A typical diffusion monitored by flow cytometry: Slow diffusion of small molecules in polyelectrolyte multilayers. *Nanoscale*, 10(2):765–772, 2018.
- [39] C. Tedeschi, H. Möhwald, and S. Kirstein. Polarity of layer-by-layer deposited polyelectrolyte films as determined by pyrene fluorescence. *Journal of the American Chemical Society*, 123(5):954–960, 2 2001.
- [40] Christian Reichardt. Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators. *Chemical Reviews*, 94(8):2319–2358, 1994.
- [41] Ryo Kimura, Hidetsugu Kitakado, Atsuhiko Osuka, and Shohei Saito. Flapping

- peryleneimide as a fluorescent viscosity probe: Comparison with BODIPY and DCVJ molecular rotors. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 93(9):1102–1106, 8 2020.
- [42] Xuping Li, Gleb Baryshnikov, Longjiang Ding, Xiaoyan Bao, Xin Li, Jianjun Lu, Miaoqing Liu, Shen Shen, Mengkai Luo, Man Zhang, Hans Ågren, Xudong Wang, and Liangliang Zhu. Dual-Phase Thermally Activated Delayed Fluorescence Luminogens: A Material for Time-Resolved Imaging Independent of Probe Pretreatment and Probe Concentration. *Angewandte Chemie - International Edition*, 59(19):7548–7554, 5 2020.
- [43] S. Doodoo, R. Steitz, A. Laschewsky, and R. Von Klitzing. Effect of ionic strength and type of ions on the structure of water swollen polyelectrolyte multilayers. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13(21):10318–10325, 2011.
- [44] Samuel Doodoo, Bizan N. Balzer, Thorsten Hugel, André Laschewsky, and Regine Von Klitzing. Effect of ionic strength and layer number on swelling of polyelectrolyte multilayers in water vapour. *Soft Materials*, 11(2):157–164, 4 2013.
- [45] Joris de Groot, Radek Oborný, Jens Potreck, Kitty Nijmeijer, and Wiebe M. de Vos. The role of ionic strength and odd-even effects on the properties of polyelectrolyte multilayer nanofiltration membranes. *Journal of Membrane Science*, 475:311–319, 2 2015.
- [46] Johannes Schmitt, Torsten Grünewald, Gero Decher, Peter S. Pershan, Kristian Kjaer, and Mathias Lösche. Internal Structure of Layer-by-Layer Adsorbed Polyelectrolyte Films: A Neutron and X-ray Reflectivity Study. *Macromolecules*, 26(25):7058–7063, 1993.
- [47] G Ladam, P Schaad, J C Voegel, ‡ P Schaaf, G Decher, and F Cuisinier. In Situ Determination of the Structural Properties of Initially Deposited Polyelectrolyte Multilayers. *ACS Publications*, 16(3):1249–1255, 2 2000.
- [48] Nynke G. Hoogeveen, Martien A. Cohen Stuart, Gerard J. Fleer, and Marcel R. Böhmer. Formation and stability of multilayers of polyelectrolytes. *Langmuir*, 12(15):3675–3681, 7 1996.
- [49] Irina Estrela-Lopis, Stefano Leporatti, Daniel Clemens, and Edwin Donath. Polyelectrolyte multilayer hollow capsules studied by small-angle neutron scattering (SANS). *Soft Matter*, 5(1):214–219, 2009.
- [50] D. S. Karpovich and G. J. Blanchard. Relating the polarity-dependent fluorescence response of pyrene to vibronic coupling. Achieving a fundamental understanding of the py polarity scale. *Journal of Physical Chemistry*, 99(12):3951–3958, 1995.
- [51] Klaus Peter Geigle, Joachim Wolf, and Georg Hohlneicher. Franck-Condon/Herzberg-Teller interferences in the 1Lb transitions of pyrene and chryse-

- ne. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 105(2-3):183–187, 1997.
- [52] Laurence Gallois, Marina Fiallo, Alain Laigle, Waldemar Priebe, and Arlette Garnier-Suillerot. The overall partitioning of anthracyclines into phosphatidyl-containing model membranes depends neither on the drug charge nor the presence of anionic phospholipids. Technical Report 3, 1996.
- [53] Kerry K. Karukstis, Elizabeth H.Z. Thompson, Jennifer A. Whiles, and Robin J. Rosenfeld. Deciphering the fluorescence signature of daunomycin and doxorubicin. *Biophysical Chemistry*, 73(3):249–263, 1998.
- [54] Katsuhiko Ariga, Yuri Lvov, and Toyoki Kunitake. Assembling alternate dye-polyion molecular films by electrostatic layer-by-layer adsorption. *Journal of the American Chemical Society*, 119(9):2224–2231, 1997.
- [55] Frank Caruso, Heinz Lichtenfeld, Edwin Donath, and Helmuth Möhwald. Investigation of electrostatic interactions in polyelectrolyte multilayer films: Binding of anionic fluorescent probes to layers assembled onto colloids. *Macromolecules*, 32(7):2317–2328, 4 1999.
- [56] Abohachem Laguecir, Serge Ulrich, Jérôme Labille, Nicolas Fatin-Rouge, Serge Stoll, and Jacques Buffle. Size and pH effect on electrical and conformational behavior of poly(acrylic acid): Simulation and experiment. *European Polymer Journal*, 42(5):1135–1144, 2006.
- [57] J. Th. G. Overbeek. The Dissociation and Titration Constants of Polybasic Acids. *Bulletin des Sociétés Chimiques Belges*, 57(4-6):252–261, 9 2010.
- [58] T. Alonso, J. Irigoyen, J. J. Iturri, I. L. Larena, and S. E. Moya. Study of the multi-layer assembly and complex formation of poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDADMAC) and poly(acrylic acid) (PAA) as a function of pH. *Soft Matter*, 9(6):1920–1928, 2013.
- [59] Steven W. Cranford, Christine Ortiz, and Markus J. Buehler. Mechanomutable properties of a PAA/PAH polyelectrolyte complex: Rate dependence and ionization effects on tunable adhesion strength. *Soft Matter*, 6(17):4175–4188, 2010.
- [60] Pradip, C. Maltesh, P. Somasundaran, R. A. Kulkarni, and S. Gundiah. Polymer-Polymer Complexation in Dilute Aqueous Solutions: Poly(acrylic acid)-Poly(ethylene oxide) and Poly(acrylic acid)-Poly(vinylpyrrolidone). *Langmuir*, 7(10):2108–2111, 10 1991.
- [61] Resmi Anand, Stefano Ottani, Francesco Manoli, Ilse Manet, and Sandra Monti. A close-up on doxorubicin binding to γ -cyclodextrin: An elucidating spectroscopic, photophysical and conformational study. *RSC Advances*, 2(6):2346–2357, 2012.

- [62] Elisamaria Tasca, Josephine Alba, Luciano Galantini, Marco D’Abramo, Anna Maria Giuliani, Andrea Amadei, Gerardo Palazzo, and Mauro Giustini. The self-association equilibria of doxorubicin at high concentration and ionic strength characterized by fluorescence spectroscopy and molecular dynamics simulations. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 577:517–522, 9 2019.
- [63] Elisamaria Tasca, Marco D’Abramo, Luciano Galantini, Anna Maria Giuliani, Nicolae Viorel Pavel, Gerardo Palazzo, and Mauro Giustini. A Stereochemically Driven Supramolecular Polymerisation. *Chemistry - A European Journal*, 24(32):8195–8204, 6 2018.

Capítulo 4

Complejos responsivos a pH basados en mezclas de PAA y Gemini 12-2-12

4.1. Introducción

En el capítulo previo, se estudiaron y explicaron las propiedades locales de un sistema complejo entre polielectrolitos de carga opuesta utilizando como sonda otro sistema complejo, compuesto por un polielectrolito y un fármaco. En los próximos capítulos se pondrá el foco en el diseño racional de plataformas coloidales para transporte y liberación controlada de fármacos, basadas en complejos de polielectrolitos y moléculas pequeñas de carga opuesta, específicamente tensoactivos en el capítulo presente. Como se ha mencionado en el Capítulo 1, la riqueza de comportamiento de las mezclas entre polímeros y tensoactivos es lo que lo hace tan atractivo para aplicaciones tecnológicas, entre ellas productos de cuidado personal, tratamiento de aguas, pinturas y sistemas de transporte de fármacos, por nombrar algunos [1–4]. También se ha mencionado y demostrado que la estructura y las propiedades de los complejos en volumen (ver Capítulo 1) y en superficie son el resultado de un intrincado balance entre interacciones atractivas y repulsivas entre los polímeros y los surfactantes. Ambas dependen de las condiciones físicas como el pH, temperatura o fuerza iónica tanto como de la naturaleza química de surfactantes y polielectrolitos. Esta dependencia es lo que hace a estos complejos candidatos para la formulación de sistemas responsivos, ya que dan la posibilidad de fabricar sistemas en los que es posible activar una respuesta a través de un determinado estímulo como pH, temperatura, luz o campos eléctricos o magnéticos. Por ejemplo, un sistema de transporte de fármacos puede ser formulado para la encapsulación de la droga en un complejo polielectrolito-surfactante cuya estabilidad dependa del pH. Asimismo, la misma respuesta se puede esperar en la interfaz; el grupo ha realizado una espuma termo-responsiva estabilizada por un complejo polielectrolito-surfactante termo-

responsivo [5]. Las espumas son un medio ideal para la administración de fármacos por vía tópica [6, 7], por lo que la formulación de espumas inteligentes cuya estabilidad puede ser modulada por un estímulo externo es un área de investigación activa y muy interesante [8–10] con aplicaciones que van desde la cosmética, recuperación de petróleo, catálisis de reacciones multifase hasta remediación ambiental y farmacéutica, entre otras.

En el presente capítulo, se han estudiado mezclas de ácido poliacrílico (PAA) y un tensoactivo catiónico no comercial divalente, Gemini 12-2-12 (G12) en solución acuosa. El PAA es un ácido débil, como ya se ha mencionado en el Capítulo 3, por lo tanto la carga de los grupos carboxílicos puede ser modulada a través del pH. Por lo tanto, las interacciones con el tensoactivo G12 podrían ser moduladas por este estímulo, cambiando las estructuras y propiedades de los complejos, tanto en volumen como en superficie. A su vez, el tensoactivo G12 posee una CMC en el rango de 0.9-1 mM (15 veces más chica que la correspondiente al DTAB) por lo que una formulación que contenga este tensoactivo sería no sólo más económica debido a que se utiliza una concentración menor que la de un surfactante monovalente, sino también menos citotóxica. Teniendo en mente esto como objetivo, a continuación se mostrarán las caracterizaciones tanto en volumen como en superficie de este sistema y se evaluarán las propiedades y la estructura a diferentes pHs para mostrar su potencial aplicación a formulaciones de DDS.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Materiales

El surfactante G12 se sintetizó en nuestro laboratorio siguiendo el método empleado por Zana et al. [11]. El resultado de la síntesis se corroboró por resonancia magnética nuclear. Luego de la síntesis y la purificación, el surfactante se mantuvo bajo vacío sobre sílice seco. El surfactante Gemini 12-2-12 pertenece a una familia de surfactantes caracterizados por dos dímeros tensoactivos unidos por un espaciador, usualmente compuesto de grupos alquilo. En consecuencia, los surfactantes Gemini tienen una menor concentración micelar crítica que sus componentes, reduciéndose órdenes de magnitud. También presentan un diagrama de fases rico, como en el caso del 12-2-12, con transiciones estructurales de micelas esféricas a tipo *gusano* (*wormlike*) a altas concentraciones de surfactante o fuerza iónica, colocándolo como candidato para aplicaciones modulables, como espumas inteligentes. La nomenclatura 12-2-12 implica que la composición del mismo: dos bromuros de dodeciltrimetilamonio (DTAB) unidos por las cabezas por un espaciador de dos metilos. Como consecuencia inmediata, mantiene la propiedad de ser un surfactante catiónico como el DTAB, pero de carga +2 en solución acuosa. La fórmula desarrollada se muestra a continuación:

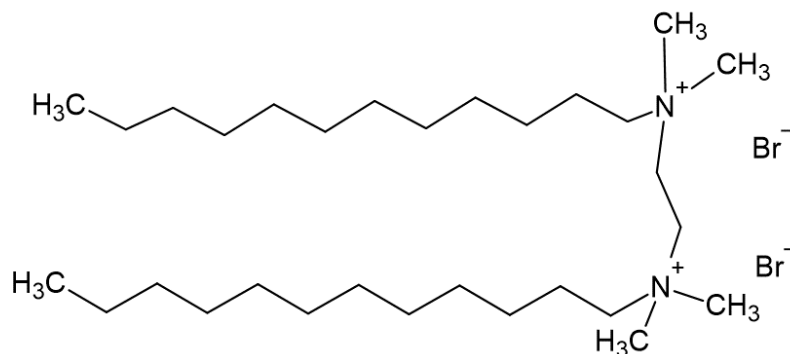


Figura 4.1: Gemini 12-2-12

El ácido poliacrílico, PAA (MW: 5.0×10^5 g. mol⁻¹), ácido clorhídrico e hidróxido de sodio fueron adquiridos en Sigma-Aldrich y se utilizaron como se recibieron. Se utilizó agua Milli-Q como solvente para preparar las soluciones.

4.2.2. Preparación de los complejos PAA-G12

Los complejos de PAA-G12 se prepararon mezclando una solución stock de PAA (5.0×10^{-4} M) en solución de surfactante a diferentes concentraciones, llegando a una concentración de PAA en la solución final de 1 mg mL⁻¹. Todas las muestras se prepararon a temperatura ambiente y se dejaron equilibrar 30 minutos antes de los experimentos. La respuesta a pH de los complejos se estudió añadiendo pequeñas cantidades de HCl a concentración 2 M (o de NaOH a 4 M) a la solución para cambiar el pH al valor deseado.

4.2.3. Desarrollo experimental

Las mediciones de tensión superficial de equilibrio se realizaron usando el sensor de una balanza de Langmuir KSV LB-5000 (KSV-NIMA). Se utilizaron como sondas papeles descartables de 20.6 mm (KSV-NIMA) o placa de Whilhelmy de platino. La solución a medir se colocó en una celda de 10 ml hecha de Teflon y la temperatura se controló con un circuito de agua y refrigerante provenientes de un termostato Lauda ALPHA R8. La temperatura en las inmediaciones de la superficie se midió con una precisión de 0.01 °C utilizando un sensor calibrado Pt-100. Todas las medidas se realizaron a 22 °C. Para la tensión de equilibrio, se siguió la evolución temporal de la misma y se consideró el equilibrio cuando la tensión alcanzara un valor constante por más de 30 minutos.

Las mediciones de tensión superficial dinámica se realizaron con la técnica de gota pendiente; las de viscosidad superficial con compresión y expansión súbita de barreras en la balanza de Langmuir (ver Capítulo 2).

Para la caracterización en volumen se utilizaron las técnicas de dispersión de luz dinámica y electroforética (DLS y ELS) y efecto Kerr sin mayores modificaciones a lo expuesto en el Capítulo 2. Para el análisis de los transitorios por efecto Kerr se ajustaron las curvas utilizando la siguientes ecuación para la obtención de los tiempos característicos τ [12]:

$$I(t) = I_{\infty} e^{-\left(\frac{t-t_0}{\tau}\right)^{\beta}} \quad (4.1)$$

donde I_{∞} representa la birrefringencia estacionaria y t_0 el valor temporal donde comienza la señal. La ecuación presenta un parámetro β que da cuenta del estiramiento y la flexibilidad del sistema. La introducción del parámetro β permite realizar ajustes sobre curvas de birrefringencia con tiempos de relajación de bajada largos (usualmente más largos que los de subida), típicos de sistemas deformables. El rango de valores que barre es entre 0 y 1 interpretándose que cuanto más cerca de la unidad, mayor rigidez.

4.3. Resultados

4.3.1. Fases presentes

Primeramente, se buscó elucidar el comportamiento macroscópico de fases de las soluciones de PAA con G12 a distintos pH. Para todas las mezclas, a concentraciones menores a 0.05 mM de G12 (con $c_p = 1 \text{ mg.ml}^{-1}$) y en el rango estudiado de pH de 3 a 11, todas las soluciones son transparentes, homogéneas y no se observó precipitación luego de 24 horas. A pH 3.2 y concentraciones cercanas y por encima de 0.1 mM, las soluciones son homogéneas, traslúcidas pero blanquecinas y no se observan agregados luego de 24 horas. Cuando se incrementa el pH a 6, la solución se vuelve cada vez más transparente y menos blanquecina; a pH 11 son totalmente transparentes. Para concentraciones de tensoactivo entre 0.2 y 0.8 mM a pH 3, el sistema forma agregados macroscópicos que permanecen en suspensión y no se redisuelven hasta que el pH alcanza valores mayores a 7.6. En este punto, la solución se vuelve lechosa pero homogénea y se mantiene así en el rango de pH 7.6 a 11. A pH 3.2 y concentración de tensoactivo correspondiente a la CMC del G12 (0.9-1 mM), la precipitación de los agregados ocurre instantáneamente, pero los mismos se redisuelven completamente a pH 7.4 o mayor. Cuando la concentración de tensoactivo excede la CMC por un factor de 2 o más, los precipitados no se redisuelven, aún a pH 11.

4.3.2. Tensión superficial de equilibrio

Como se ha mencionado en el Capítulo 1, las propiedades superficiales están conectadas con las propiedades en volumen. Esto se da a través de la igualdad de los potenciales químicos en el equilibrio en todas las fases (incluida la interfaz). Es por eso que la construcción de isotermas de tensión superficial de equilibrio permite determinar la concentración a la cuál los tensoactivos comienzan a unirse al polímero

de forma cooperativa (CAC) y a la vez, estudiar la estabilidad de espumas, la cual está íntimamente ligada a la tensión superficial en la interfaz agua-aire. La Figura 4.2 muestra las isothermas de tensión superficial de equilibrio de las mezclas de PAA-G12 en solución acuosa como función de la concentración de tensoactivo para tres valores de pH: 3.5, 6 y 11. La isoterma de equilibrio del Gemini también se ha incluido.

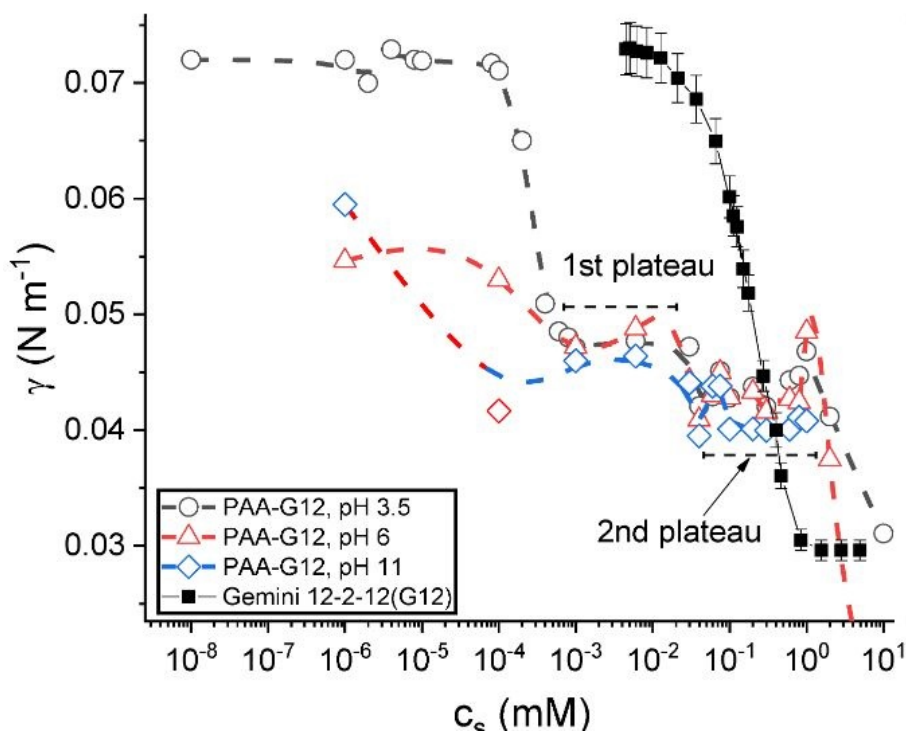


Figura 4.2: Isothermas de tensión superficial de equilibrio para mezclas de PAA-Gemini 12-2-12 a diferentes pHs: 3.5 (círculos abiertos), 6 (triángulos abiertos), y 11 (rombos abiertos). Se ha incluido la isoterma correspondiente al surfactante G12 libre de polímero (cuadrados negros).

Se puede notar el efecto sinérgico producido por el agregado de únicamente 1 mg por mililitro de PAA en la tensión de equilibrio del G12. Por ejemplo, para los tres pHs, la tensión superficial se reduce a cerca de 45 mN m^{-1} a bajas concentraciones de tensoactivo como 10^{-3} mM , la cual es tres órdenes de magnitud menor a la CMC. A esta concentración, el tensoactivo sin PAA tiene una tensión superficial igual a la del agua pura, 72 mN m^{-1} . Se observan diferencias en las isothermas de acuerdo al pH, el efecto sinérgico aumenta a medida que se incrementa el pH de 3.5 a 11, siendo más pronunciado cuando el pH aumenta de 3.5 a 6 que de 6 a 11. A su vez, se pueden observar claramente dos plateaus en las isothermas: el primero en el rango de $10^{-3} < c_s < 0.026 \text{ mM}$ y el segundo para $0.03 < c_s < 1 \text{ mM}$. Basado en estas isothermas, se ha decidido estudiar las mezclas a $c_s : 10^{-3}$ y $4 \times 10^{-2} \text{ mM}$, las cuales corresponden al primer punto y el punto medio del primer plateau, y otras mezclas a $c_s : 0.1$ y 0.5 mM , ambas

pertenecientes al segundo plateau.

4.3.3. Tensión superficial dinámica

En la misma línea, se procedió a evaluar el transitorio de la tensión superficial hasta que alcanza el equilibrio, $\gamma(t)$ para los sistemas PAA/G12. La Figura 4.3 muestra los resultados de tensión superficial dinámica para la mezcla con $c_s = 0,5$ mM y a los tres pHs estudiados. Los resultados para las demás concentraciones de surfactantes presenta el mismo perfil (ver Figura Apéndice B.2 y B.3). Para todos los valores de pH se observa que la tensión superficial decrece apreciablemente luego de cierto tiempo de inducción (mostrado por flechas en la Figura 4.3).

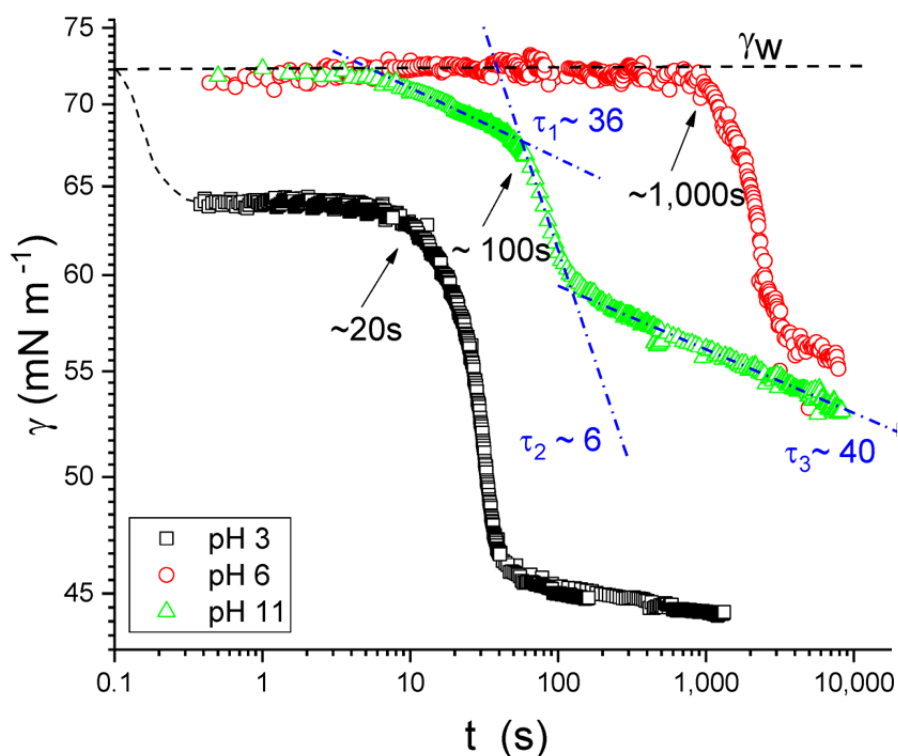


Figura 4.3: Tensión superficial dinámica de 1 mg mL^{-1} PAA mezclado con G12 a la concentración de $0,5$ mM. Se muestran las curvas para tres pHs: 3,5 (cuadrados), 6 (círculos) y 11 (triángulos). Las flechas indican el tiempo de inducción para el cual la tensión disminuye significativamente. Las líneas superpuestas a la curva de pH 11 son ajustes con exponenciales.

Este tiempo de inducción depende fuertemente del pH. Los tiempos para este sistema son $t_{ind} \sim 20$ s, 1000 s y 100 s para pH 3,5, 6 y 11 respectivamente. Para pH 6, la dinámica es muy lenta, pero al final del proceso de adsorción el valor de tensión de equilibrio es aproximadamente el mismo para todos los pHs (observar Figura 4.2, isothermas de equilibrio). En los experimentos para pH 6 y 11, las mediciones se

interrumpieron antes de alcanzar el equilibrio debido al desprendimiento de la burbuja (era muy complicado mantener la burbuja adherida al tip por tanto tiempo). A pH 3.5, las curvas comienzan a una tensión superficial de aproximadamente 65 mN m^{-1} , muy por debajo de la correspondiente al agua pura $\gamma_w = 72 \text{ mN m}^{-1}$. Esto es debido a que el tiempo necesario para formar la burbuja inicial ($\sim 1 \text{ s}$) en los experimentos de gota pendiente es mayor comparado al necesario para el proceso inicial de adsorción en este sistema, a este pH.

También se observa que las dinámicas de adsorción son complejas, con múltiples tiempos característicos que pueden ser ajustados con exponenciales. Estos ajustes son representados en la Figura 4.3 como líneas de puntos y rayas, y se han incluido los tiempos característicos en la figura (τ_1, τ_2, τ_3). Para las demás concentraciones se puede observar el mismo comportamiento: procesos con múltiples relajaciones y la presencia de un tiempo de inducción dependiente del pH.

4.3.4. Reología superficial

Otro factor que afecta la estabilidad de las espumas líquidas es la reología interfacial, en particular la dilacional. En las Figuras 4.4 y 4.5 se muestran los resultados de experimentos de compresión súbita analizados con CONTIN para la determinación posterior de las componentes elásticas y viscosas, como se explicó en el Capítulo 2. Las figuras corresponden a las mezclas realizadas con $c_s = 0.1 \text{ mM}$ a los tres pHs estudiados.

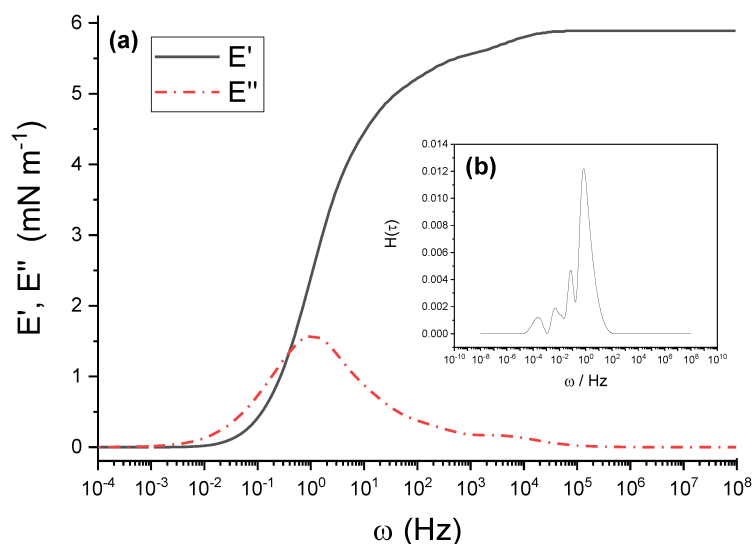


Figura 4.4: Módulos elástico E' y viscoso E'' obtenidos por reología interfacial para soluciones $1 \text{ mg mL}^{-1} + 0.1 \text{ mM}$ G12 a pH 3.5 y (b) Espectro de relajaciones $H(\tau)$ obtenido por CONTIN

El inset de la Figura 4.4 ,que corresponde a pH 3.5, muestra el resultado de la salida de CONTIN, la función $H(\ln \tau)$ a partir del cuál se puede calcular por integración

con las ecuaciones vistas en el Capítulo 2, los módulos elástico E' (ec. 2.4) y viscoso E'' (ec. 2.5).

Se puede notar de las Figuras 4.4 y 4.5 que tanto el módulo elástico como el viscoso disminuyen en un factor de aproximadamente 10 cuando se pasa de pH 3.5 a pH 6. Los valores de E' y E'' a pH 11 caen entre estos valores, pero más cerca a aquellos de pH 6. Éstos resultados son cualitativamente similares a los de la solución $c_s = 0.5$ mM presentados en el Apéndice B.4 , siendo el módulo elástico en este caso levemente menor que el obtenido a pH 3.5.

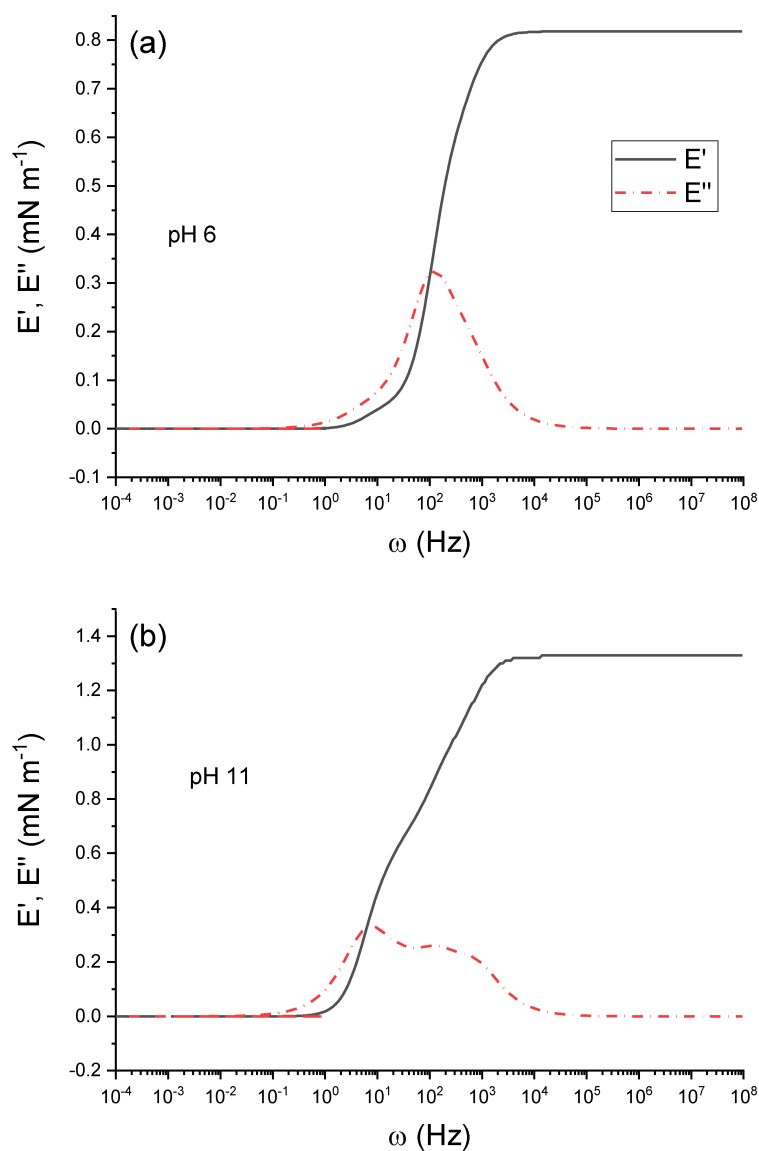


Figura 4.5: Módulos elástico E' y viscoso E'' obtenidos por reología superficial para soluciones $1 \text{ mg mL}^{-1} + 0.1 \text{ mM G12}$ a (a) pH 6 y (b) pH 11.

4.3.5. Reflectometría de rayos X

Con el objetivo de obtener información sobre la estructura de los complejos en la interfaz se realizaron mediciones de reflectometría de rayos X. En primer lugar se midió la interfaz solución-aire cubierta de una monocapa de G12, sin PAA, a una concentración superior a la CMC de forma de asegurar que la interfaz se encontraba saturada. En la Figura 4.6 se muestran los resultados de XRR para G12 a una concentración de 2 mM, correspondiente a dos veces la CMC.

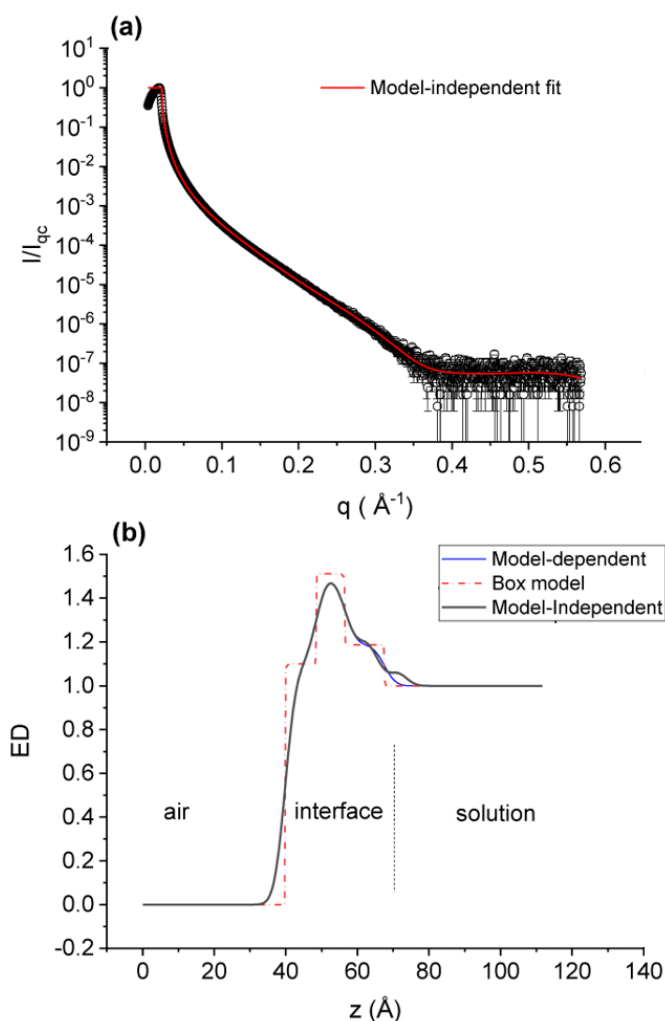


Figura 4.6: Resultados de XRR para una solución de 2mM de G12. (a) Reflectividad vs. vector de onda (b) Perfil de densidad electrónica (ED) obtenido con un ajuste modelo-independiente (línea negra) y con un modelo de caja (línea punteada roja)

En la Figura 4.6a se presenta la reflectividad, $R = I/I_{Q_c}$, siendo I la intensidad reflejada desde la interfaz y I_{Q_c} la intensidad reflejada al ángulo crítico de reflexión total,

en función de la componente z del vector de onda q . La línea roja es un ajuste modelo-independiente usando StochFit; el perfil de densidad electrónica resultante, ED, en la dirección z (perpendicular a la interfaz) se muestra en la Figura 4.6b, junto con un ajuste utilizando un modelo de 3 cajas (ver Capítulo 2). Este último ajusta correctamente la curva experimental, dando como resultado un espesor total para la monocapa de $(27.5 \pm 0.5) \text{ \AA}$. Si se considera la primera caja como la región de la cola hidrofóbica del G12, esta tendría una longitud de $(9.1 \pm 0.3) \text{ \AA}$. Si las dos cajas siguientes corresponden a la zona de la cabeza polar del surfactante, esta tendría un espesor, incluidos los contraiones, de $(18.4 \pm 0.8) \text{ \AA}$. El valor máximo de la densidad electrónica relativa (ED), con respecto a la densidad electrónica de la solución, es de $1.51 \pm 6 \times 10^{-3}$ y se encuentra a una distancia, medida desde el aire, de 12.4 \AA ; la cual es una estimación más realista para el tamaño de la cola hidrofóbica, y se correlaciona con la longitud (l) de una cadena alifática de $n\text{-CH}_2$ en configuración all-trans. Esta longitud se puede calcular mediante $l = 1,5 + 1,265n \text{ \AA}$ [13, 14], obteniendo para $n = 12$ (G12), $l = 15.2 \text{ \AA}$.

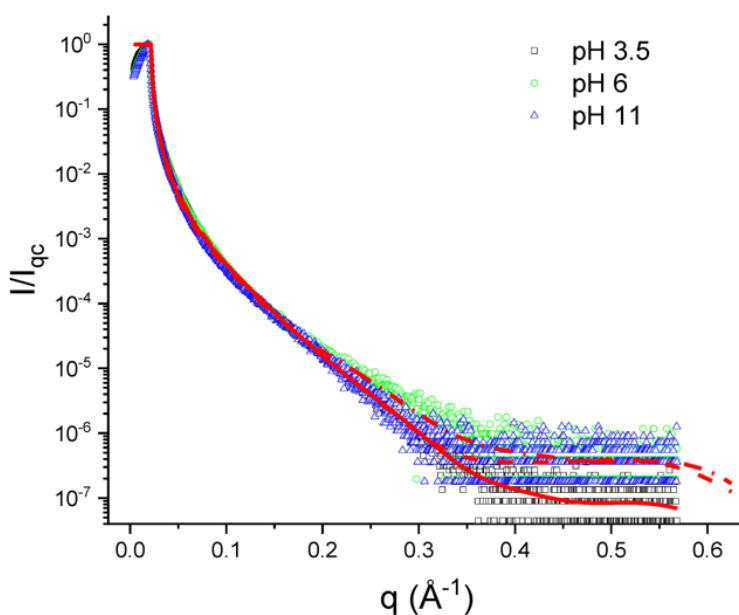


Figura 4.7: Curvas de XRR para el sistema $1 \text{ mg mL}^{-1} + 0.5 \text{ mM G12}$ para los tres pHs estudiados. Las líneas rojas corresponden a las curvas ajustadas.

En la Figura 4.7 se muestran los resultados de XRR para PAA $1 \text{ mg/ml} + \text{G12}$ 0.5 mM a pH 3.5, 6 y 11. Se ha incluido en la figura las curvas de ajuste utilizando StochFit. Se puede notar que todas las curvas son similares entre sí, y no muestran una dependencia clara con el pH. Este comportamiento se reprodujo para todas mezclas estudiadas. Los resultados de los ajustes de las curvas de XRR, para todas las concentraciones, se resumen en la Tabla 4.1:

c_s /mM	Espesor total/Å	ED	Distancia al ED max/Å
10^{-3}	48.9 ± 1 (pH 3.5)	1.52 (pH 3.5)	17.1 (pH 3.5)
4×10^{-2}	52 ± 2 (pH 3.5)	1.54 (pH 3.5)	16 (pH 3.5)
0.1	44.5 ± 1 (pH 3.5)	1.52 (pH 3.5)	11.3 (pH 3.5)
	25.9 ± 1 (pH 6)	1.7 (pH 6)	9.6 (pH 6)
	37.6 ± 1 (pH 11)	1.44 (pH 11)	1.42 (pH 11)
0.5	45.8 ± 1 (pH 3.5)	1.52 (pH 3.5)	12.7 (pH 3.5)
	26.8 ± 1 (pH 6)	1.49 (pH 6)	13.1 (pH 6)
	28.2 ± 1 (pH 11)	1.44 (pH 11)	13.3 (pH 11)

Tabla 4.1: Resultado de los ajustes para los sistemas PAA/G12 en la interfaz líquido aire

De estos datos se desprende que el espesor de la capa compleja de PAA/G12, ~ 45 Å a pH 3.5, es aproximadamente un 60% mayor que el espesor de la monocapa de Gemini puro, ~ 27 Å. Por otro lado, a pH 6, el espesor aparente de la capa compleja es cercano al del G12. Además, el máximo de la densidad electrónica relativa (ED), en todos los casos, es de ~ 1.5 , el mismo valor obtenido para las monocapas de Gemini puro ~ 1.51 . La distancia desde el aire a la región con la máxima ED para la capa compleja se encuentra entre 10 y 17 , siendo un valor cercano al de las monocapas de Gemini puras, ~ 12.6 . Por último, se observa que el espesor aparente de las capas de PAA/G12 depende del pH siguiendo el orden pH 6 < pH 11 < pH 3.5.

Debido a la dinámica interfacial lenta observada en las curvas de tensión superficial dinámica (ver Figura 4.3 y Apéndice B.2 y B.3), se pensó en seguir la evolución temporal del proceso de adsorción por medio de XRR. Para las soluciones a pH 3.5, esto no fue posible debido al tiempo necesario para preparar realizar el montaje de las muestras y alinear el equipo, lo cual demora aproximadamente 15 minutos, siendo un tiempo mayor al de la dinámica de adsorción superficial. La única excepción fue la mezcla a $c_s = 10^{-3}$ mM a pH 6 y 11; los resultados a pH 11 se muestran en la Figura 4.8.

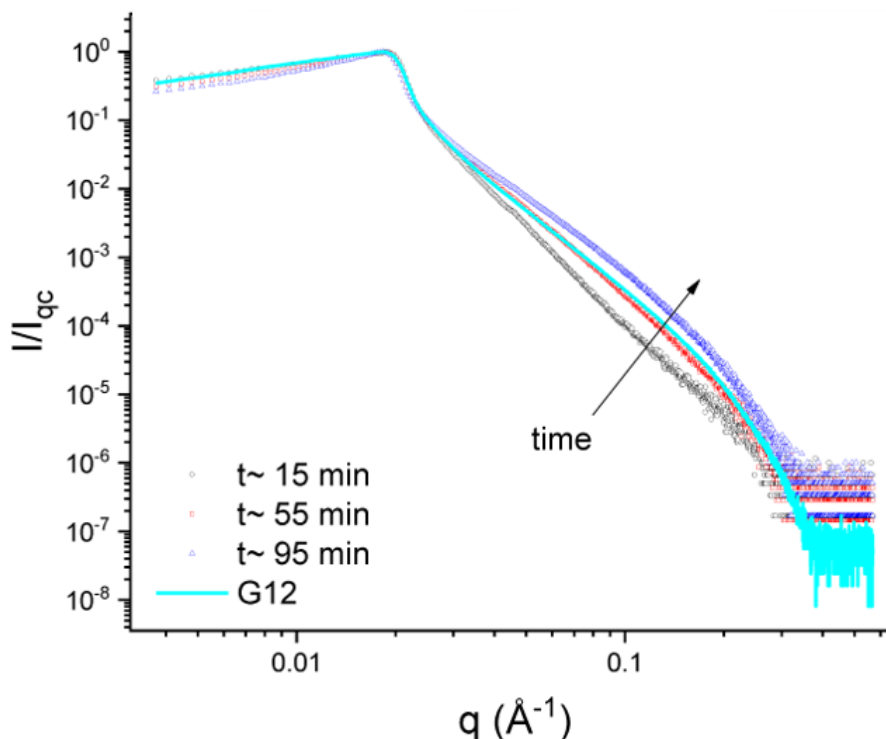


Figura 4.8: Curvas de XRR en función del tiempo para 1 mg mL⁻¹ PAA + 0.1 mM G12 a pH 11. La primer curva (círculos negros) se obtuvo luego de un proceso de adsorción de 15 minutos. La segunda (cuadrados rojos) y tercera (triángulos azules) se midieron luego de 55 y 95 min, respectivamente. Se ha incluido por comparación la curva correspondiente a la monocapa de Gemini, libre de polímero (línea cyan). Se han eliminado las barras de error para mejorar la visualización

Los resultados del ajuste de las curvas de la Figura 5.7 usando StochFit se muestran en la Tabla 4.2. Se observa que tanto el espesor como la densidad electrónica relativa (ED) aumentan con el tiempo desde valores muy bajos hasta los de equilibrio. Si se comparan los resultados de la Tabla 4.2 con aquellos a la misma concentración de surfactante y pH ($c_s = 0.1$ mM y pH 11) de la Tabla 4.1, se observa que los valores son similares, garantizándose así la reproducibilidad del experimento.

Tiempo/min	Espesor total/Å	ED	Distancia al ED max/Å
15	15.3 ± 0.8	1.18	14.1
55	30.0 ± 0.6	1.37	13.2
95	36.9 ± 0.5	1.76	12.7

Tabla 4.2: Resultado de los ajustes para el sistema PAA a $c_s = 0.1$ mM y pH 11, como función del tiempo.

4.3.6. Dispersión de luz dinámica y electroforética

Pasando a la caracterización en volumen, la Figura 4.9 muestra el diámetro hidrodinámico aparente (D_h) y el índice de polidispersidad (PDI) para soluciones de PAA-G12 al pH de formación, 3.2, en función de la concentración de G12. Ambas magnitudes fueron obtenidas por análisis de cumulantes de las curvas de autocorrelación como se explica en el Capítulo 2. Se estudió el rango de concentraciones $10^{-3} \text{ mM} < c_s < 3 \text{ mM}$. Para las soluciones que presentaron precipitado se extrajo y midió el sobrenadante.

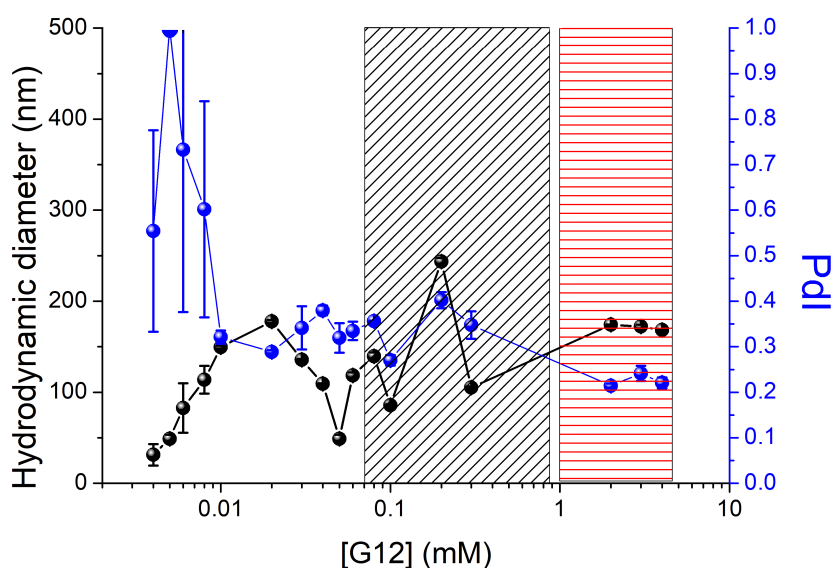


Figura 4.9: Diámetro hidrodinámico aparente y polidispersidad obtenidas por análisis de cumulantes para soluciones de PAA/G12

Lo primero que se puede observar en la Figura 4.9 es que para valores de c_s menores $1 \times 10^{-2} \text{ mM}$ la polidispersidad presenta una gran incerteza, ya que las curvas de autocorrelación no eran ajustables. Por DLS sólo se pudo observar correlación, y en consecuencia, presencia de complejos medibles a partir de $1 \times 10^{-2} \text{ mM}$, a pesar de que la CAC se ubica un orden de magnitud por debajo. Una vez que se supera este valor, las funciones de autocorrelación presentan un único modo con una gran dispersión, por lo tanto el sistema muestra una alta polidispersidad. El índice de polidispersidad se ubica alrededor de 0.3 y el diámetro hidrodinámico varía entre 100 y 200 nm. A partir de 0.1 mM (zona de rayas negras de la Fig. 4.9) se observan agregados macroscópicos en suspensión, por lo que las mediciones presentan una clara dispersión de diámetros en el rango, sin una tendencia monótona o evidente. Cuando se supera la CMC (zona de rayas rojas), el sobrenadante de las muestras analizadas presenta tamaños constantes, cercanos a 150 nm y una menor polidispersidad, ubicada en 0.2.

Posteriormente se procedió a analizar por DLS dos muestras con c_s : 5×10^{-2} mM y 1 mM de surfactante en función del pH. Esta última muestra se analizó en el rango de redispersión, para $\text{pH} > 7$. Los resultados se exhiben en las Figuras 4.10(a) y 4.10(b):

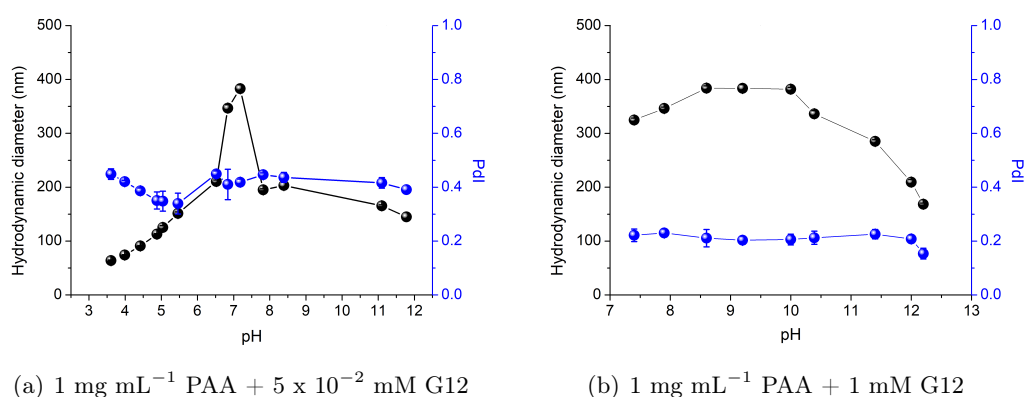


Figura 4.10: Diámetro hidrodinámico aparente y polidispersidad obtenidas por análisis de cumulantes para soluciones de PAA/G12 en función del pH

En el caso del sistema con $c_s = 5 \times 10^{-2}$ mM se observa que la polidispersidad sigue siendo alta en todo el rango estudiado (0.4) y los diámetros hidrodinámicos aparentes crecen hasta $\text{pH} 6.5$ con $D_h \sim 200$ nm; presentando un salto de casi el doble para pH s entre 7 y 8. El pico se obtiene para $\text{pH} 7.5$ en un valor cercano a 390 nm, para luego volver a disminuir abruptamente a ~ 190 nm para $\text{pH} > 8$.

En el sistema con 1 mM de G12, se puede observar que la polidispersidad se mantiene inalterable una vez que el sistema redispersa, en un valor alrededor de 0.2. En cuanto al D_h , se sitúa alrededor de 350 nm, para luego descender a partir de $\text{pH} 10$, monótonamente, hasta alcanzar los 180 nm para $\text{pH} 13$.

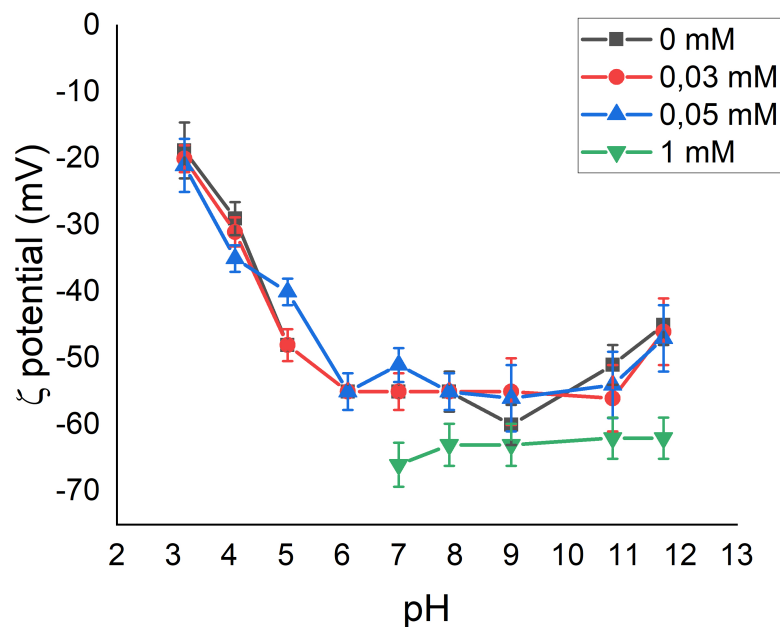


Figura 4.11: Potencial ζ para mezclas de PAA con distintas concentraciones de G12 en función del pH.

En la Figura 4.11 se observan los resultados de ELS para una solución de PAA libre de G12 y para tres mezclas con c_s : 3×10^{-2} mM, 5×10^{-2} mM y 1 mM de G12 en función del pH. Se observa que el comportamiento general para las primeras tres soluciones es el mismo, no hallándose diferencias apreciables entre la solución sin y con surfactante (menor a 5×10^{-2} mM). El perfil de estas tres mezclas muestra que el potencial aumenta en valor absoluto en un factor 3 hasta pH 6 y para pHs mayores se mantiene en ese valor constante. Para las mezclas con c_s : 1 mM, se midió de la misma forma que en DLS, el sobrenadante en la zona de precipitado a pH 3.2 y la solución en la zona de redispersión (pH >7), ya que en la zona intermedia la solución se vuelve turbia y con agregados en volumen. Se observó un valor positivo para pH 3.2 de 38 ± 3 mV (ver Figura 4.12) y para la zona de redispersión se observó un valor prácticamente constante de alrededor de -65 ± 5 mV. Para visualizar mejor el comportamiento al pH de formación (pH 3.2) se muestra en la Figura 4.12 el potencial ζ como función de la concentración de surfactante en el mezcla.

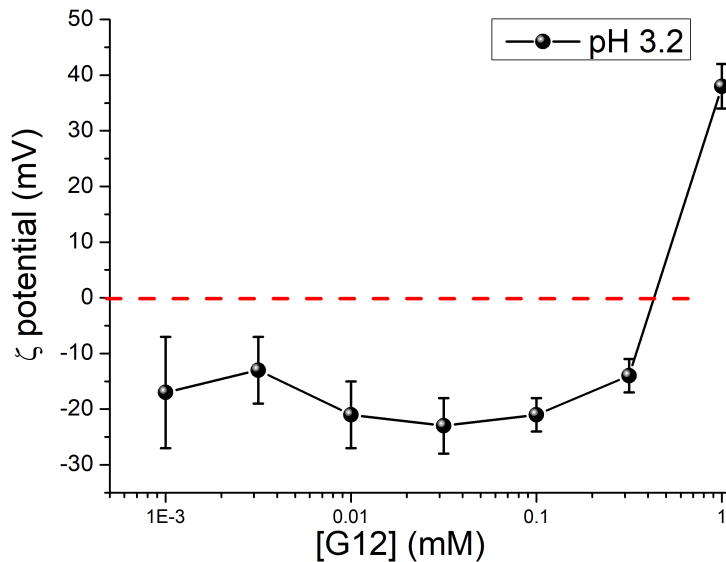


Figura 4.12: Tendencia del potencial ζ con la concentración de surfactante en la mezcla para pH 3.2.

Se puede notar que hay un cambio en el signo del potencial que se da entre la concentración 0.32 mM y 1 mM. Sin embargo hasta el último valor negativo el potencial se mantiene prácticamente constante, como ya se había notado en la Figura anterior.

4.3.7. Efecto Kerr

Para tratar de dar una descripción del entorno eléctrico del sistema y especificar la morfología del mismo se realizaron medidas de efecto Kerr. En la Figura 4.13 se observan las señales Kerr para una solución de PAA sin surfactante y para la mezcla con $10^{-3} \text{ mM} < c_s < 0.06 \text{ mM}$ a pH 3.2. Las medidas corresponden a un campo aplicado efectivo de 550 kV/m. Se puede observar que la intensidad de la señal aumenta conforme se aumenta la cantidad de G12 en la muestra. También se aprecia una diferencia entre la forma de la señal de PAA libre respecto de la que contiene la menor cantidad de surfactante medida, c_s : 10^{-3} mM , lo que indica una diferencia en las propiedades electroópticas del sistema sin y con surfactante .

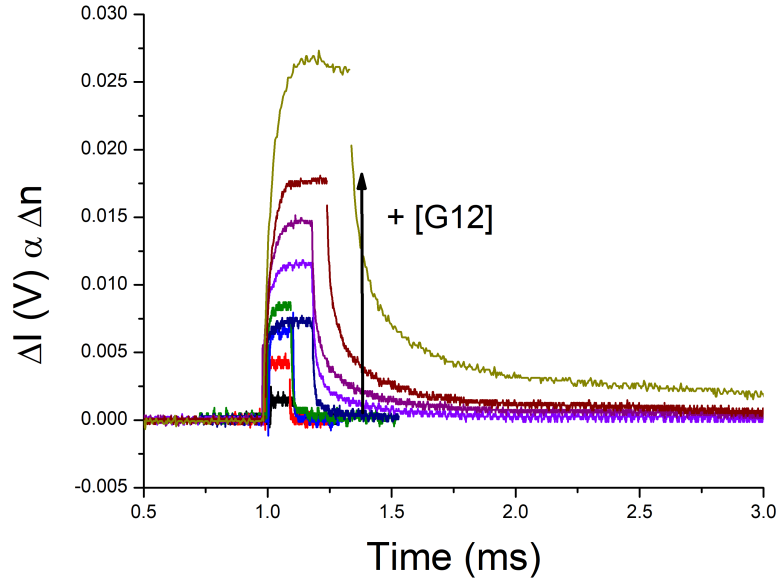


Figura 4.13: Señales Kerr obtenidas tras la aplicación de un campo externo efectivo $E = 550 \text{ kV/m}$ a soluciones de PAA libre 1 mg mL^{-1} y mezclado con $10^{-3} \text{ mM} < c_s < 6.10^{-2} \text{ mM}$ G12. Las mezclas con concentraciones más altas fueron excitadas con un pulso de mayor duración para asegurar llegar a la birrefringencia estacionaria.

Lo segundo a destacar es que la birrefringencia aumenta con el aumento de la cantidad de G12 en la mezcla. Para visualizar mejor esta afirmación en la Figura 4.14 se observan las constantes de Kerr ($B-B_0$ ¹) en función de la concentración de G12. Las constantes se obtuvieron a través del ajuste por cuadrados mínimos de las curvas $\Delta n_\infty(E^2)$ utilizando la ley de Kerr enunciada en la ec. 2.15 en el Capítulo 2.

¹ B_0 corresponde a la constante de Kerr del solvente, en este caso, para el agua $B_0 = 6.2 \cdot 10^{-13} \text{ mV}^2$

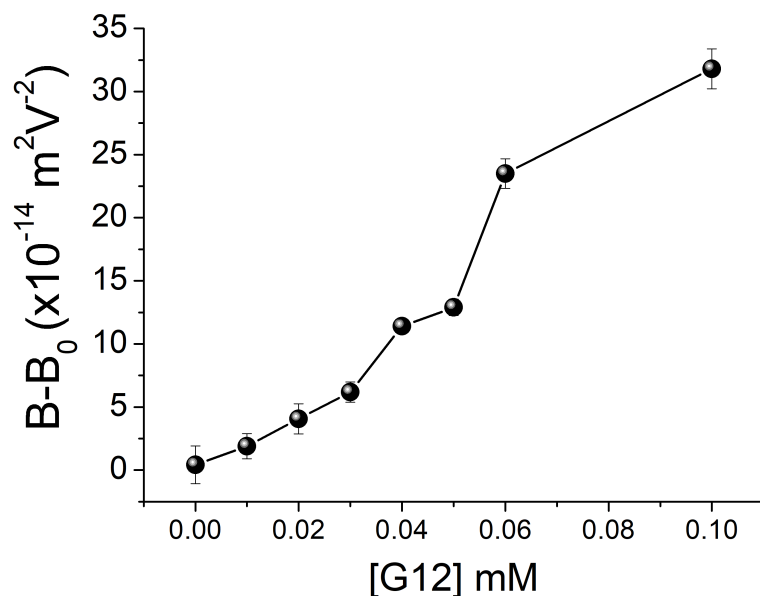


Figura 4.14: Evolución de la constante de Kerr ($B-B_0$) del sistema PAA/G12 en función de la concentración de surfactante.

También se puede observar que todas las señales de las mezclas hasta esta concentración de surfactante, alcanzan un valor de birrefringencia estacionario. Este comportamiento no se volverá a repetir para concentraciones mayores al pH de formación (3.2), impidiendo obtener una constante de Kerr asociada.

Posteriormente se midieron y analizaron cinco muestras en función del pH por efecto Kerr, la primera correspondiente al PAA libre y las demás, mezclas con G12 a c_s : 10^{-3} mM, 0.03 mM, 0.05 mM, 0.5 mM y 1 mM, estos dos últimos en la zona de redispersión. Las señales obtenidas para los sistemas PAA libre, 0.05 mM, 0.5 mM y 1 mM se observan en la Figura 4.15:

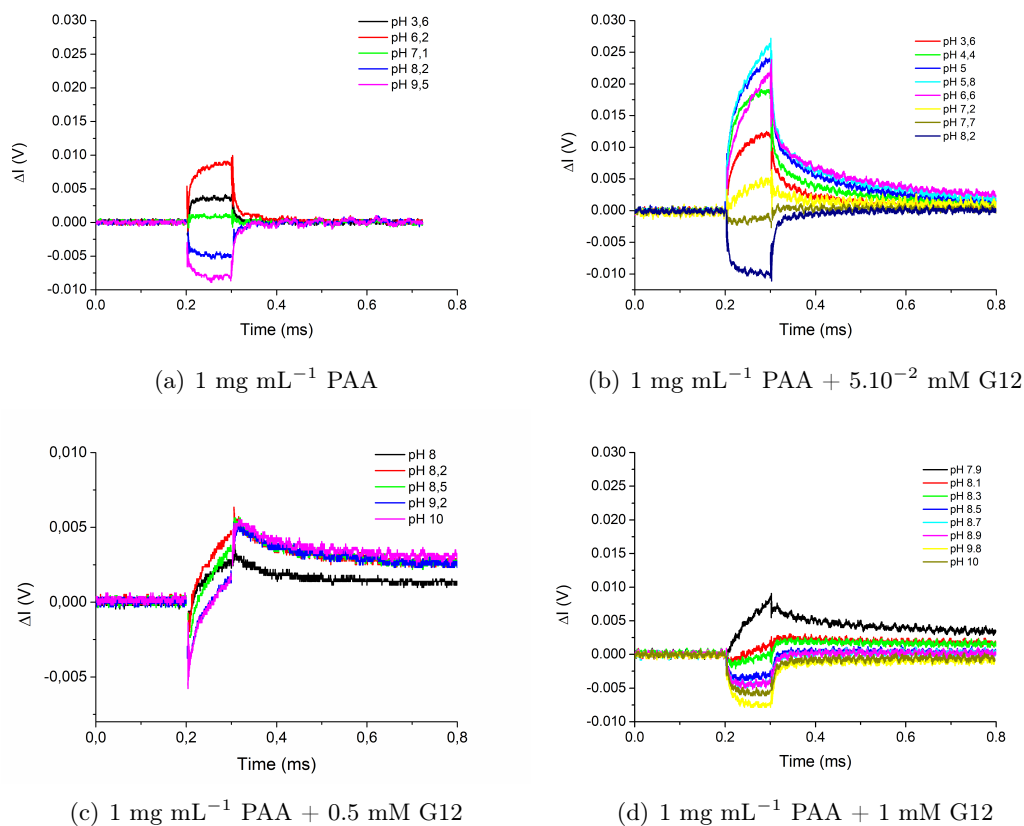


Figura 4.15: Señales de birrefringencia por efecto Kerr obtenidas para un voltaje efectivo de 800 V en soluciones de PAA libre y PAA/G12 a diferentes pHs

Se puede observar que en todos los casos hay una inversión en el signo de la birrefringencia al aumentar el pH. El PAA libre a pH 3.2 tiene una birrefringencia positiva leve; pero aumenta su valor al aumentar el pH. Alcanza el máximo alrededor de pH 6 y comienza a disminuir para posteriormente presentar birrefringencia negativa al superar pH 7.

Para la mezcla con 0.5 mM de G12 el sistema presenta un comportamiento diferente a las demás: no alcanza un estacionario en el tiempo de aplicación del pulso y las señales tienen procesos que dependen del campo. Cabe destacar que a dicha concentración de G12 la solución presenta agregados macroscópicos en suspensión. De la misma manera que se expuso previamente, se obtuvieron las constantes de Kerr B para los sistemas en función del pH en las zonas donde se pudo determinar una birrefringencia estacionaria, las cuales se encuentran condensadas en la Figura 4.16:

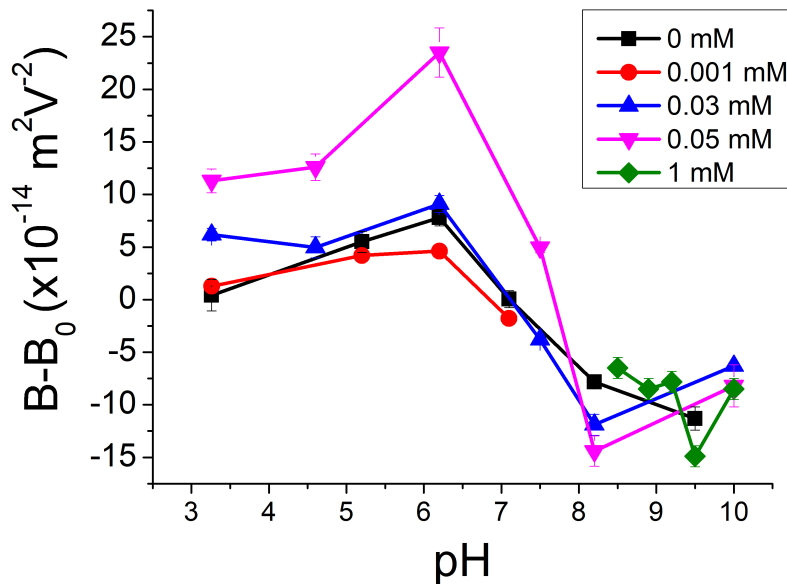


Figura 4.16: Constantes de Kerr para sistemas PAA libre y mezclados con 10^{-3} mM, $3 \cdot 10^{-2}$, $5 \cdot 10^{-2}$ y 1 mM de G12 en función del pH

Se observa una tendencia común para la constante de Kerr en las mezclas estudiadas (lo que se traduce en un aumento de la birrefringencia por la ley de Kerr): primeramente entre pH 3.2 y 6 es positiva y aumenta su valor, alcanzándose un máximo alrededor de pH 6. Al aumentar levemente el pH, B comienza a disminuir llegando a mínimos cercanos a birrefringencia nula alrededor de pH 7 y continúa descendiendo monótonamente hacia valores negativos con una pendiente más pronunciada. En los casos que se pudo medir, alrededor de pH 10-12 la constante de Kerr parece alcanzar un valor fijo cercano a $-10^{-13} \text{ m}^2 \text{ V}^{-2}$.

Análisis de transitorios

Al analizar los regímenes transitorios, se analizaron las curvas del PAA libre y las de las mezclas con $c_s = 5 \cdot 10^{-2}$ mM y 1 mM. Se analizaron los transitorios de relajación de bajada, ya que los de relajación de subida o build up no alcanzan en muchos casos el estacionario y no es posible realizar un ajuste que pueda ser comparable. El caso más simple corresponde al PAA libre, cuyas relajaciones pudieron ser ajustadas por una función monoexponencial con un tiempo característico de relajación $\tau \sim 7 \mu\text{s}$, en el límite de detección del detector. Este resultado se repite indistintamente del pH y se obtiene para campos efectivos superiores a 200 kV/m ya que para tensiones menores la señal es muy baja y ruidosa como para realizar un ajuste. En la Figura 4.17 se muestran los datos obtenidos de los ajustes de las relajaciones para la mezcla PAA + $5 \cdot 10^{-2}$ mM G12, a dos campos aplicados efectivos 250 kV/m y 550 kV/m y en función

del pH de la solución. Se utilizó una función biexponencial para ajustar los datos, por lo que se desprendieron dos tiempos característicos, τ_1 y τ_2 .

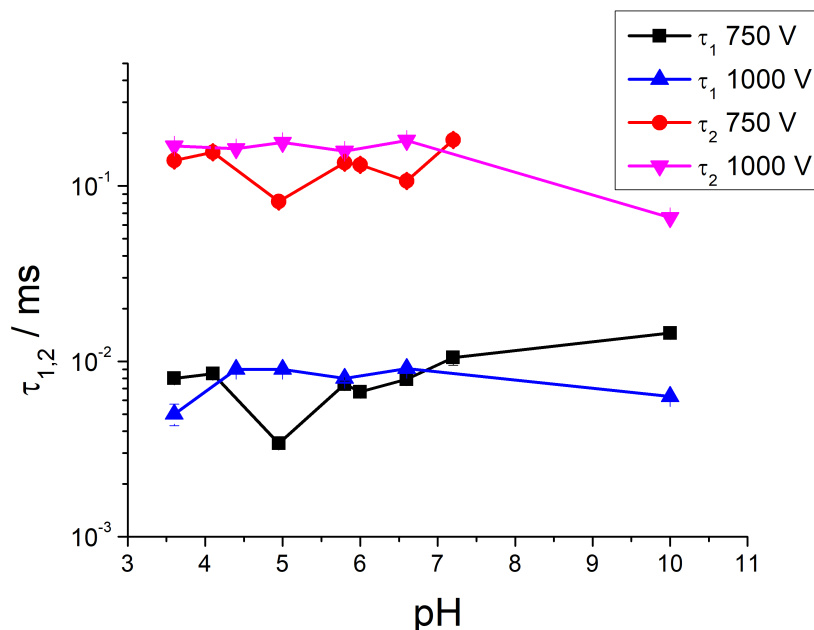


Figura 4.17: Tiempos de relajación obtenidos del ajuste de las señales Kerr para el sistema $1 \text{ mg mL}^{-1} + 5 \cdot 10^{-2} \text{ mM}$ G12 a distintos pHs y para tensiones aplicadas efectivas de 250 kV/m y 550 kV/m

Se puede observar que ambos tiempos difieren en aproximadamente un orden de magnitud. También se puede notar que el pH no es una variable que influye claramente en los tiempos de relajación del sistema, ya que no se observa una dependencia evidente al variar el pH. Lo mismo sucede con el campo aplicado en el rango estudiado. De la misma forma que para el PAA libre, la mezcla de PAA con $c_s = 1 \text{ mM}$ en la zona de redispersión presentó un único tiempo de relajación característico prácticamente constante ante pH y campo aplicado. El valor obtenido para τ fue de $15 \mu\text{s}$ aproximadamente. En todos los casos se observó independencia respecto al campo aplicado.

También se aplicó el modelo de relajaciones de bajada dado por la ecuación 4.1 a las señales de birrefringencia del PAA libre y las de las mezclas con $c_s = 0.05 \text{ mM}$ y 1 mM condensadas en la Figura 4.15. Del ajuste se obtuvieron los parámetros de estiramiento β y el coeficiente de difusión rotacional D , los resultados de los ajustes en función del pH para cada sistema se muestran en la Figura 4.18. Tanto para el PAA libre como en la mezcla con 1 mM de G12, el coeficiente de estiramiento es igual a 1 en el rango de pH estudiado excepto para un pH cercano a 8, para el primero $\beta = 0.6$ y para el segundo 0.4. Si se observa la Figura 4.15, las señales no tienen relación evidente, ya que para el PAA libre a pH 8.2 presenta birrefringencia negativa y la mezcla con 1

mM de G12 a pH 7.9 es positiva (a pH 8.1 no se pudo ajustar la curva por el ruido de la señal). En cambio, para la mezcla con 0.05 mM de G12 se observa que el coeficiente β se encuentra comprendido entre 0.3 y 0.4 en el rango de pH estudiado, indicando partículas altamente deformables.

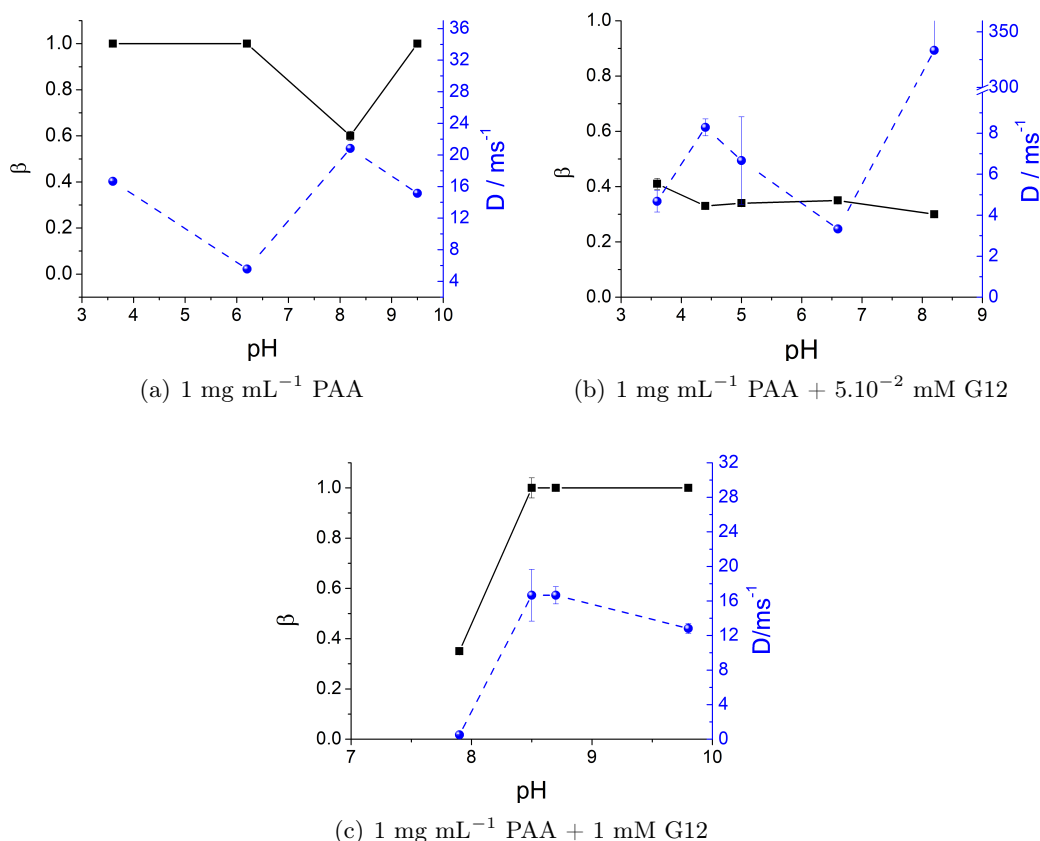


Figura 4.18: Coeficiente de estiramiento β y de difusión rotacional D obtenidos del ajuste de las relajaciones con el modelo dado por la ecuación 4.1

Con respecto a los coeficientes de difusión rotacional se observa que a diferencia de los ajustes con exponenciales, varían levemente con respecto al pH sin una tendencia fija. Se observan puntos singulares, por ejemplo, en la muestra a pH 8.2 de composición 1 mg mL⁻¹ PAA + 5.10⁻² mM G12, el coeficiente D adquiere un valor de 340 ms^{-1} cuando la tendencia general se ubica entre 3 y 8 ms^{-1} . El otro punto singular se observa para la muestra a pH 7.8 de composición 1 mg mL⁻¹ PAA + 1 mM G12, cuyo valor es alrededor de 0.1 ms^{-1} , dos órdenes de magnitud menor que la tendencia general ubicada entre 12 y 16 ms^{-1} . En este último caso el ajuste del modelo presentó una alta variabilidad en la determinación de los parámetros, lográndose una bondad de ajuste $R^2 = 0.7$.

4.4. Discusión

De las isotermas de tensión superficial en la Figura 4.2, se puede observar que la actividad superficial de los complejos en la interfaz es mayor a pH 6 y 11 que a pH 3.5, para concentraciones de surfactantes muy bajas. De hecho para pH 3.5 no se observa actividad superficial hasta que la concentración de G12 supera 2×10^{-4} mM, mientras que la tensión superficial a pH 6 y pH 11 disminuye apreciablemente para concentraciones tan bajas como 10^{-6} mM (1 nM). Esto se explica claramente a partir de la dependencia del grado de ionización del PAA con el pH. A mayor pH mayor es la ionización del PAA, por lo tanto la interacción polímero/surfactante se verá favorecida por la atracción electrostática entre ambos a pHs mayores; mientras que a pH 3.5, el PAA se encuentra prácticamente no ionizado y la interacción se da por otros mecanismos (entrópicos). A pesar de esto, por encima de $c_s = 4 \times 10^{-4}$ mM, los sistemas alcanzan un plateau con el mismo valor de tensión superficial, 47 mN m^{-1} , independientemente del pH. En cambio, analizando la dinámica interfacial se observa una clara dependencia con el pH de la tensión superficial dinámica, como se puede observar en la Figura 4.3. Este comportamiento es común a todas las concentraciones de surfactante estudiadas en este trabajo. A pH 6, la tensión superficial comienza a descender luego de un largo tiempo de inducción- Para el sistema observado en la Figura 4.3, este tiempo es de alrededor de 1000 s. A pH 11, también se registra un tiempo de inducción pero más corto (100 s) que para pH 6. A pesar de que estas diferencias en la tensión superficial dinámica sugieren un mecanismo de respuesta para sistemas dispersos (como espumas o burbujas) no es suficiente para explicarlo completamente. La reología interfacial da cuenta de la estabilidad de estos sistemas, y como se puede apreciar en la Figura 4.4 y 4.5 la viscoelasticidad depende del pH. En todos los casos estudiados se puede observar que el módulo elástico y de pérdida disminuyen significativamente cuando el pH pasa de 3 a 6. La elasticidad interfacial dilacional esta relacionada a la estabilidad en films líquidos y espumas [11, 15, 16] y uno esperaría que la formación de espumas más estables se de para sistemas con mayor módulo elástico superficial. Se han realizado las experiencias y mediciones necesarias para corroborar esta suposición, obteniéndose espumas responsivas al pH, sin embargo el análisis teórico y experimental de los mismos no está contenido en el marco de esta tesis [17].

Respecto a los resultados de XRR, el espesor encontrado para la capa de surfactante (considerando la distribución electrónica máxima, entre 13 y 17 Å) con y sin PAA, coincide perfectamente con reflectometría neutrónica sobre monocapas de DTAB [18] (el G12 está formado por dos moléculas de DTAB unidas por la cabeza polar por un grupo etilo). En el equilibrio y a un determinado pH, todas las mezclas, sin importar la concentración de surfactante, mostraron características similares: las curvas pueden ser ajustadas correctamente por modelos de 3 a 4 cajas, donde las primeras (tomadas desde el aire) se corresponden perfectamente al tamaño de surfactante, como se mencionó. La otra región, en la dirección hacia el volumen de la solución, se asignó a la capa interfacial del polímero PAA de la misma forma que en la referencia [18]. De los datos de XRR, se ha demostrado que el espesor de la capa de Gemini libre de PAA es de alre-

dedor de 25 Å y para la capa correspondiente al complejo, 50 Å aproximadamente. Las diferencias aparentes en el espesor a pH 3.5, 6 y 11, deben ser atribuidas a la diferencia de contraste de los rayos X debido al grado de hidratación de las cadenas de PAA y no, considerando la tensión superficial de equilibrio, a la ausencia de polímero en la superficie para pH >6. El PAA, en ausencia de G12, no presenta actividad superficial, al menos en la concentración utilizada en este trabajo (1 mg mL^{-1}), por lo tanto su presencia en la interface es una consecuencia de la interacción con el surfactante. La adsorción de moléculas de G12 en la interface sirve de puntos de anclaje para el polímero, vía interacciones electrostáticas y/o hidrofóbicas. El complejo proceso de adsorción de varios pasos observado en las curvas de tensión superficial dinámica también puede seguirse a través de XRR, en particular en la Figura 4.8, la cual muestra la evolución temporal del proceso de adsorción. Este proceso, para la mezcla de PAA-G12, atraviesa un paso que resulta en una interfaz con las mismas propiedades que aquellas que sólo contienen Gemini. Este mecanismo de dos pasos fue observado y reportado previamente para otros complejos polielectrolito-tensoactivo [19]. Lo mencionado previamente, permite entender el mecanismo involucrado en la respuesta superficial frente al pH; a través de la modificación de este parámetro, se puede cambiar y modular la interacción polielectrolito surfactante. A pH 3.5, el PAA se encuentra más protonado (90 % aprox.), las cadenas poliméricas están menos hidratadas y por lo tanto son más hidrofóbicas (por eso la solución es lechosa), la interacción electrostática con las cabezas polares del G12 es débil, el tamaño de los agregados es pequeño (pero denso, menos hidratado) y la dinámica de adsorción es más rápida. Ocurre lo opuesto a medida que el pH aumenta. A pH >6, cerca del 90 % de los grupos carboxílicos en el PAA están deprotonados; por lo que la interacción electrostática con las moléculas de G12 es mayor, los agregados están más hidratados (por eso las soluciones se transparentan a medida que el pH aumenta). Los complejos tienen una menor tendencia a adsorberse en la interfaz y la dinámica se ralentiza. Sin embargo a pesar de las distintas dinámicas de adsorción, debido a la sinergia en la adsorción de ambas especies, luego del proceso de dos pasos mencionado, las capas finales formadas por los distintos complejos son similares al equilibrio, como se puede observar en las isotermas de tensión superficial para los tres pHs y también en las curvas de reflectometría de rayos X.

En cuanto a la caracterización en volumen se realizó un estudio al pH de formación, 3.2. Por DLS se ha encontrado que el sistema es altamente polidisperso frente al agregado de surfactante. Asimismo se evidencia un proceso de agregado de los complejos que da como resultado estructuras macromoleculares en suspensión y luego precipitados, sin evidenciar redispersión por el sucesivo agregado de Gemini. Wang et. al [20] han reportado que para un sistema PAA-DTAB con bajo grado de ionización (menor al 30 % o pH \sim 6) el proceso de complejación en volumen se da de la siguiente manera: a bajas concentraciones de surfactante este tiende a ubicarse en las zonas hidrofóbicas del polímero, esto induce la micelización en la cadena que provoca que el polímero se extienda en una conformación lineal debido a la repulsión electrostática de las micelas. El polímero en esta conformación es más proclive a formar puentes de hidrógeno con otros polímeros extendidos (a través de los grupos COOH), lo que da lugar a agregados

multicadena y desemboca en una fase precipitada. Con el agregado de surfactante, se sigue induciendo la formación de micelas en la columna del polímero y la repulsión entre ellas es tal que se logran romper los puentes hidrógeno entre los grupos COOH polímeros y la solución se redispersa. A pesar de que el estudio de Wang et al. se da en las mismas condiciones de concentración del PAA, el mismo peso molecular y que los surfactantes parecieran ser similares (el Gemini está compuesto por dos DTAB unidos por un espaciador), el mecanismo de complejación para el sistema de esta tesis no parece seguir este proceso, ya que no se observa redispersión ni cambios conformacionales evidentes por DLS, aunque esto último tal vez no es evidente debido a la polidispersidad. Como se verá más adelante, la utilización de efecto Kerr puede ayudar a dilucidar esta cuestión. Sin embargo, considerando los resultados presentados en superficie, se puede afirmar que el PAA a pH 3.2 se encuentra poco hidratado, en una conformación correspondiente a un polímero neutro en un mal solvente (ver Fig 4.19 (a)), por lo que el Gemini interactuará con él a través de sus colas alquílicas con las regiones hidrofóbicas del PAA o, en menor medida, electrostáticamente con las fracciones de polímero expuestas (ver Fig 4.19(b)). Al superar 0.1 mM se hacen evidentes agregados en suspensión aunque por DLS no se notaron cambios en las magnitudes observadas. Finalmente, al alcanzar la CMC, el sistema precipita y el sobrenadante se caracteriza por presentar una polidispersidad de 0.2 y un D_h de 150 nm para pH 3.2. Es notable que no se logre la redispersión con el agregado de surfactante como se observa en el sistema PAA-DTAB o PAA-SDS reportado por Wang et al. [20, 21]; es posible que las interacciones intercadenas que forman los precipitados no sean únicamente puentes hidrógeno entre las cadenas de PAA, sino que la doble cabeza polar y la doble cola del Gemini también sirvan de punto de anclaje entre distintas cadenas, lo que haría que los agregados sean más estables frente a la repulsión electrostática de las micelas asociadas a ellas, como se esquematiza en la Figura 4.19 (c) y (d). En este hecho radica una de las grandes diferencias entre las mezclas con surfactantes monovalentes y con multivalentes.

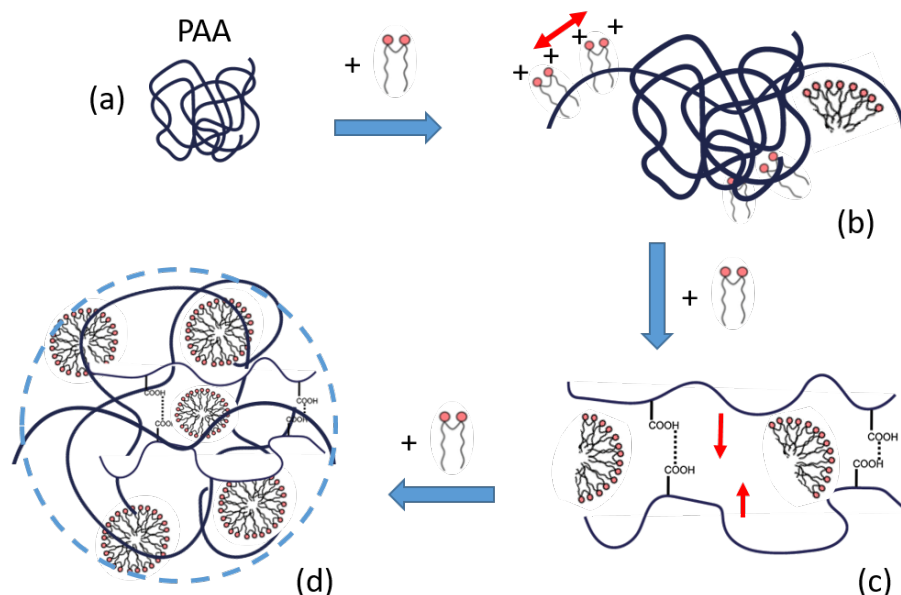


Figura 4.19: Esquema del proceso de complejación del PAA con el Gemini 12-2-12 para el pH de formación 3.2 (a) El PAA se encuentra ovillado para minimizar el contacto con el solvente. A través del progresivo agregado de G12 (b) se produce la interacción por reemplazo iónico en los grupos carboxílicos y por efecto hidrofóbico mediado por las colas alquílicas del G12; provocando la extensión parcial del ovillo. Al continuar agregando G12 (c) la cadena se extiende ampliamente permitiendo la asociación de mayor cantidad de Gemini, y las interacciones intercadena lo que produce la agregación y formación de partículas macroscópicas en suspensión. (d) Al llegar a la CMC del G12, el sistema precipita, dejando el sobrenadante poblado de agregados de complejos monodispersos (línea punteada azul).

Respecto a la movilidad electroforética, por ELS se ha encontrado que las primeras dos regiones (solución homogénea y con agregados macro en suspensión) presentan el mismo potencial ζ , de alrededor de -20 mV y la inversión de signo se observa al medir el sobrenadante de la solución que precipita con 1 mM de G12, obteniéndose un valor de $+38$ mV aproximadamente (ver Figura 4.12). Al analizar la dependencia de las mezclas con el agregado de Gemini por efecto Kerr, se observa que para el pH de formación de 3.2 , el agregado de Gemini hasta $6 \cdot 10^{-2}$ mM, produce un aumento monótono en las señales de birrefringencia, a la vez que deforma la señal respecto de la del polímero libre, como se muestra en la Figura 4.13. Este fenómeno coincide con la interpretación de que el polímero libre a pHs ácidos está en una conformación poco orientable, como la de polímero enrollado [20, 22]. Al unirse surfactante se producen dos fenómenos que desembocan en una mayor birrefringencia: primeramente, las moléculas de Gemini se encuentran más condensadas a la cadena de polímero que los contraiones originales, debido a la ganancia entrópica producida por la liberación de los mismos en el reemplazo

[23]. Esto provoca que la polarización del surfactante a lo largo de la cadena produzca una mayor orientabilidad de las partículas. Y en segundo lugar, el sucesivo agregado y asociación de surfactante al PAA produce, como se ha mencionado, que la cadena de polímero se abra para dar lugar a las moléculas de tensoactivo. Esto provoca que la conformación del polímero cambie de la poco orientable configuración enrollada a una más extendida y por lo tanto, orientable. En conclusión se puede asegurar gracias a esta técnica que el Gemini induce un cambio en las propiedades morfológicas de los complejos a medida que se agrega surfactante al PAA protonado.

Con el objetivo final de obtener partículas responsivas pensando en aplicaciones en nanomedicina, se seleccionaron dos mezclas para analizar su dependencia con el pH, una mezcla de la región homogénea y otra de la precipitada (ver Figura 4.9). La región intermedia no fue considerada por presentar partículas en suspensión, lo que imposibilita la utilización de DLS, ELS y efecto Kerr para una correcta caracterización (ver Figura 4.15(c), correspondiente a una mezcla de 1 mg mL^{-1} PAA + 0.5 mM de G12). Como muestra de la primera región se utilizó una mezcla de 1 mg mL^{-1} PAA + 5.10^{-2} mM G12. Los resultados de DLS en función del pH, que se exhiben en la Figura 4.10(a), muestran que un aumento desde pH 3.2 a 7 provoca la aparición de partículas cada vez más grandes. Entre pH 6 y 8 se observa un aumento abrupto en el diámetro hidrodinámico de los complejos, pasando de 190 nm a más del doble en una zona muy acotada. El tamaño máximo, medido a través del D_h aparente, es de 390 nm aproximadamente obtenido para pH 7.2. Superando el valor de 7.2, el diámetro disminuye y alcanza un valor constante alrededor de 190 nm para pH >7.5 . El sistema no presenta ninguna fase suspendida o precipitada macroscópica. La tendencia observada en el diámetro hidrodinámico de la mezcla respecto al pH se puede explicar considerando el cambio en las interacciones entre los constituyentes debido al aumento del grado de ionización del PAA. Como ya se ha mencionado, a pH ácido 3.2 el Gemini interactúa débilmente, en mayor medida de forma hidrofóbica con el polímero, provocando una expansión de la cadena ovillada mediante la repulsión de las cabezas polares no compensadas electrostáticamente. A medida que el entorno se va haciendo cada vez más básico, la cadena se va extendiendo, permitiendo la incorporación de más Gemini. Además las interacciones hidrofóbicas comienzan a coexistir con las electrostáticas, debidas a la interacción entre la cabezas polares del Gemini y los carboxilatos (COO^-) del PAA. Entre pH 6 y 7 se produce un cambio abrupto en este proceso, observándose un cambio conformacional que provoca el aumento drástico en el tamaño de los complejos. Este proceso se ha reportado como la consolidación de las interacciones electrostáticas, que expanden la cadena por repulsión de los carboxilatos [23]. Posteriormente, para pH 7.5 se observa una compresión abrupta en el diámetro hidrodinámico y la estabilización del tamaño para pHs mayores. Es probable que debido a que las interacciones son mayormente electrostáticas se produzca el autoensamblado de Gemini en micelas empaquetadas, doblando la cadena alrededor de ellas, con la finalidad de no exponer las colas alquílicas al agua. Dicho proceso sería el responsable de la contracción de los complejos para pH 7.5, generando una conformación tipo collar de perlas. Observando el potencial ζ para la mezcla y el polímero libre no presentan diferencias en el rango de

pH de 3.2 a 10. Esto deja en evidencia que el entorno eléctrico del complejo es dictado mayormente por el PAA, pasando progresivamente de -20 mV a -60 mV desde pH 3.2 hasta alcanzar pH neutro y luego se mantiene en este último valor para pH >7.

Al analizar las propiedades electroópticas de esta mezcla se observan ciertas similitudes y diferencias respecto a las que presenta el polímero libre en el rango de pHs estudiado (ver Figuras 4.18(a) y 4.18(b)). En ambos casos, el aumento de pH de 3.2 a 6 produce un aumento monótono en la señal de birrefringencia. A la luz de lo expuesto previamente, es lógico que así suceda ya que las cadenas de PAA sin y con Gemini se expanden con el sucesivo aumento del pH. Al observar la constante de Kerr en función del pH (Fig. 4.16) se nota que ambos sistemas tienen la misma tendencia, alcanzándose un máximo para pH 6. Sin embargo, la mezcla con $5 \cdot 10^{-2}$ mM de G12 siempre presenta un valor mucho mayor respecto al PAA libre. Esta diferencia en la magnitud de la birrefringencia entre el polímero libre y la mezcla para pH <6 se debe principalmente a la presencia de Gemini. La razón de este fenómeno es la misma que el fenómeno observado a pH 3.2 (ver Fig 6.4(b)), haciéndose extensivo hasta pH 6. Las moléculas de Gemini se encuentran condensadas en la cadena polimérica por una combinación de efectos electrostáticos y entrópicos. Entonces, las moléculas condensadas pueden polarizarse sobre la cadena, generando un dipolo inducido en la dirección del campo aplicado; lo que sumándose a la presencia de surfactante modifica la extensión de la cadena en mayor medida que lo que lo hace la repulsión entre los grupos cargados en el polímero sin tensoactivo (para el mismo pH).

Cuando se supera la neutralidad, el comportamiento de la birrefringencia estacionaria de ambas soluciones es muy similar. Se puede observar una transición desde birrefringencia positiva a negativa al pasar un umbral de pH 7.5. Más allá de pH 8, la birrefringencia estacionaria de las mezclas estudiadas presentan la misma intensidad y por lo tanto, el mismo valor para la constante de Kerr como se observa en la Figura 4.16; a diferencia de lo que sucede para valores de pH <7. Se concluye que este comportamiento se debe a la naturaleza del polímero y a su grado de ionización, ya que sucede tanto en mezclas como en el polímero libre.

Respecto a las constantes de Kerr iguales para pH >8, una explicación se encuentra en lo aportado por Noda et. al [24], quienes estudiaron a través de técnicas de microscopía de fluorescencia al PAA libre en función del grado de ionización. Ellos reportaron que a partir de un grado de ionización mayor al 70 % (correspondiente para este sistema a pH 8.2) el PAA se encuentra en su máxima extensión en solución. Esto coincide con lo observado por DLS y Kerr para la mezcla con $5 \cdot 10^{-2}$ mM: el sistema no cambia de conformación una vez superado el umbral de pH 8.

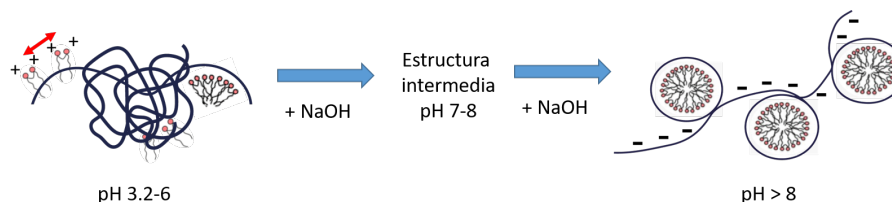


Figura 4.20: Esquema de la responsividad estructural frente al pH para la mezcla 1 mg mL^{-1} PAA + $5 \cdot 10^{-2} \text{ mM}$ G12. Al aumentar el pH desde 3.2 la estructura se estira debido a la repulsión de los grupos carboxilatos del PAA que se ionización progresivamente. Al llegar a pH 7 se produce un cambio conformacional que provoca un aumento drástico en el tamaño. Luego a partir de pH 8, en la configuración de máximo estiramiento del PAA se consolida una estructura que no varía a pesar del aumento del pH. Se conjetura que es tipo collar de perlas.

Al analizarse los regímenes transitorios, se puede observar que la forma de las subidas y las bajadas no son las mismas mientras que para el PAA libre son iguales. Los tiempos de relajación son más largos para la muestra con Gemini, por lo que el mecanismo de orientación se ve ampliamente influenciado por la presencia del surfactante. Si se comparan los coeficientes de difusión rotacional ajustados por el modelo de stretching (ec.4.1), para el PAA libre son mayores que para la mezcla con Gemini, excepto para pH 6 en el que ambos coinciden. La gran diferencia con el polímero libre radica en el coeficiente de estiramiento, ya que para el sistema con Gemini, se obtiene que la molécula es flexible en todo el rango de pH estudiado (ver Figura 4.18). La evolución de las estructuras de los complejos con el pH se esquematiza en la Figura 4.20, la cual condensa las ideas principales de la discusión previa.

Esta mezcla cumple con la mayoría de requisitos para ser un sistema de transporte de fármacos a pesar de ser polidispersa, ya que el perfil de tamaños en función del pH está dentro del rango en el que no se excretan por riñón (mayor a 5 nm) ni son atrapadas por macrófagos (menor a 200 nm); no presenta agregación o precipitado y tiene un cambio conformacional entre pH 6 y 8 debido al cambio en el tipo de interacciones. Esto permitiría encapsular medicamentos hidrofóbicos a pH menor a 6 y liberarlos al pasar a un entorno de pH 8. Asimismo, gracias al Gemini, las partículas son deformables, lo que permite mayor versatilidad para la penetración de barreras biológicas. La carga superficial siempre es negativa, por lo que la carga de fármacos catiónicos (como la Doxorrubicina, ver Capítulo anterior) se ve favorecida.

La otra muestra analizada respecto al pH corresponde a la tercera zona de la Figura 4.9, la mezcla 1 mg mL^{-1} PAA + 1 mM de G12. Como ya se ha mencionado, este sistema presenta una fase precipitada entre pH 3.2 y 7.2. A pH 3.2 el precipitado se separa casi completamente de la fase líquida y a medida que se aumenta el pH de la solución se redispersa progresivamente, hasta pH 7.2 donde se obtiene una fase lechosa,

líquida y homogénea. Es por eso que muchos de los análisis se realizaron en la fase redispersada o del sobrenadante a pH 3.2. Este último presenta un índice de polidispersidad bajo, 0.2 y un diámetro hidrodinámico aparente de alrededor de 190 nm a pH 3.2; el potencial ζ es positivo. En la zona de redispersión (pH >7.2) se obtiene una solución con un PDI bien definido en todo el rango de estudio (0.2) y el diámetro hidrodinámico aumenta desde 300 nm a pH 7.2, alcanzando un máximo de 390 nm entre pH 8.2 y 10, para luego disminuir hasta 150 nm a pH 12.2. Que el máximo de tamaño se alcance para pH 8.2 no es casualidad, ya que para ese pH el grado de ionización es tal que el PAA se encuentra en su máxima extensión [24], propiciando la interacción electrostática de los grupos carboxílicos cargados con las micelas de Gemini. La posterior disminución puede deberse a que el PAA al estar completamente extendido, admite mayor interacción con las micelas de Gemini y la neutralización parcial de la cadena produce una reducción de tamaño. Todo esto en conjunto es indicativo que los complejos presentan una estructura distinta a la de la mezcla con $5 \cdot 10^{-2}$ mM G12. La polidispersidad se mantiene en un valor constante y bajo (<0.2), indicio de que la estructura de los complejos presenta poca variabilidad respecto al pH. Por ELS se ha determinado que los complejos a pH >7.2 nuevamente poseen carga superficial negativa y menor que para los sistemas en la primera región, observándose un valor prácticamente constante y alrededor de -65 mV. Debido a que por efecto Kerr no es conveniente medir soluciones con precipitados o partículas en suspensión, sólo se pudo observar el comportamiento electroóptico a partir de pH 7.2. Entre pH 7.2 y 8 es la zona donde se produce la inversión del signo en la birrefringencia. Se pudo obtener la constante de Kerr únicamente para pH >8, donde se pudo observar que es prácticamente constante y coincide con el valor obtenido para las soluciones con menor cantidad de Gemini para pH >8, como se mencionó en el apartado anterior. Esto indicaría que las propiedades electroópticas de los complejos no varían significativamente al aumentar el grado de ionización en presencia de 1 mM Gemini. Al analizar los transitorios, se observó que se necesitó un único tiempo característico para describir la relajación utilizando exponenciales, sin embargo no se observó diferencia con el pH. Utilizando el modelo de stretching se obtuvieron mejores ajustes y con un significado físico concreto. Como se puede observar en la Figura 4.18(c), antes del umbral de pH 8 el coeficiente β para el sistema indicaba que las partículas eran flexibles y con coeficiente de difusión rotacional bajo (agregados grandes) y con el aumento del pH se rigidizaron y el coeficiente de difusión aumentó levemente. A la vista de esta evidencia, los complejos luego de redispersarse se mantienen formando uniones intercadenas, mediadas electrostáticamente por las micelas. Es posible que para pH 7.2 se tenga un entretrejo de collares de perlas y que a partir de pH 8, la repulsión electrostática entre las cadenas provoque que se separen parcialmente. Esto explicaría flexibilidad de los complejos a pH menor a 8, la rigidez de las partículas resultantes y la disminución en el diámetro hidrodinámico. Con esta evidencia se propone un mecanismo de responsividad frente al pH como se esquematiza en la Figura 4.21

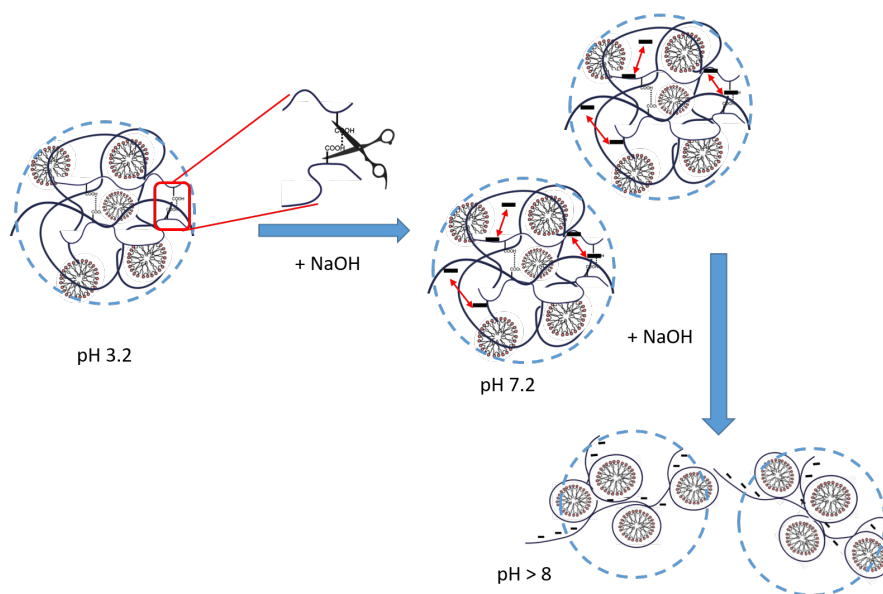


Figura 4.21: Esquema de la responsividad estructural frente al pH para la mezcla 1 mg mL^{-1} PAA + 1 mM G12. A pH 3.2 el sistema se encuentra precipitado. Al aumentar el pH la repulsión entre las cadenas provoca la ruptura de las uniones más débiles como los puentes de hidrógeno intercadenas. Al llegar a pH 7.2 el sistema se redispersa, obteniéndose agregados de tamaño definido y baja polidispersidad. Al continuar aumentando el pH a partir de 8 el sistema comienza a disminuir su tamaño progresivamente. Es posible que se separen los agregados en otros más pequeños también monodispersos, por la repulsión de los grupos cargados del PAA.

En esta mezcla, los complejos son más rígidos y el rango de acción es limitado ya que la solución es homogénea a partir de pH 7.2. A pesar de ser mucho más monodispersa, los valores de diámetro hidrodinámico son muy altos ($>200 \text{ nm}$) y una aplicación intravenosa activaría los mecanismos de defensa y excreción del cuerpo. A su vez, si llegase a encontrarse en un ambiente más ácido que el pH fisiológico (7.35-7.45), la solución comenzaría a formar complejos y precipitar, impidiendo su circulación correcta. Como perspectiva a futuro, podría analizarse el comportamiento del sobrenadante de la solución obtenido a pH 3.2 en función del pH, ya que presenta un tamaño aceptable y a diferencia de las demás soluciones, carga superficial positiva.

Respecto a la birrefringencia negativa del PAA para pHs básicos, en otros sistemas de polielectrolitos, se ubica su origen en la polarización óptica intrínseca del polímero. Un ejemplo de este fenómeno es el caso del ADN, ya que debido a la estructura helicoidal compuesta por un apilamiento de bases nitrogenadas, la polarización óptica y la eléctrica son perpendiculares entre sí y la birrefringencia es negativa (se

explicará en mayor profundidad en el Capítulo 6). Sin embargo, esto no aplica para el PAA, justamente por ser un polímero lineal que no presenta ninguna particularidad en su estructura. Otra explicación para el origen de este cambio en el signo de la birrefringencia proviene de la teoría de Manning [25, 26]. La teoría explica a la birrefringencia negativa como un efecto debido a la polarización de los contraiones libres, los cuales polarizan en dirección perpendicular al eje principal de la cadena y tienden a orientar a la molécula en dicha dirección. De forma contraria, los contraiones condensados sólo pueden polarizarse en la dirección de la cadena, tendiendo a orientarla en dirección al campo. Es posible que al dominar la interacción electrostática a partir de pH 7-8, los contraiones en el caso del PAA libre y el Gemini en las mezclas, se encuentren condensados tan fuertemente a la cadena que no se desplacen de sus posiciones. Consecuentemente no generarían una polarización en la dirección paralela al campo y, por lo tanto, solo existiría la polarización perpendicular de los contraiones libres. Esto resultaría en que la orientación de la cadena sea en esa dirección y la birrefringencia, negativa. Esto no deja de ser una conjetura que coincide con lo observado en los datos; faltarían realizar mediciones termodinámicas o de electrodo selectivo para evaluar el proceso de condensación.

4.5. Conclusiones

Se ha estudiado en superficie y en volumen el proceso de complejación del ácido poliacrílico y el surfactante no comercial Gemini 12-2-12 en función del pH para la obtención de sistemas responsivos. Se ha observado que este sistema en superficie se asocia a una muy baja concentración de los componentes, siendo económico y ecológico para las posibles aplicaciones industriales y de reducida citotóxicidad en aplicaciones biomédicas. Se ha demostrado a través de la tensión superficial dinámica, la reología superficial y la reflectometría de rayos X que el sistema en superficie presenta una respuesta frente al pH y que los mecanismos que subyacen a la misma son enteramente debidos a la dinámica interfacial. A partir de esto, es posible formular sistemas como espumas responsivas para aplicaciones tópicas o industriales, ya que la estabilidad y tensión superficial de los films resultantes pueden ser modificadas tras el agregado de ácidos o bases de forma cíclica.

Con respecto a los complejos en volumen, se pudieron determinar los mecanismos de complejación para una solución de 1 mg.mL^{-1} de PAA en función de la concentración de Gemini al pH de formación (3.2). Se pudo determinar que en esta zona, la interacción se da por efectos hidrofóbicos mayormente, al igual que lo observado en superficie. Por DLS y efecto Kerr se pudo seguir el cambio conformacional progresivo de los complejos a medida que se agrega surfactante. Asimismo, se observó que el sistema no produce redispersión al aumentar la concentración de Gemini, como si se observa con el mismo polímero con DTAB, sugiriendo una mayor estabilidad de los precipitados frente a la repulsión electrostática de las moléculas de surfactante asociadas al polímero.

Finalmente se evaluaron dos mezclas con potencial para sistemas de transporte

de fármacos, la primera compuesta de 1 mg mL^{-1} PAA + $5 \times 10^{-2} \text{ mM}$ de G12, obteniéndose una solución con partículas polidispersas cuyo tamaño medio varía desde 50 nm aproximadamente para pH 3.2 hasta 200 nm para pH 6.2. Luego, desde pH 8 en adelante se mantiene alrededor de 200 nm. Las partículas presentan carga negativa y pueden ser utilizadas para el transporte de fármacos anfifílicos o hidrofóbicos para pH <6 o catiónicos para pH >6 . La segunda muestra, una mezcla de 1 mg mL^{-1} PAA + 1 mM de G12, no cumplió los requerimientos básicos para ser utilizado como sistema de transporte de fármacos, pero se deja la cuestión abierta para el estudio del sobrenadante de la solución precipitada a esta composición y a pH 3.2.

Bibliografía

- [1] Lennart Piculell. Understanding and exploiting the phase behavior of mixtures of oppositely charged polymers and surfactants in water. *Langmuir*, 29(33):10313–10329, 2013.
- [2] Eduardo Guzmán, Sara Llamas, Armando Maestro, Laura Fernández-Peña, Andrew Akanno, Reinhard Miller, Francisco Ortega, and Ramón G Rubio. Polymer–surfactant systems in bulk and at fluid interfaces. *Advances in colloid and interface science*, 233:38–64, 2016.
- [3] Nora Kristen-Hochrein, André Laschewsky, Reinhard Miller, and Regine von Klitzing. Stability of foam films of oppositely charged polyelectrolyte/surfactant mixtures: effect of isoelectric point. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(49):14475–14483, 2011.
- [4] CD Bain, Per M Claesson, D Langevin, R Meszaros, Tommy Nylander, C Stubenrauch, S Titmuss, and R Von Klitzing. Complexes of surfactants with oppositely charged polymers at surfaces and in bulk. *Advances in Colloid and Interface Science*, 155(1-2):32–49, 2010.
- [5] M.M. Soledad Lencina, Eugenio Fernández Miconi, Marcos D. Fernández Leyes, Claudia Domínguez, Ezequiel Cuenca, and Hernán A. Ritacco. Effect of surfactant concentration on the responsiveness of a thermoresponsive copolymer/surfactant mixture with potential application on “smart” foams formulations. *Journal of Colloid and Interface Science*, 512:455–465, 2018.
- [6] Mohit Kumar, Anil Thakur, Uttam Kumar Mandal, Ashish Thakur, and Amit Bhatia. Foam-based drug delivery: A newer approach for pharmaceutical dosage form. *AAPS PharmSciTech*, 23(7):1–13, 2022.
- [7] Dagmara Hoc and Dorota Haznar-Garbacz. Foams as unique drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 167:73–82, 2021.
- [8] Anne-Laure Fameau, Adrian Carl, Arnaud Saint-Jalmes, and Regine von Klitzing. Responsive aqueous foams. *ChemPhysChem*, 16(1):66–75, 2015.

- [9] Anne-Laure Fameau and Syuji Fujii. Stimuli-responsive liquid foams: From design to applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 50:101380, 2020. Thin Liquid Films and Foams.
- [10] Syuji Fujii and Yoshinobu Nakamura. Stimuli-responsive bubbles and foams stabilized with solid particles. *Langmuir*, 33(30):7365–7379, 2017. PMID: 28478676.
- [11] Raoul Zana, M Benrraou, and R Rueff. Alkanediyl-. alpha.,. omega.-bis (dimethylalkylammonium bromide) surfactants. 1. effect of the spacer chain length on the critical micelle concentration and micelle ionization degree. *Langmuir*, 7(6):1072–1075, 1991.
- [12] V Degiorgio, F Mantegazza, and R Piazza. Transient electric birefringence measurement of the persistence length of sodium polystyrene sulfonate. *Europhysics Letters*, 15(1):75, 1991.
- [13] Charles Tanford. *The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes 2d ed.* J. Wiley., 1980.
- [14] Jacob N Israelachvili. *Intermolecular and surface forces.* Academic press, 2011.
- [15] Dominique Langevin. Bubble coalescence in pure liquids and in surfactant solutions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 20(2):92–97, 2015.
- [16] D Langevin. Influence of interfacial rheology on foam and emulsion properties. *Advances in colloid and interface science*, 88(1-2):209–222, 2000.
- [17] Hernán Martinelli, Claudia Domínguez, Marcos Fernández Leyes, Sergio Moya, and Hernán Ritacco. A ph-responsive foam formulated with paa/gemini 12-2-12 complexes. *Colloids and Interfaces*, 5(3):37, 2021.
- [18] D Langevin. Polyelectrolyte and surfactant mixed solutions. behavior at surfaces and in thin films. *Advances in Colloid and Interface Science*, 89:467–484, 2001.
- [19] Hernán A Ritacco and Jorge Busch. Dynamic surface tension of polyelectrolyte/surfactant systems with opposite charges: Two states for the surfactant at the interface. *Langmuir*, 20(9):3648–3656, 2004.
- [20] C Wang and KC Tam. Interaction between polyelectrolyte and oppositely charged surfactant: effect of charge density. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(26):8976–8982, 2004.
- [21] C Wang and KC Tam. Interactions between poly (acrylic acid) and sodium dodecyl sulfate: isothermal titration calorimetric and surfactant ion-selective electrode studies. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(11):5156–5161, 2005.
- [22] H. Hoffmann and Dieter Gräbner. Electric birefringence anomaly of solutions of

- ionically charged anisometric particles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 216:20–35, 2015.
- [23] Nasreen Khan and Blair Brettmann. Intermolecular interactions in polyelectrolyte and surfactant complexes in solution. *Polymers*, 11(1):51, 2018.
- [24] Ichiro Noda, Takeaki Tsuge, and Mitsuru Nagasawa. The intrinsic viscosity of polyelectrolytes. *The Journal of Physical Chemistry*, 74(4):710–719, 1970.
- [25] Gerald S Manning and Jolly Ray. Counterion condensation revisited. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 16(2):461–476, 1998.
- [26] GS Manning. Transverse polarizability of an aligned assembly of charged rods. *The European Physical Journal E*, 30(4):411–415, 2009.

Capítulo 5

Autoensamblado, termodinámica y estabilidad de nanopartículas poliaminas (PANs)

5.1. Introducción

Las poliaminas son moléculas policatiónicas que están presentes en los organismos y son necesarias para el crecimiento a nivel celular. Las células que se dividen rápidamente necesitan grandes cantidades de poliaminas para crecer [1]. Estas pueden ser biosintetizadas internamente y también importadas de fuentes exógenas [1–4]. Se cree que las limitaciones en la producción de poliaminas intracelulares en las células de rápida proliferación se compensan parcialmente con la captación de poliaminas de fuentes extracelulares [3]. De hecho, se ha demostrado que muchos tipos de tumores contienen niveles elevados de poliaminas y un transportador activo de poliaminas (PAT) para importar poliaminas exógenas; entre ellos neuroblastomas, melanomas y la leucemia linfocítica humana [3]. Debido a la mayor necesidad de las células tumorales de estos factores de crecimiento y que existe un sistema de transporte activo para su importación (PAT), los sistemas conjugados basados en poliaminas pueden utilizarse como DDS para diagnóstico y/o tratamiento de los mismos [5].

Una manera de formar nanotransportadores es utilizar complejos de poliaminas como el PAH, ya utilizado en el Capítulo 3 para el ensamblado de multicapas, con sales de fosfato. Esto se debe a que las poliaminas interactúan con los iones fosfato electrostáticamente y a través de puentes de hidrógeno[6] formando estructuras supramoleculares[7], donde los iones forman uniones con diferentes cadenas de poliaminas a la vez[8, 9]. Mediante el ensamblado de poliaminas y fosfatos inorgánicos [10] se pueden fabricar de forma muy simple partículas coloidales[11, 12] y films delgados[13, 14]. Estos complejos se han utilizados ampliamente para cargar ácidos nucleicos y utilizar-

los en terapia génica. En un artículo reciente, se ha explorado el uso de nanopartículas de fosfato de poliamina (PANs) para el transporte de RNA silenciador (siRNA). Estas nanopartículas (NPs) fueron fabricadas con hidrocloreto de polialilamina (PAH) y buffer fosfato (PB) preparado a un radio molar de 5:2 de Na_2HPO_4 y KH_2PO_4 [15]. Las PANs resultantes son estables en un rango de pH de 6 a 8 y fuera de él se desensamblan. Esta estrecha ventana de estabilidad se puede explicar por la sensibilidad de las aminas del PAH y los iones fosfato al pH. En entornos ácidos, los iones fosfato pierden su carga y la interacción con las aminas se vuelve nula. En el otro extremo, en un entorno básico, las PANs se desensamblan debido a que las aminas del PAH se deprotonan. Esta característica de las PANs podría ser utilizada para transporte endosomal ya que las NPs se desacoplarían al pH del entorno (pH 5.5) y liberaría la carga encapsulada. La mayoría de los estudios relacionados con las PANs han usado o PB o la sal Na_2HPO_4 para la fabricación de nanopartículas. Sin embargo, existen una amplia cantidad de moléculas de fosfato con más de un grupo fosfato, incluyendo cadenas lineales o cíclicas, las cuales podrían ser utilizadas para la formación de partículas. Los polifosfatos han tenido un rol biológico importante actuando como procoagulante en el cuerpo humano ($NaPO_3$)_n, donde n es mayor o igual a 60[16]. Asimismo, los polifosfatos también actúan como agentes quelantes ¹ para el calcio [17], siendo de vital importancia para el metabolismo celular. Los polifosfatos usualmente tienen valores de *pK* menores a los de Na_2HPO_4 y KH_2PO_4 y pueden retener sus cargas a pH donde la sal de monofosfato no se encuentra cargada. También es probable que haya mayor cantidad de grupos amina interactuando por ión de fosfato que la cantidad que hay por monofosfato, lo que podría impactar en la cantidad mínima necesaria de iones de fosfato para lograr la formación de PANs y en la estabilidad global de la solución.

Motivados por el interés de diseñar PANs con propiedades novedosas, se han preparado complejos de PAH con cinco diferentes sales de fosfato: sal de monofosfato Na_3PO_4 , difosfato $Na_4P_2O_7$, trifosfato lineal $Na_5P_3O_{10}$, hexafosfato cíclico $Na_6P_6O_{18}$ y sal de Graham ($NaPO_3$)₂₆, un polifosfato de cadena lineal y larga. Se ha estudiado la formación de nanopartículas y la estabilidad de las mismas en el tiempo y frente a cambios de pH por diversas técnicas. La descripción de las mediciones, los resultados y el análisis de los mismos se muestran a continuación.

5.2. Materiales y metodología

5.2.1. Materiales

Los compuestos sal de poli(alilamina hidrocloreto) (PAH) (MW: 1,5,10⁴ g/mol), fosfato de trisodio (Na_3PO_4), pirofosfato de tetrasodio ($Na_4P_2O_7$), tripolifosfato de sodio ($Na_5P_3O_{10}$), trimetafosfato de sodio ($Na_6P_6O_{18}$), sal de Graham ($NaPO_3$)₂₆, ácido clorhídrico (HCl), hidróxido de sodio (NaOH) y cloruro de sodio (NaCl) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich con pureza > 99 % y utilizados sin ninguna purificación

¹Los agentes quelantes capturan o secuestran iones metálicos para formar complejos, los cuales se mantienen solubles e inoivos

adicional. Las grillas de cobre recubiertas de carbono y molibdato de amonio para los experimentos de TEM, fueron adquiridos en Electron Microscopy Sciences (USA). El agua utilizada en todos los experimentos fue agua MilliQ ultrapura.

5.2.2. Preparación de nanopartículas de fosfato de poliaminas (PANs)

Las PANs fueron preparadas mezclando una solución stock de 100 mg/ml PAH ($6,7,10^{-3}$ M) en solución fosfato hasta una concentración de final de PAH de 1 mg/ml ($6,7,10^{-5}$ M) Todas las muestras se prepararon a temperatura ambiente y se dejaron equilibrar por 10 minutos antes de ser analizadas. El agregado de PAH a la solución de fosfato resulta rápidamente en la formación de PANs. La responsividad frente al pH de las PANs fue estudiada agregando cantidades diferentes de 2 M HCl (o 2 M NaOH) a las soluciones de nanopartículas y dejando equilibrar por 5 minutos antes de las mediciones.

El cociente de cargas molar R entre las sales de fosfato y el PAH se expresa de la siguiente forma [18]:

$$R = \frac{[anion]|Z^-|}{([PAH]|Z^+|)} \quad (5.1)$$

donde $|Z^-|$ indica el número de cargas negativas por molécula aniónica, y $|Z^+|$ indica el número de cargas positivas por molécula de PAH (alrededor de 160 cargas positivas). Ambos $|Z^+|$ y $|Z^-|$ varían con el pH y $|Z^-|$ varía dependiendo del ion fosfato utilizado. Sin embargo, asumimos que el PAH estará totalmente protonado en las condiciones utilizadas y que los iones fosfatos presentan su máxima carga para la preparación de PANs

5.2.3. Medidas de dispersión de luz dinámica (DLS) y movilidad electroforética

Las mediciones de DLS fueron realizadas en un Zetasizer Nano ZS de Malvern utilizando cubetas descartables de semi-micro PMMA a ángulo fijo de 173° (modo backscattering) con selección automática de la posición del laser y la atenuación. Se llevaron a cabo mediciones cortas de 15 corridas de 5 segundos cada una para un total de 10 minutos, con 5 mediciones consecutivas para cada muestra. De las funciones de autocorrelación obtenidas, se obtuvo el diámetro hidrodinámico (D_h) [19] como se mencionó en el Capítulo 2. La concentración de PAH y sales de fosfato utilizadas fueron lo suficientemente diluidas como para asegurar que las interacciones interpartículas entre las PANs fueran despreciables, lo cual fue verificado midiendo el diámetro hidrodinámico después de una dilución 1:10 de las PANs, obteniéndose los mismos valores de D_h [19]. Se utilizó el análisis de cumulantes (ec. 2.32) para extraer el coeficiente de difusión z-average y el índice de polidispersidad PDI de la función de autocorrelación. La estabilidad de las PANs se evaluó midiendo con DLS diferentes preparaciones de NP a lo largo de 24 hs. El rango de estabilidad de pH de las PANs se obtuvo agregando unos pocos microlitros

de solución de HCl a 2 M para $\text{pH} < 7$ o de NaOH a 2 M para $\text{pH} > 7$. Se utilizó un volumen de 10 ml de PANs para cada sal de fosfato estudiada así el efecto de la dilución debido al agregado de las pequeñas cantidades de ácido o hidróxido fuera despreciable. Todos los experimentos se realizaron a 25 °C.

La movilidad electroforética de las PANs se midió en presencia de 10 mM NaCl. Las mediciones se realizaron con el Zetasizer Nano, en modo automático a 25 °C, con 5 medidas consecutivas para cada muestra. Tanto la tensión como la atenuación fueron seleccionadas por el software de forma automática.

5.2.4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las muestras se prepararon sobre films recubiertos de carbono, normales y ultrafinos. 2 μL de soluciones de PAN estables preparadas con 4 mM, 1.5 mM, 2 mM, 0.5 mM and 0.1 mM de Na_3PO_4 , $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$, $\text{Na}_6\text{P}_6\text{O}_{18}$, and $(\text{NaPO}_3)_{26}$ en las condiciones descritas anteriormente se transfirieron a las rejillas recubiertas de carbono. Las muestras se dejaron reposar en las rejillas por un minuto, luego se lavaron con agua MilliQ y finalmente se incubaron con 3 μL de molibdato de amonio a concentración de 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ por un minuto y lavado dos veces con agua Nanopure MilliQ.

5.2.5. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)

Los experimentos calorimétricos se realizaron con un MicroCalorimeter VP-ITC. Los experimentos se realizaron a 24 °C bajo continua agitación de la muestra en la celda a 307 rpm. 1.456 ml de 1 mg/ml de solución de PAH se tituló con una solución stock de polifosfatos. La concentración de las sales de fosfato se seleccionó para cubrir el rango de concentración en el cual las PANs se forman. Previo al experimento, el pH de la solución se fijó en 7 añadiendo una pequeña cantidad de 2 M NaOH, excepto para Na_3PO_4 para el cual se fijó en 8,1, ya que $\text{pH} = 7$ no está dentro de la ventana de estabilidad de las PANs formadas con esta sal. El agregado de solución de fosfato se detuvo antes de alcanzar la concentración a la cual las PANs precipitan. La titulación consistió en 31 inyecciones, la primera de 2 μL (descartada), y las siguientes de 4 μL a intervalos de 600 segundos. Los datos fueron corregidos teniendo en cuenta el calor de dilución de cada solución de fosfato. Los datos crudos se reportan como función de la concentración de polifosfato como del cociente de cargas R (ec. 5.1)

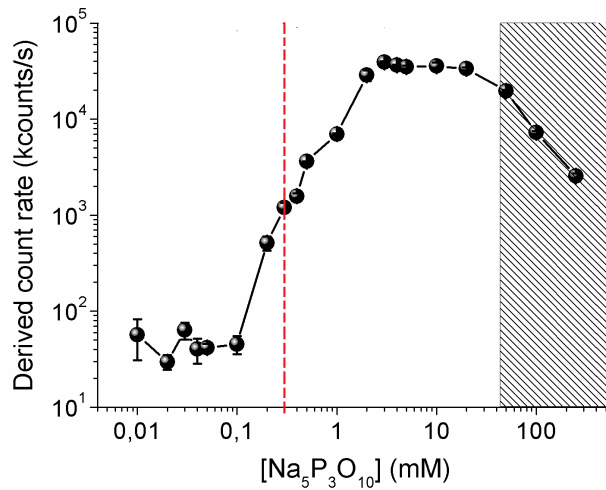
5.3. Formación de PANs y morfología

Las soluciones de PANs se prepararon mezclando soluciones de PAH y las sales de fosfato como se describió previamente[20, 21]. Las sales de fosfato elegidas permitieron estudiar el rol del número de grupos fosfato y de cargas en la formación de las PANs, comenzando con una sal con un único grupo fosfato y llegando a la sal de Graham con 26 grupos fosfato. La concentración de sal necesaria para inducir la formación de PAN se determinó de dos formas. La primera observando el cambio en la función de autocorrelación obtenida por DLS a medida que se titulaba la solución de PAH con cada

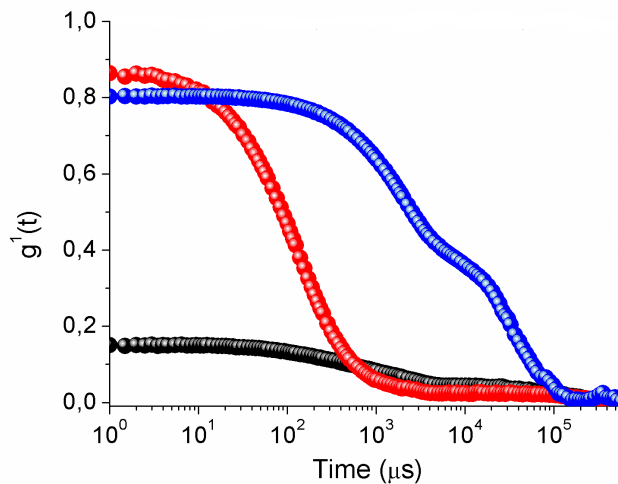
sal de fosfato. La segunda, midiendo el incremento en la intensidad de luz dispersada por las soluciones tituladas con cada sal de fosfato. Para ello se obtuvo de las mediciones la cantidad de cuentas de luz por segundo detectadas (derived count rate, kcounts/s), definida como la cantidad de kilocuentas que llegan al detector corregido por un factor de atenuación. Este factor es ajustado automáticamente por el software del instrumento para asegurar que la intensidad de dispersión se mantiene dentro del rango óptimo del detector fotodiodo de avalancha (APD) [22]. De esta forma se aprovecha el hecho de que la intensidad de luz dispersada es proporcional al cubo del volumen, por lo que se pueden distinguir con precisión los cambios conformacionales del sistema, ya que una partícula un orden de magnitud más grande que otra dispersará 10^6 veces más luz (por dispersión de Rayleigh).

En general, para la mayoría de los sistemas estudiados, se observa el mismo comportamiento en la formación de PANs para soluciones con $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de PAH en presencia de sales de fosfato. Para ejemplificar se tomará el caso de la mezcla de PAH con $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$, la cual cuenta con 5 cargas negativas por molécula. Para determinar la formación de las PANs, en la Figura 5.1(a) se observa que la luz dispersada por la solución aumenta de 60 a 70000 kcounts/s a medida que la concentración de $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ pasa de 0.1 mM a 50 mM. La formación de PANs se observa para 0.3 mM de $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ como se evidencia por el cambio en la función de autocorrelación (5.1(b)b), donde la curva correspondiente a 0.2 mM (curva negra), muestra una autocorrelación similar a la que corresponde al polímero libre mientras que la correspondiente a 0.3 mM (curva roja) presenta una autocorrelación bien definida de la cual el D_h se puede extraer con certeza. Esta concentración será llamada, *concentración de formación* y se encuentra marcada con una línea roja punteada en la Figura 5.1(a). Sin embargo, a esta concentración la solución presenta un alto índice de polidispersidad $\text{PDI} > 0.3$, indicativo de que las nanopartículas no se encuentran homogéneamente formadas. A 50 mM de $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ los complejos de fosfato de poliamina comienzan a precipitar resultando en una fase que puede observarse a simple vista. A esta concentración, la curva de autocorrelación (azul) por DLS que se exhibe en la Figura 5.1(b) presenta tiempos de correlación largos con múltiples tiempos de decaimiento característicos, probablemente debido a los distintos tamaños de las partículas que se agregan y precipitan.

Para los siguientes experimentos, se determinó una concentración óptima de trabajo para cada sal de fosfato en base al análisis de DLS e intensidad de luz. Para ello se buscó un compromiso entre la menor concentración de sal necesaria para la formación de las PANs, el menor índice de polidispersidad y la mayor dispersión de luz. Para las PANs formadas con $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$, la concentración óptima corresponde a 2 mM.



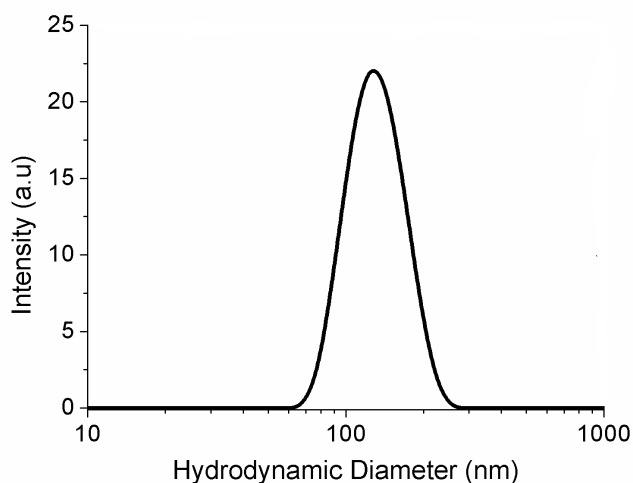
(a) Cuentas de luz por segundo detectadas (kcounts/s) para mezclas de PAH vs concentraciones de $Na_5P_3O_{10}$. La zona sombreada indica el inicio de la zona de precipitado.



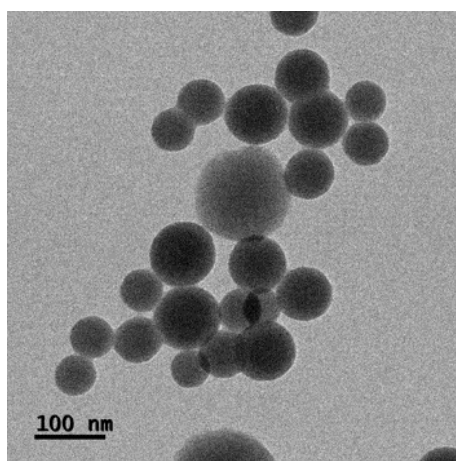
(b) Funciones de autocorrelación de soluciones de PAH con (negro) 0.2 mM (rojo) 0.3 mM and (azul) 50 mM $Na_5P_3O_{10}$.

Figura 5.1: Datos obtenidos por DLS para el sistema PAH + $Na_5P_3O_{10}$ a distintas concentraciones.

A esta concentración, el coeficiente de difusión de las PANs es $3.93 \pm 0.02 \mu m^2 \cdot s^{-1}$ y se corresponde a un D_h de 125 ± 1 nm (Figura 5.2(a)) con un PDI = $0,08 \pm 0.03$. Las imágenes TEM corroboran estos resultados, observándose NPs esféricas (Figura 5.2(b)). El tamaño promedio de las PANs medido por TEM es de 86 ± 36 nm.



(a) Diámetro hidrodinámico de PANs fabricadas con PAH y 2 mM $Na_5P_3O_{10}$

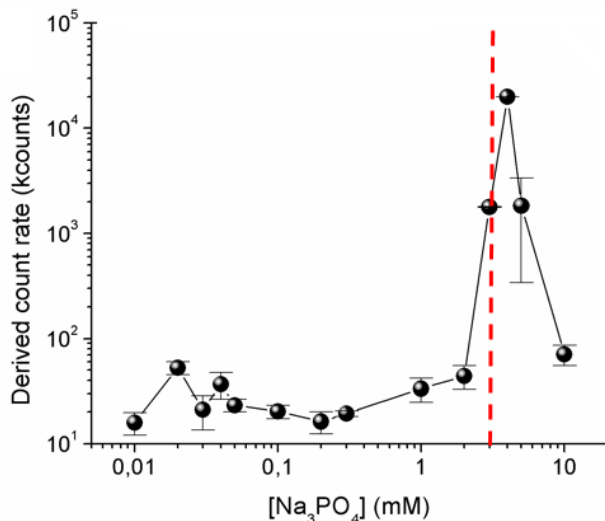


(b) Imagen TEM para el mismo sistema PAH - 2 mM $Na_5P_3O_{10}$.

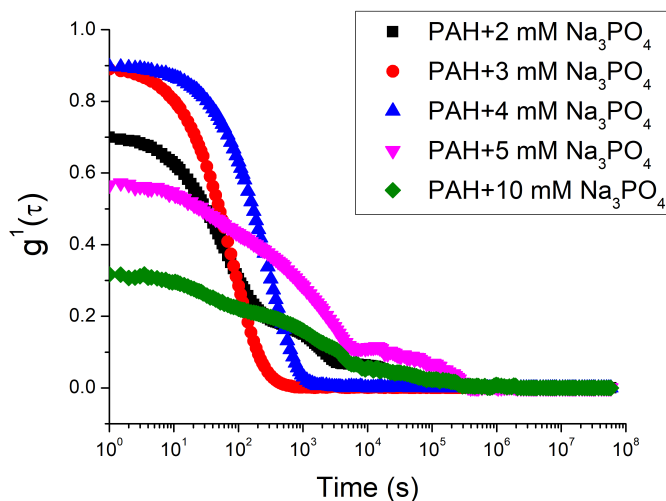
Figura 5.2: Datos obtenidos por DLS y TEM para el sistema PAH + 2 mM $Na_5P_3O_{10}$.

Las curvas de intensidad de luz dispersada en función de la concentración para los demás polifosfatos estudiados presentaron características similares a las de la Figura 5.1(a) correspondiente a $Na_5P_3O_{10}$, mostrando un incremento en las kilocuentas por segundo con el incremento de la concentración de fosfatos (ver Anexo, Figuras C.1(a) C.1(b) C.1(c)). Para todos los polifosfatos estudiados, las PANs comienzan a precipitar en una fase sólida, observable a simple vista, una vez que se alcanza cierta concentración crítica de polifosfato. Maechling et al.[23] ya han reportado la precipitación de PAH inducido por $Na_6P_6O_{18}$. En un trabajo previo sobre formación de PAN con buffer fosfato no se observaron precipitados en el rango de estudio [24]. La ausencia de precipitados

en este último caso pudo deberse a que la concentración de sales de monofosfato que se necesitaban para inducir precipitación era muy alta y no se alcanzó ese valor en los experimentos.



(a) Tasa de cuentas (kcounts/s) para mezclas de PAH con Na_3PO_4 , en función de la concentración de fosfato



(b) Función de autocorrelación para mezclas de PAH de 2 mM a 10 mM de monofosfato

Figura 5.3: Datos obtenidos por dispersión de luz para el sistema PAH + Na_3PO_4

El único caso a destacar, diferente a los demás, corresponde a la mezcla de PAH con el monofosfato Na_3PO_4 . En la Figura 5.3(a) donde se representa intensidad

vs. concentración, se observa la particularidad de que frente al aumento de la cantidad de monofosfato en la solución la intensidad de luz dispersada permanece constante hasta 3 mM de Na_3PO_4 , donde se observa un incremento abrupto de las cuentas. Sin embargo, a diferencia de los demás sistemas, un aumento de la concentración de Na_3PO_4 por encima de 5 mM produce una marcada disminución de las mismas. A su vez si se observa la función de autocorrelación en la Figura 5.3(b) se puede notar que la aparición de autocorrelación se produce solo para las concentraciones 3 mM y 4 mM; a mayor y menor concentración la función de autocorrelación es similar a la del PAH libre en solución. Con esto se puede asegurar que las PANs sólo se forman para un rango estrecho de concentraciones si se utiliza monofosfato.

Este comportamiento peculiar puede explicarse por la fuerte alcalinidad de las soluciones de Na_3PO_4 . Las sales de fosfato pueden actuar como bases débiles sustrayendo protones del medio [25], por lo tanto un aumento en la concentración de Na_3PO_4 probablemente provoque la desprotonación de los grupos amina en el polímero. A valores por encima de la concentración crítica para la formación de NPs, la solución es lo suficientemente alcalina ($pH = 9.17$) debido al alto pK_a del Na_3PO_4 [26] como para desprotonar el PAH obstaculizando la formación de las partículas.

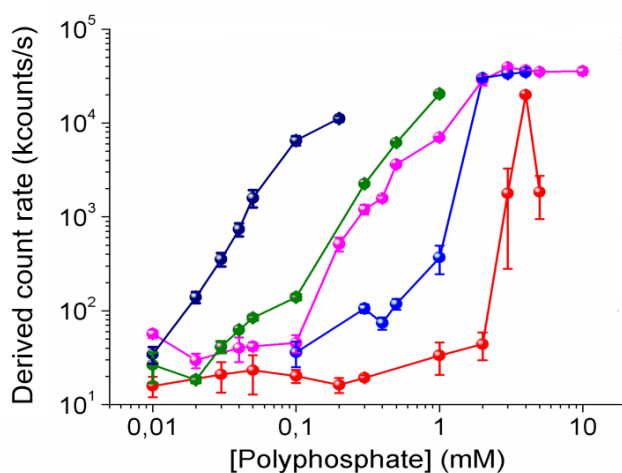


Figura 5.4: Resumen de las variaciones de la tasa de cuentas de luz medidas para los distintos sistemas PAH/fosfato estudiados en función de la concentración de fosfato: (●) Na_3PO_4 , (●) $Na_4P_2O_7$, (●) $Na_5P_3O_{10}$, (●) $Na_6P_6O_{18}$, (●) $(NPO_3)_{26}$

Para comparar, todas las curvas de intensidad de luz dispersada vs. concentración de las distintas sales de fosfato se graficaron juntas en la Figura 5.4. Todas las curvas se graficaron hasta la concentración crítica de precipitación. En todos los casos, se encontró un aumento en la tasa de cuentas a medida que aumenta la concentración de la sal de fosfato. Particularmente, cuando se aumenta la concentración de $Na_4P_2O_7$ y $Na_5P_3O_{10}$ más allá de 1 mM (Figuras C.1(a) y 5.2(a)), se observa un pequeño pla-

teau en las cuentas previo a la zona de precipitación. Esto puede ser indicio de que el agregado por encima de 1 mM de dichos fosfatos no induce mayor formación de NPs. El análisis de las funciones de autocorrelación muestra una clara diferencia entre las concentraciones de sal de fosfato para las cuales el polímero se encuentra libre en solución y las correspondientes concentraciones para las cuales las PANs se encuentran formadas. En la Figura 5.4 se puede observar que a mayor número de cargas en el polifosfato menor es la concentración necesaria del mismo para la formación de PANs. De hecho, los polifosfatos producen NPs a concentraciones 5 veces menores que el monofosfato. La formación de PAN con polifosfatos puede ser el resultado de la asociación de múltiples aminas de diferentes cadenas de PAH, unidas por un único ión de polifosfato. Por otro lado para monofosfatos un número mayor de iones sería necesario para lograr uniones intercadenas.

En la Figura 5.5 se condensan los resultados obtenidos para todas las soluciones de PAH con cada sal de fosfato. Se informan tanto la concentración de formación y la óptima que se utilizará en las mediciones posteriores. Se puede observar que la cantidad de fosfato necesaria para inducir la formación de las PANs disminuye con el número de grupos fosfatos de la sal pasando de 3 mM para Na_3PO_4 a 0.02 mM para $(NPO_3)_{26}$ (5.5).

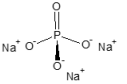
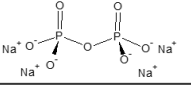
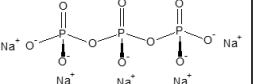
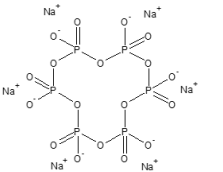
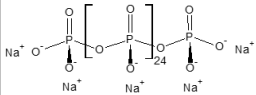
Molecular structure	Molecular formula	Optimal concentration (mM)	D_h (nm)	PDI	ζ potential (mV)
	Na_3PO_4	4	123 ± 2	0.06 ± 0.02	24 ± 2
	$Na_4P_2O_7$	2	128 ± 2	0.03 ± 0.02	-10 ± 3
	$Na_5P_3O_{10}$	2	125 ± 1	0.08 ± 0.03	-6 ± 2
	$Na_6P_6O_{18}$	1	113 ± 6	0.22 ± 0.01	80 ± 2
	$(NPO_3)_{26}$	0.2	136 ± 5	0.24 ± 0.03	75 ± 3

Figura 5.5: Resumen de las propiedades de los fosfatos y las PANs correspondientes.

Como se ha mencionado para el caso de $Na_5P_3O_{10}$, se ha definido una concentración óptima como aquella concentración de polifosfatos que induce la formación de PANs, tiene bajo índice de polidispersidad ($PDI < 0.2$) y el mayor valor de tasa de cuentas derivada. La concentración óptima de fosfato tiene valores máximos y mínimos

de 4 mM para Na_3PO_4 y 0.2 mM para $(NaPO_3)_{26}$ con 1 mg/mL PAH, respectivamente. A estas concentraciones el diámetro hidrodinámico obtenido resultó de $D_h = 125 \pm 8$ nm, independientemente del fosfato utilizado. Este resultado apoya la hipótesis de que es necesaria una menor concentración de las moléculas de polifosfatos con mayor cantidad de sitios de unión para formar PANs de tamaños similares. Las imágenes de TEM (Fig. C.2) muestran nanopartículas esféricas y confirman el tamaño obtenido por DLS. Se han repetido mediciones de DLS 24 horas después de la preparación de las muestras para evaluar la estabilidad de las mismas en el tiempo, encontrándose que el tamaño y el PDI de las nanopartículas fue constante durante el período de evaluación para los fosfatos estudiados, a excepción del trifosfato; y no se ha observado la presencia de precipitados (Figures 5.6(a), 5.6(b), 5.6(c)).

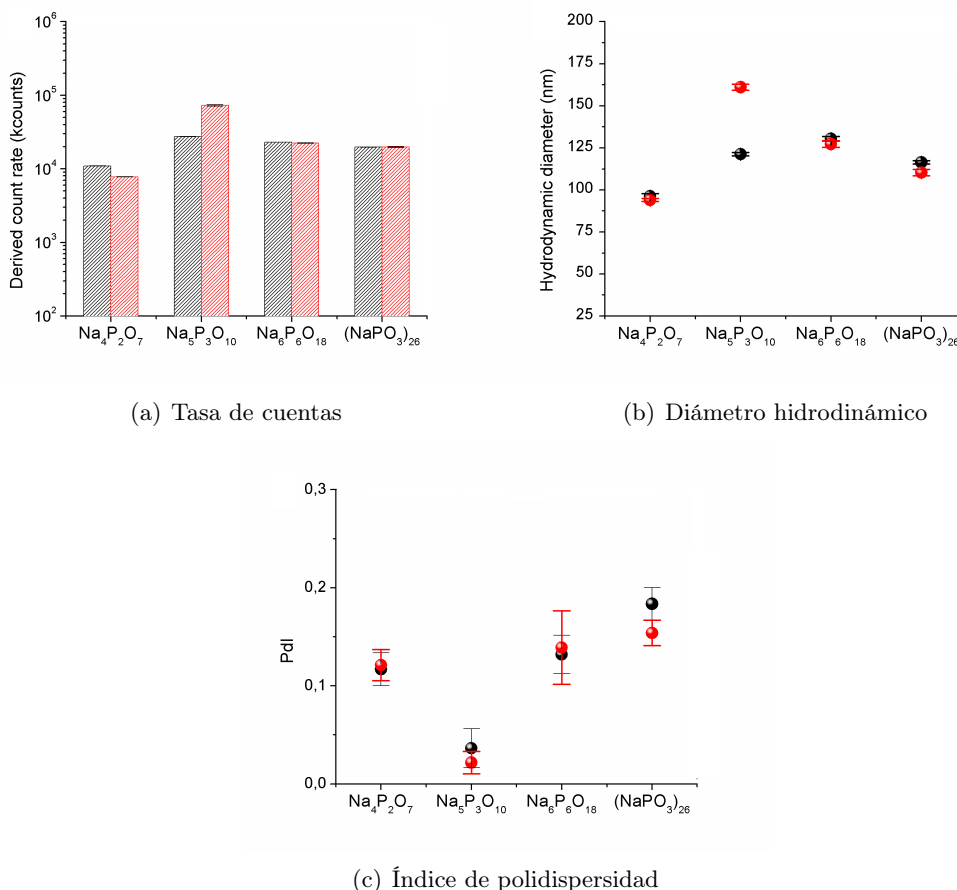


Figura 5.6: Estabilidad de las PANs luego de (●) una hora y (●) 24 horas.

A la vez, se realizaron medidas de movilidad electroforética para evaluar el efecto de las distintas sales fosfato en la carga superficial de las PANs resultantes. Los modelos de Smoluchowski y Guy Chapman son utilizados para describir la movilidad

electroforética y para obtener un valor del potencial ζ , sin embargo son únicamente válidos para superficies lisas y duras [27]. Para el caso de partículas suaves o "hairy" se desconoce en que medida los grupos cargados y los contraiones confinados en las partículas contribuyen al potencial ζ . Es posible que las PANs, especialmente aquellas fabricadas con sales de mayor cantidad de grupos fosfatos, formen estructuras lo suficientemente abiertas como para permitir que el campo electrosmótico penetre en las partículas, provocando que no se cumplan las condiciones para aplicar la ecuación de Smoluchowsky [28]. Sin embargo, la movilidad electroforética es independiente del modelo aplicado para obtener el potencial ζ y se ha observado que las PANs de polifosfatos están altamente cargadas positivamente con cargas provenientes de las aminas no compensadas por los iones de fosfato.

Se determinó la movilidad electroforética de las PANs fabricadas a la concentración óptima de formación con una concentración salina dada por 10 mM NaCl. Para las PANs formadas con polifosfatos con un alto número de grupos fosfato se encontró un valor de movilidad extremadamente alto, con valores de $+5.9 \pm 0.4 \mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{V}\cdot\text{s}$ para 1 mM $\text{Na}_6\text{P}_6\text{O}_{18}$ y $+6.2 \pm 0.3 \mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{V}\cdot\text{s}$ para 0.2 mM $(\text{NaPO}_3)_{26}$ (5.5). De la misma forma, Adamczyk et al.[29] han reportado un potencial ζ de +69 mV, (correspondiente a una movilidad electroforética de $4.9 \mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{V}\cdot\text{s}$) para una solución de PAH sin fosfatos a una concentración salina de 5 mM NaCl. Los altos valores de movilidad positiva de las PANs probablemente se asocian con el hecho de que se necesitan solo unos pocos iones de polifosfato para la formación de las nanopartículas. Las cadenas largas de polifosfatos tienen múltiples cargas negativas donde las aminas del PAH positivamente cargadas se pueden unir por interacción electrostática. Un único polifosfato puede unir varias aminas de diferentes PAH, dejando un gran número de aminas con cargas sin compensar.

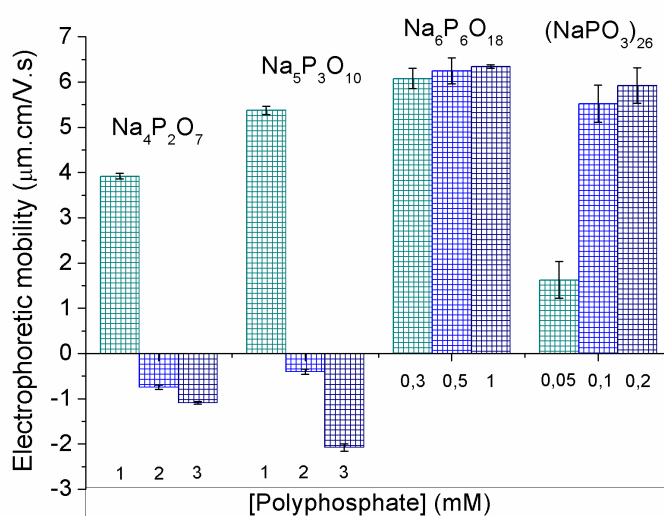


Figura 5.7: Movilidad electroforética de PANs para diferentes polifosfatos y fuerza iónica.

Complementariamente, también se midió la movilidad en función de la concentración de las sales de fosfato con una concentración salina de 10 mM de NaCl, como se observa en la Figura 5.7. Las partículas formadas con 1 mM de $Na_4P_2O_7$ presentaron una movilidad positiva de $+3.92 \pm 0.06 \mu m.cm/V.s$ mientras que aquellas formadas con 1 mM de $Na_5P_3O_{10}$ un valor de $+5.38 \pm 0.09 \mu m.cm/V.s$. Aumentar la concentración de fosfato por encima de 2 mM causa que la movilidad se acerque cero. Este comportamiento indica que ocurre compensación de cargas entre PAH y los polifosfatos. Por encima de esta concentración, las cargas se sobrecompensan resultando en nanopartículas cargadas negativamente con movilidad electroforética de $-1.1 \pm 0.1 \mu m.cm/V.s$ para PANs formadas con 3 mM $Na_4P_2O_7$ y $-2.1 \pm 0.1 \mu m.cm/V.s$ para aquellas formadas con 3 mM $Na_5P_3O_{10}$. En contraste, las PANs fabricadas con $Na_6P_6O_{18}$ y $(NaPO_3)_{26}$ presentan únicamente valores positivos de movilidad electroforética. En el rango estudiado para los sistemas con $(NaPO_3)_{26}$ la movilidad aumenta de $+1.6 \pm 0.4 \mu m.cm/V.s$ a $+5.9 \pm 0.4 \mu m.cm/V.s$ con el aumento en la concentración de la sal. Para los sistemas con $Na_6P_6O_{18}$ la movilidad permanece prácticamente constante en el rango de concentraciones estudiado, $+6.2 \pm 0.1 \mu m.cm/V.s$. Esta observación apoya la idea que tanto aminas de la misma cadena como múltiples cadenas de PAH pueden interactuar con iones de polifosfatos, ganando suficiente estabilidad como para formar nanopartículas con poca cantidad de iones fosfato pero sin llegar a compensar la cantidad de cargas positivas como lo hacen los pequeños monofosfatos. Esta interacción resulta en una alta densidad de aminas cargadas por nanopartícula y en una alta movilidad electroforética positiva. El aumento en los valores de movilidad debido al aumento de la concentración de polifosfato da idea de una organización diferente del PAH si la comparamos con la organización de las PANs formadas con monofosfatos. La tendencia indicaría que a medida que aumenta el tamaño de polifosfato se puede esperar mayor cantidad de aminas libres debido a que el número de iones fosfato necesarios para formar PANs decrece más de un orden de magnitud cuando se cambia de linker de $Na_6P_6O_{18}$ a $(NPO_3)_{26}$ (se pasa de 0.2 mM a 0.02 mM).

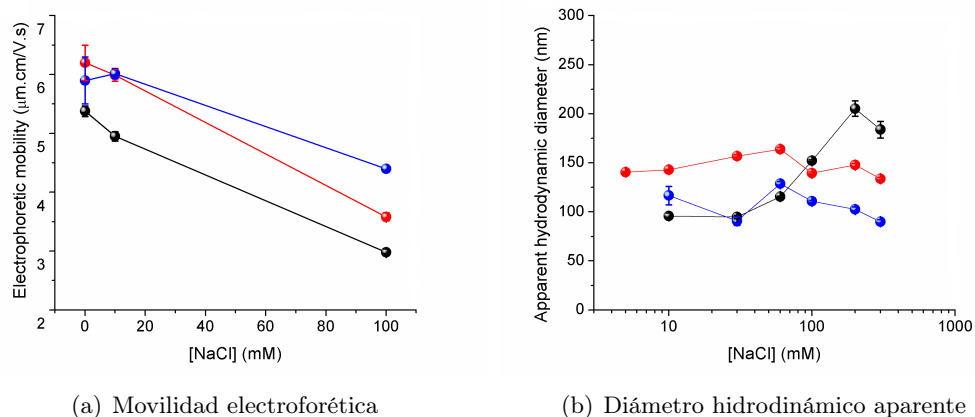


Figura 5.8: Dependencia de la movilidad electroforética y la morfología con la fuerza iónica de las siguientes PANs: (●) 2 mM $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$; (●) 1 mM $\text{Na}_6\text{P}_6\text{O}_{18}$; (●) 0.2 mM $(\text{NaPO}_3)_{26}$.

La movilidad electroforética se encuentra fuertemente influenciada por la fuerza iónica del medio. Al aumentar la misma a la hora de preparar las PANs, se observa un decrecimiento monótonico en la movilidad, como se observa en la Figura 5.8(a). En presencia de 10 mM NaCl, la movilidad electroforética es de $+5.9 \pm 0.2 \mu\text{m.cm/V.s}$, la cual decrece a $+3.6 \pm 0.1 \mu\text{m.cm/V.s}$ con 100 mM NaCl, tal como se espera debido al apantallamiento de carga.

El tamaño de las PANs formadas con $\text{Na}_6\text{P}_6\text{O}_{18}$ y $(\text{NaPO}_3)_{26}$ permanece estable al aumentar la concentración de NaCl. Para las formadas con $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ se observa un aparente aumento en el tamaño de $93 \pm 1 \text{ nm}$ a $152 \pm 1 \text{ nm}$, el cual se puede deber al apantallamiento de cargas (Figure 5.8(b)). Sin embargo, a pesar de la disminución de la movilidad y el cambio en tamaño, no se llega a inducir precipitación.

5.4. Caracterización termodinámica

Se realizaron medidas por ITC para obtener información de la termodinámica que involucra la formación de las PANs. Los datos crudos de las PANs formadas con Na_3PO_4 y $\text{Na}_6\text{P}_6\text{O}_{18}$ se presentan en la Figura 5.9(a) y 5.9(b) respectivamente. Los datos se procesaron midiendo el calor de dilución de cada sal de fosfato y sustrayéndolo del calor debido a la formación de las PANs. Se obtuvo un gráfico de las isotermas de unión del PAH como función de la concentración de fosfato a partir de integrar entre los puntos de inyección.

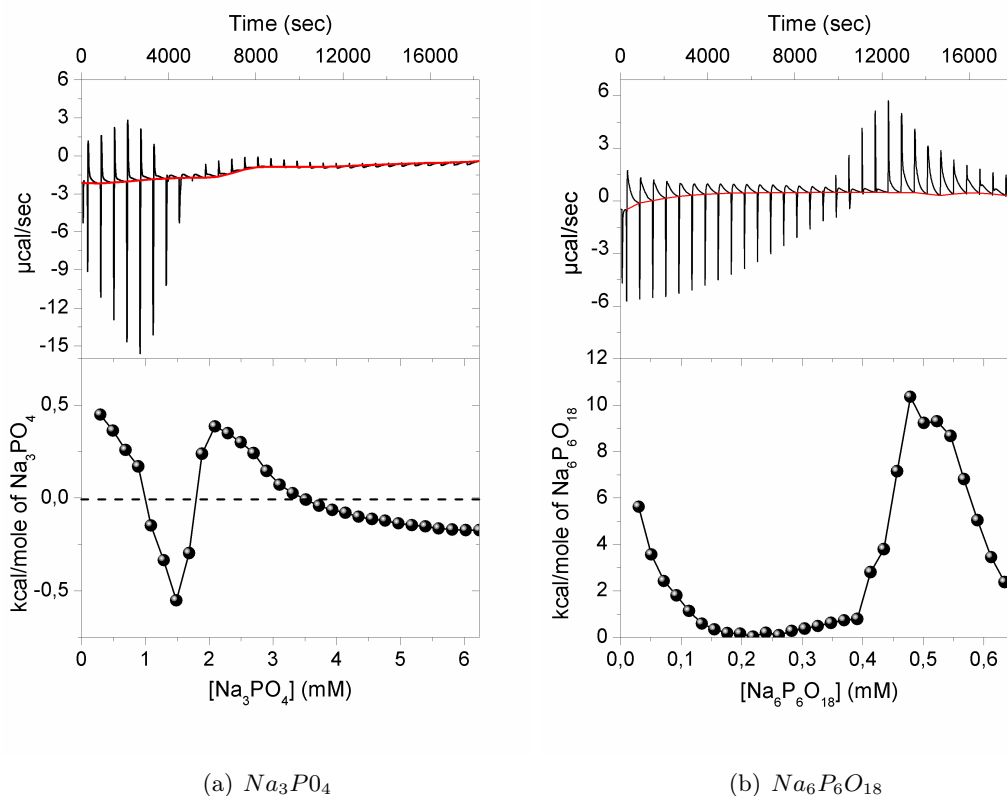


Figura 5.9: Datos representativos de ITC obtenidos (arriba) sin procesar y (abajo) integrados, obtenidos para la titulación de 1 mg/ml de PAH con las sales de fosfato estudiadas.

La curva de titulación de la solución de PAH con Na_3PO_4 en la figura 5.9(a) muestra una pequeña región exotérmica entre 1 mM y 1.8 mM de Na_3PO_4 , alcanzando un valor de -0.55 kcal/mol a 1.5 mM, asociado con la nucleación de las partículas. Sin embargo, al aumentar la concentración de fosfato, se observa una región amplia endotérmica entre 1.8 mM y 3.5 mM que alcanza su valor máximo de 0.38 kcal/mol, seguido por una región exotérmica. Para Na_3PO_4 , la región exotérmica comienza en 1 mM, lo que indica una ganancia entálpica proveniente de la formación de los complejos superando el calor endotérmico asociado con el cambio en la hidratación alrededor de los complejos. Cuando la concentración de fosfato se incrementa por encima de 1.8 mM Na_3PO_4 , se gana poca entalpía por las interacciones amina-fosfato ya que la mayoría de las aminas se han unido a los fosfatos o porque la estructura de las PANs impide estéricamente mayores interacciones entre los componentes. Este perfil es similar al que se encontró para nanopartículas formadas por PAH-buffer fosfato [24].

Las curvas de ITC para la titulación con $Na_6P_6O_{18}$ muestran una ganancia

entálpica cercana a cero en la región entre 0.15 mM y 0.4 mM, seguido por un pico endotérmico entre 0.4 mM y 0.6 mM alcanzando 10 kcal/mol para 0.48 mM $Na_6P_6O_{18}$. En el caso de la titulación con sal de Graham se observa el mismo comportamiento pero el pico endotérmico se genera a concentraciones más bajas de sal. La curva de ITC para $Na_4P_2O_7$ exhibe únicamente una región exotérmica en la región a la cual la concentración de fosfato permite la formación de PANs, con un valor de -3.6 kcal/mol a 1 mM de $Na_4P_2O_7$. Curiosamente, esta sal de fosfato presenta un pequeño incremento endotérmico a 0.75 mM $Na_4P_2O_7$. Para $Na_5P_3O_{10}$ existe un rango entre 0.5 y 0.8 mM donde se puede observar un pico endotérmico. Luego del mismo, el agregado de mayores cantidades de sal de fosfato no genera calor adicional. En la figura 5.10 se observa la similitud de los perfiles de entalpía de la formación de las PANs con los distintos polifosfatos estudiados. En todos los casos se observó un pico endotérmico, el cual ha sido reportado para la interacción del PAH con $Na_6P_6O_{18}$ [20]. El pico endotérmico encontrado en sistemas polifosfatos tiene lugar a concentraciones donde las PANs ya se encuentran formadas, como se evidencia por DLS.

Más aún, si se normaliza el calor por la cantidad de cargas por polifosfato y se grafica en función de la razón R definida en la ecuación 5.1 todos los picos endotérmicos caen en la misma región, como se observa en la Figura 5.11. La superposición de los perfiles de entalpía sugiere que el calor total está directamente asociado con el número de grupos fosfatos y cargas en los polifosfatos.

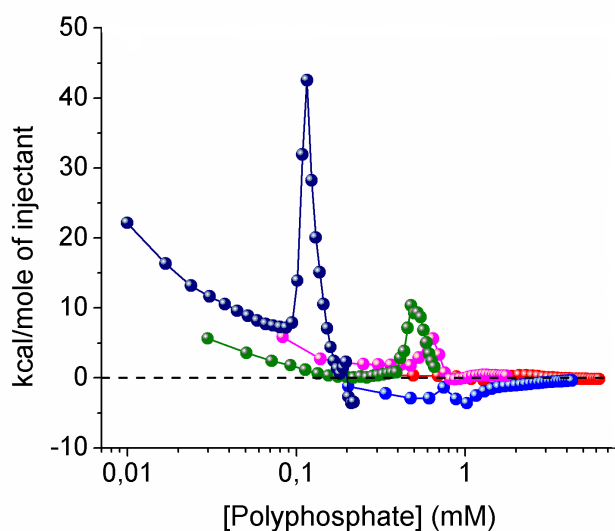


Figura 5.10: Isotermas de entalpía de la titulación de la solución de PAH 1 mg/ml con soluciones de fosfato en función de la concentración de las mismas: (●) Na_3PO_4 ; (●) $Na_4P_2O_7$; (●) $Na_5P_3O_{10}$; (●) $Na_6P_6O_{18}$; (●) $(NaPO_3)_{26}$

El calor endotérmico puede ser atribuido a la reorganización de agua asociada

con los grupos fosfatos a través de la formación de complejos de fosfatos y aminas. La interacción de las aminas del PAH positivamente cargadas y los fosfatos, es exotérmica. El pico endotérmico observado indica que la ganancia energética proveniente de la formación de los complejos no llega a compensar la pérdida de agua de solvatación. Por ende, la formación de complejos amina-fosfato debe estar controlada entrópicamente por la liberación de los contraiones de ambos constituyentes, y por una configuración del agua más desordenada a medida que la hidratación de los fosfatos cambia. La liberación de contraiones se considera como el factor de mayor contribución a la formación de films capa por capa (layer-by-layer) y complejos de polielectrolitos [30]. Para cada cadena de polielectrolito, se liberan contraiones durante el proceso de complejación, aumentando el número de especies libres en solución. Para los polifosfatos también podemos asumir que varios (en algunos casos todos) contraiones se liberan y de la misma forma aumenta la cantidad de especies libres provocando un aumento de la entropía total del sistema [31]. A concentraciones mayores de fosfato prácticamente no se observa ganancia o pérdida de calor, indicativo de que o los procesos endo- y exotérmicos se compensan o que las sales de fosfatos agregadas no interactúan con las aminas, o lo hacen débilmente.

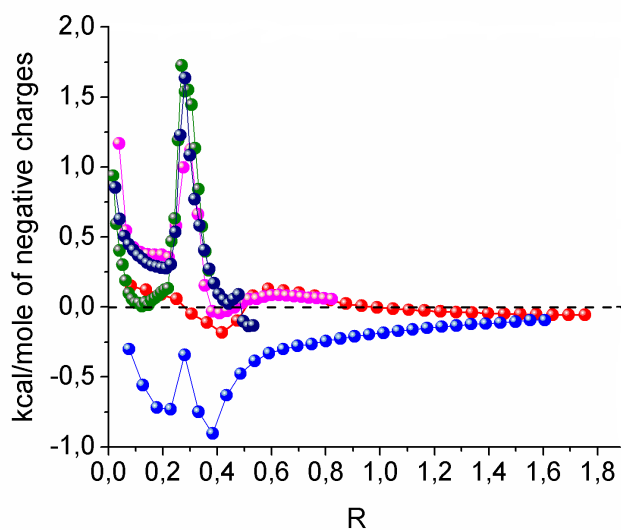


Figura 5.11: Isotermas de entalpía corregidas por el número de carga de los fosfatos correspondientes en función del radio molar R

: (●) Na_3PO_4 ; (●) $Na_4P_2O_7$; (●) $Na_5P_3O_{10}$; (●) $Na_6P_6O_{18}$; (●) $(NaPO_3)_{26}$

5.5. Estabilidad con el pH

El grado de protonación del PAH, con un $pK_a = 8-9$ [32], y los polifosfatos utilizados se consideran determinantes para la formación de PANs y su estabilidad, ya que las mismas se encuentran unidas por interacciones electrostáticas entre las cargas negativas de los polifosfatos y las positivas provenientes de las aminas del PAH. En

consecuencia, los entornos en los cuales las poliaminas o los fosfatos no se encuentren cargados podrían llevar al desensamblado de las nanopartículas.

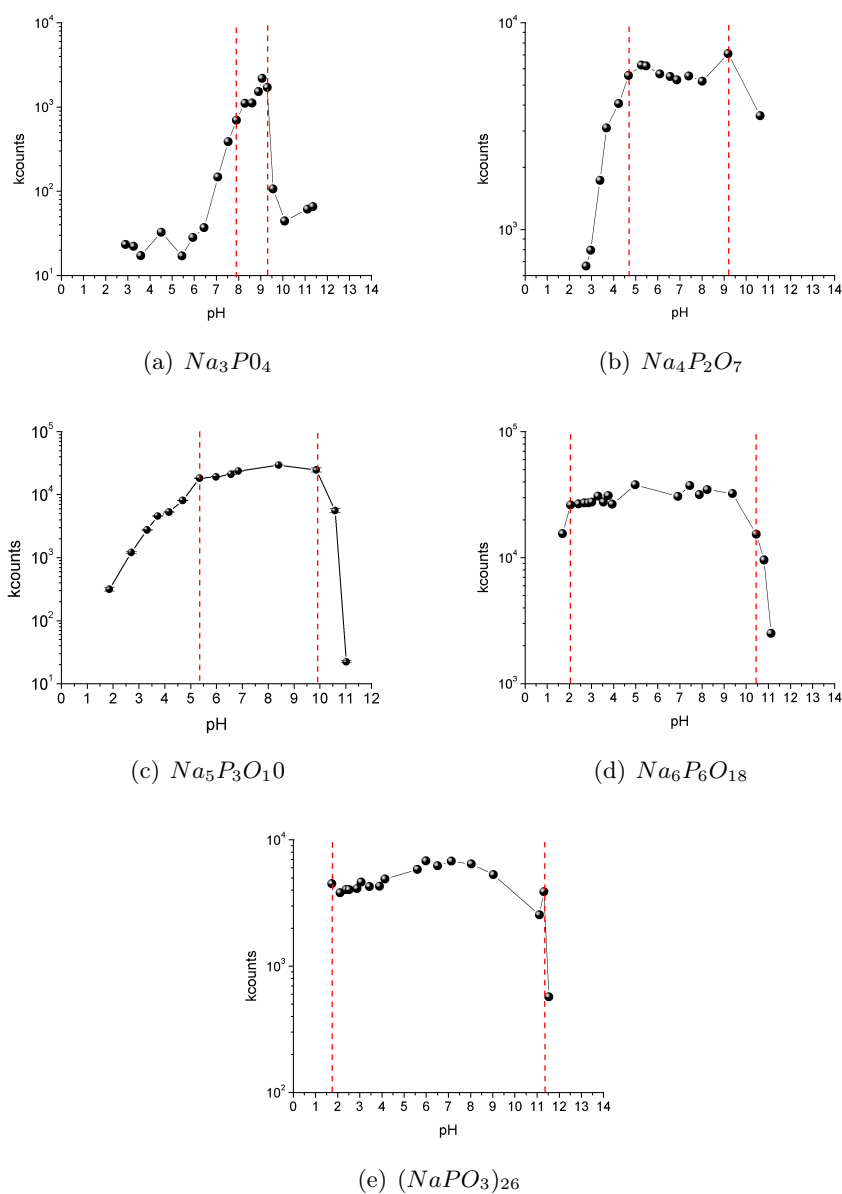


Figura 5.12: Intensidad de dispersión de luz para las PANs formadas con PAH 1 mg/mL y los diferentes polifosfatos en función del pH

Las PANs se fabricaron a las concentraciones óptimas de polifosfatos (ver Tabla 5.5). Se realizaron medidas de DLS y dispersión de luz para estudiar la estabilidad de las PANs en un amplio rango de pH, desde 2 hasta 11. La Figura 5.12(b) muestra

la intensidad de luz dispersada expresada como la tasa de cuentas para diferentes pH de una solución de PANs preparada con $Na_4P_2O_7$. La tasa de cuentas se mantiene constante entre pH 5.5 y 10. Fuera de dichos límites se observa una disminución en la luz dispersada y un incremento en el PDI (no se muestran los datos), indicativo de que las PANs se están disolviendo. Para $pH > 10$, la tasa de cuentas decrece abruptamente comparado con la tendencia a pHs menores que 5. Se observa en la Figura 5.12(a) que mientras las PANs preparadas con Na_3PO_4 son estables en un rango estrecho de pH entre 6 y 8, las que provienen de polifosfatos tienen una mayor estabilidad, expandiendo dicho rango desde pH 2 hasta 10 para el caso de $Na_6P_6O_{18}$ (Figura 5.12(d)). Las PANs fabricadas con polifosfatos parecen ser más resistentes a protonación ácida y mientras más larga la cadena de polifosfato menor es el pH para la disociación de la partícula. El polifosfato más largo, $(NaPO_3)_{26}$, es estable todavía a pH 2 (Figura 5.12(e)). En el régimen básico, la estabilidad de las PANs se extiende hasta pH 11. A pH mayor a 12, se encuentran totalmente disueltas.

La estabilidad de las PANs a bajos valores de pH está asociada con la capacidad de los fosfatos de retener cargas negativas a esos pH, mientras que la deprotonación del PAH a pH básico sería la responsable de provocar el desensamblado. El hecho de que la mezcla con polifosfatos aumenta el rango de estabilidad hacia entornos más básicos en comparación con los monofosfatos puede ser atribuido a la capacidad de los primeros de interactuar con una gran número de monómeros del PAH, intra e inter cadenas. Para resumir la dependencia del pH de todas las PANs estudiadas, la Figura 5.13 muestra el rango de estabilidad de cada sistema.

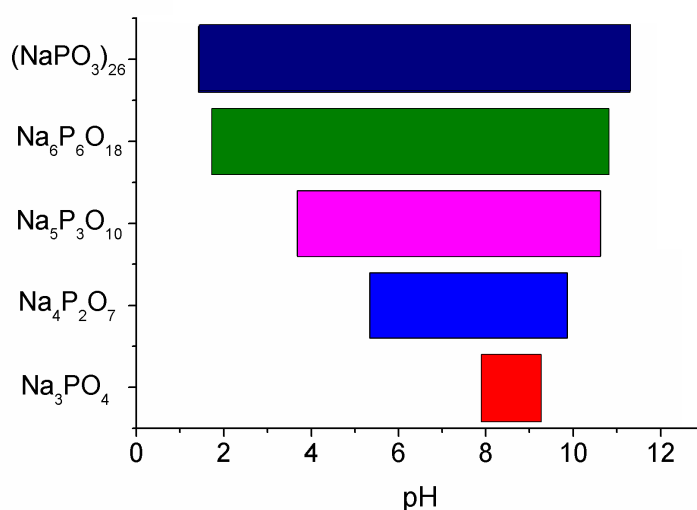


Figura 5.13: Rangos de estabilidad con el pH de los complejos PAH-polifosfatos: (●) Na_3PO_4 ; (●) $Na_4P_2O_7$; (●) $Na_5P_3O_{10}$; (●) $Na_6P_6O_{18}$; (●) $(NaPO_3)_{26}$

5.6. Conclusiones

Se ha explorado la formación de partículas de poliaminas fosfato con variedad de sales de fosfato, principalmente polifosfatos. Se ha observado que la formación de partículas es posible en todos los casos, pero las condiciones y rango de concentración de iones de fosfato que dan lugar a la aparición de partículas son diferentes para cada sal. Aumentar el número de unidades fosfato en la sal disminuye la concentración mínima de iones de fosfato necesarios para la formación de nanopartículas. A diferencia de la sal de monofosfato, los polifosfatos forman precipitados a bajas concentraciones y esta tendencia es más pronunciada a medida que el número de unidades fosfato aumenta. La sal de Graham, $(NaPO_3)_{26}$, forma partículas estables en el rango de valores de pH entre 2 y 11. Esta gran estabilidad con el pH se debe a la capacidad de los polifosfatos de retener cargas a bajo pH y a la habilidad de conectar múltiples cadenas de PAH o monómeros de una misma cadena. Las partículas fabricadas con polifosfatos también presentan una alta movilidad electroforética, con valores de $+5.9 \pm 0.4 \mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{V}\cdot\text{s}$ para $(NaPO_3)_{26}$, lo cual indica una gran cantidad de aminas sin sobrecompensar. Las medidas de ITC revelan que la interacción de polifosfatos con las aminas del PAH da como resultado un proceso endotérmico, probablemente relacionado con los cambios en el agua de hidratación de los iones fosfato durante la complejación amina-fosfato y sugiere que la formación de las PANs está impulsada por efectos entrópicos a bajas concentraciones de fosfato.

En resumen, se ha probado que es posible controlar finamente propiedades y características de las partículas eligiendo adecuadamente la sal de fosfato con la que trabajar, lo cual puede ser beneficioso para la aplicación en sistemas de transporte y liberación de fármacos. En particular, se presenta un sistema complejo que permite ajustar el rango de pH al cual una carga puede ser conservada o liberada por desintegración de la partículas. Esto permitiría realizar diseños para actuar en organelas específicas en el entorno intracelular según los valores típicos del pH de los entornos que las componen.

Bibliografía

- [1] Otto Phanstiel IV, Harry L Price, Lu Wang, Jane Juusola, Martin Kline, and Sapna Majmundar Shah. The effect of polyamine homologation on the transport and cytotoxicity properties of polyamine-(dna-intercalator) conjugates. *The Journal of organic chemistry*, 65(18):5590–5599, 2000.
- [2] Lu Wang, Harry L Price, Jane Juusola, Martin Kline, and Otto Phanstiel IV. Influence of polyamine architecture on the transport and topoisomerase ii inhibitory properties of polyamine dna- intercalator conjugates. *Journal of medicinal chemistry*, 44(22):3682–3691, 2001.
- [3] Raymond J Bergeron, Yang Feng, William R Weimar, James S McManis, Hristina Dimova, Carl Porter, Brian Raisler, and Otto Phanstiel. A comparison of structure-activity relationships between spermidine and spermine analogue antineoplastics. *Journal of medicinal chemistry*, 40(10):1475–1494, 1997.
- [4] DL Kramer, JT Miller, RJ Bergeron, R Khomutov, A Khomutov, and CW Porter. Regulation of polyamine transport by polyamines and polyamine analogs. *Journal of cellular physiology*, 155(2):399–407, 1993.
- [5] Chaojie Wang, Jean-Guy Delcros, Laura Cannon, Fanta Konate, Horacio Carias, John Biggerstaff, Richard Andrew Gardner, and Otto Phanstiel IV. Defining the molecular requirements for the selective delivery of polyamine conjugates into cells containing active polyamine transporters. *Journal of medicinal chemistry*, 46(24):5129–5138, 2003.
- [6] Ryo Kimura, Hidetsugu Kitakado, Atsuhiko Osuka, and Shohei Saito. Flapping peryleneimide as a fluorescent viscosity probe: Comparison with BODIPY and DCVJ molecular rotors. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 93(9):1102–1106, 8 2020.
- [7] Waldemar A. Marmisollé, Joseba Irigoyen, Danijela Gregurec, Sergio Moya, and Omar Azzaroni. Supramolecular Surface Chemistry: Substrate-Independent, Phosphate-Driven Growth of Polyamine-Based Multifunctional Thin Films. *Advanced Functional Materials*, 25(26):4144–4152, 2015.

- [8] Fwu Long Mi, Shin Shing Shyu, Tsung Bi Wong, Shiang Fang Jang, Sung Tao Lee, and Kai Tai Lu. Chitosan-polyelectrolyte complexation for the preparation of gel beads and controlled release of anticancer drug. II. Effect of pH-dependent ionic crosslinking or interpolymer complex using tripolyphosphate or polyphosphate as reagent. *Journal of Applied Polymer Science*, 74(5):1093–1107, 1999.
- [9] Jaejung Park, Young Wook Choi, Kyung Bae Kim, Hoeil Chung, and Daewon Sohn. Aggregation processes of a weak polyelectrolyte, poly(allylamine) hydrochloride. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 29(1):104–110, 2008.
- [10] Stephanie A. Smith, Sharon H. Choi, Julie N.R. Collins, Richard J. Travers, Brian C. Cooley, and James H. Morrissey. Inhibition of polyphosphate as a novel strategy for preventing thrombosis and inflammation. *Blood*, 120(26):5103–5110, 2012.
- [11] Aradhana Chopra, Swati Krishnan, and Friedrich C. Simmel. Electrotransfection of Polyamine Folded DNA Origami Structures. *Nano Letters*, 16(10):6683–6690, 2016.
- [12] T. J. Thomas, H. A. Tajmir-Riahi, and Thresia Thomas. Polyamine–DNA interactions and development of gene delivery vehicles. *Amino Acids*, 48(10):2423–2431, 2016.
- [13] Kevin M. Holder, Ryan J. Smith, and Jaime C. Grunlan. A review of flame retardant nanocoatings prepared using layer-by-layer assembly of polyelectrolytes. *Journal of Materials Science*, 52(22):12923–12959, 2017.
- [14] Kadir Apaydin, Abdelghani Laachachi, Vincent Ball, Maude Jimenez, Serge Bourbigot, Valérie Toniazzo, and David Ruch. Intumescent coating of (polyallylamine-polyphosphates) deposited on polyamide fabrics via layer-by-layer technique. *Polymer Degradation and Stability*, 106:158–164, 2014.
- [15] Patrizia Andreozzi, Eleftheria Diamanti, Karen Rapp Py-Daniel, Paolin Rocio Cáceres-Vélez, Chiara Martinelli, Nikolaos Politakos, Ane Escobar, Marco Muzi-Falconi, Ricardo Azevedo, and Sergio E. Moya. Exploring the pH Sensitivity of Poly(allylamine) Phosphate Supramolecular Nanocarriers for Intracellular siRNA Delivery. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 9(44):38242–38254, 2017.
- [16] Felicitas Müller, Nicola J. Mutch, Wolfdieter A. Schenk, Stephanie A. Smith, Lucie Esterl, Henri M. Spronk, Stefan Schmidbauer, William A. Gahl, James H. Morrissey, and Thomas Renné. Platelet Polyphosphates Are Proinflammatory and Procoagulant Mediators In Vivo. *Cell*, 139(6):1143–1156, 2009.
- [17] R. Gao, F. E.D. van Halsema, E. J.M. Temminghoff, H. P. van Leeuwen, H. J.F. van Valenberg, M. D. Eisner, M. Giesbers, and M. A.J.S. van Boekel. Modelling

- ion composition in simulated milk ultrafiltrate (SMUF). I: Influence of calcium phosphate precipitation. *Food Chemistry*, 122(3):700–709, 2010.
- [18] Rohit K Rana, Vinit S Murthy, Jie Yu, and Michael S Wong. Nanoparticle self-assembly of hierarchically ordered microcapsule structures. *Advanced Materials*, 17(9):1145–1150, 2005.
- [19] PN Pusey and RJA Tough. Particle interactions. In *Dynamic light scattering*, pages 85–179. Springer, 1985.
- [20] Mai Mouslmani, Jessica M Rosenholm, Neeraj Prabhakar, Markus Peurla, Elias Baydoun, and Digambara Patra. Curcumin associated poly (allylamine hydrochloride)-phosphate self-assembled hierarchically ordered nanocapsules: size dependent investigation on release and dpph scavenging activity of curcumin. *RSC Advances*, 5(24):18740–18750, 2015.
- [21] Karel Ulbrich, Katerina Hola, Vladimir Subr, Aristides Bakandritsos, Jiri Tucek, and Radek Zboril. Targeted drug delivery with polymers and magnetic nanoparticles: covalent and noncovalent approaches, release control, and clinical studies. *Chemical reviews*, 116(9):5338–5431, 2016.
- [22] Malvern Instruments. *Zetasizer nano series user manual*, 2004.
- [23] Clarisse Maechling and Vincent Ball. Exothermic–endothermic transition in the titration of poly (allylamine chloride) with sodium hexametaphosphate associated with a change in the proton release regime. *The Journal of Physical Chemistry B*, 120(20):4732–4741, 2016.
- [24] Patrizia Andreozzi, Caterina Ricci, Joaquin Emiliano Martinez Porcel, Paolo Morretti, Desirè Di Silvio, Heinz Amenitsch, Maria Grazia Ortore, and Sergio E Moya. Mechanistic study of the nucleation and conformational changes of polyamines in presence of phosphate ions. *Journal of colloid and interface science*, 543:335–342, 2019.
- [25] ANDREW C Storer and ATHEL Cornish-Bowden. Concentration of mgatp²⁻ and other ions in solution. calculation of the true concentrations of species present in mixtures of associating ions. *Biochemical Journal*, 159(1):1–5, 1976.
- [26] Kipton J Powell, Paul L Brown, Robert H Byrne, Tamás Gajda, Glenn Hefter, Staffan Sjöberg, and Hans Wanner. Chemical speciation of environmentally significant heavy metals with inorganic ligands. part 1: The hg²⁺–cl⁻, oh⁻, co³²⁻, so⁴²⁻, and po⁴³⁻–aqueous systems (iupac technical report). *Pure and applied chemistry*, 77(4):739–800, 2005.
- [27] Robert J Hunter. *Zeta potential in colloid science: principles and applications*, volume 2. Academic press, 2013.

- [28] Joseba Irigoyen, Valeri B Arekalyan, Zaven Navoyan, Jagoba Iturri, Sergio E Moya, and Edwin Donath. Spherical polyelectrolyte brushes' constant zeta potential with varying ionic strength: an electrophoretic study using a hairy layer approach. *Soft Matter*, 9(48):11609–11617, 2013.
- [29] Z Adamczyk, M Zembala, P Warszyński, and B Jachimska. Characterization of polyelectrolyte multilayers by the streaming potential method. *Langmuir*, 20(24):10517–10525, 2004.
- [30] César Márquez-Beltrán, L Castañeda, M Enciso-Aguilar, Gerardo Paredes-Quijada, Heriberto Acuña-Campa, Amir Maldonado-Arce, and Jean-François Argillier. Structure and mechanism formation of polyelectrolyte complex obtained from pss/-pah system: effect of molar mixing ratio, base–acid conditions, and ionic strength. *Colloid and Polymer Science*, 291(3):683–690, 2013.
- [31] JF Masson. Brief review of the chemistry of polyphosphoric acid (ppa) and bitumen. *Energy & Fuels*, 22(4):2637–2640, 2008.
- [32] Brittany N Dickhaus and Ronny Priefer. Determination of polyelectrolyte pka values using surface-to-air tension measurements. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 488:15–19, 2016.

Capítulo 6

Estudio de complejos ADN-DTAB por Efecto Kerr electroóptico

6.1. Introducción

En los capítulos anteriores se han mostrado estudios de sistemas para nanomedicina fabricados con polielectrolitos sintéticos. Para lograr una menor tasa de rechazo o toxicidad en una potencial aplicación médica, la utilización de la mayor cantidad de elementos biocompatibles es indispensable. Es por eso que la interacción entre moléculas anfífilas y polielectrolitos biológicamente activos ha recibido atención no solo desde un punto de vista fisicoquímico [1, 2], sino también biomédico. Dentro de este grupo, los sistemas compuestos por ácido desoxirribonucleico (ADN) y surfactantes catiónicos tienen múltiples aplicaciones: el ADN puede purificarse por condensación y precipitación utilizando surfactantes catiónicos [3]; se ha utilizado bromuro de cetiltrimetilamonio para renaturalización y ligado de ADN [4]. También existen aplicaciones en transporte controlado de material genético, que han sido estudiados para transporte de ADN dentro de las células [5, 6]. El ADN por sí sólo, debido a su tamaño y densidad de carga, no puede entrar al citosol, es por eso que se han utilizado liposomas como transportadores para terapia génica y tensoactivos amonios cuaternarios para cargar positivamente los complejos y mejorar la eficiencia de transfección.

La interacción entre ambos ha sido estudiada en trabajos previos, en particular se han realizado experimentos de tensión superficial de equilibrio y DLS con una cadena doble de ADN idéntica a la que se ha utilizado en este trabajo y distintos surfactantes amonios cuaternarios (CTAB, DTAB, entre otros)[7, 8]. En ellos se ha reportado la concentración a la que el surfactante comienza a interactuar de manera cooperativa con el ADN, la llamada concentración de agregación crítica (CAC), característica distintiva en los sistemas polielectrolito/surfactante. De forma complementaria, se han realizado

mediciones electroópticas por efecto Kerr para estudiar las características del ADN [9, 10], para determinar, por ejemplo, cambios en la longitud de la hélice de la molécula [11, 12], para el análisis de curvatura de ADN en soluciones salinas [13, 14], entre otros. Sin embargo hay una gran dispersión en los resultados y análisis de los fenómenos que involucran los mecanismos de orientación de la molécula de ADN en un campo eléctrico [15–17]. Muchas de estas discrepancias surgen del hecho de que las muestras utilizadas son polidispersas. La molécula de ADN presenta múltiples configuraciones y propiedades dependiendo la cantidad de pares de base que la compongan [18, 19] y es fundamental controlar este parámetro para simplificar y precisar el análisis del sistema. Por lo tanto, en este capítulo se mostrarán mediciones y resultados obtenidos para una cadena doble de ADN corta (300 pares de base) monodispersa en solución salina y como se modifican sus propiedades morfológicas y eléctricas mediante el agregado del surfactante catiónico DTAB utilizando la técnica de Efecto Kerr, que como se ha mencionado en el Capítulo 2 es un técnica no comercial desarrollada y optimizada durante esta tesis.

6.2. Materiales y métodos

El ácido deoxirribonucleico bicatenario (ADN) se preparó por sonicación de Calf thymus ADN (Sigma-Aldrich). El peso molecular se determinó por electroforesis en 300 pares de base (bp) con un índice de polidispersidad de 0.12. El bromuro de dodeciltrimetilamonio (DTAB) (Fig 6.1) y el bromuro de sodio (NaBr) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich con pureza >99 % y se utilizaron sin purificación adicional. Se utilizó como solvente soluciones salinas a 2 mM NaBr preparadas con agua MilliQ. Las muestras se prepararon mezclando volúmenes iguales de soluciones de ADN y surfactante al doble de la concentración final deseada. La concentración de final de ADN se mantuvo fija en 360 mg L^{-1} . Las concentraciones de surfactante estudiadas fueron c_s : 0.2 mM, 0.6 mM, 1 mM, 1.3 mM, 1.5 mM, 1.7 mM y 2.1 mM. Todas las muestras se prepararon a temperatura ambiente y se dejaron equilibrar antes de ser analizadas.

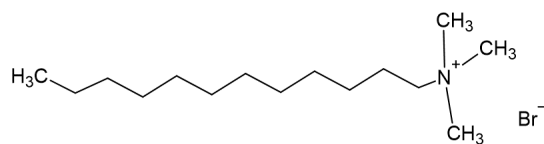


Figura 6.1: Bromuro de dodeciltrimetilamonio $\text{C}_{15}\text{H}_{34}\text{NBr}$ bromuro de dodeciltrimetilamonio (DTAB) tensoactivo catiónico de cadena simple. Su cabeza polar tiene como contraión bromo; el peso molecular es de 308.3 g/mol

Las mediciones de efecto Kerr se realizaron en el equipo descrito en la sección 2. Se aplicaron pulsos cuadrados de ancho temporal de 0.2-0.5 ms en la celda de Kerr, asegurándose que se alcanzara el régimen de birrefringencia estacionaria. Se realizaron

mediciones aplicando intensidades de campo crecientes, iniciando en 50 kV/m, incrementando el pulso de a 100 kV/m hasta 950 kV/m. Luego, para verificar la reversibilidad y que la muestra no se deteriora luego de la aplicación de campos eléctricos intensos, se incrementó a 1000 kV/m y se descendió de a 100 kV/m hasta 100 kV/m, midiendo en cada paso.

6.2.1. Análisis de transitorios

En una primera instancia se analizaron los transitorios de las señales de birefringencia obtenidas a través de ajustes con combinaciones lineales de exponenciales para obtener los tiempos característicos de relajación de las señales de Kerr. Para cada señal se utilizó la menor cantidad de exponenciales necesarias para obtener un buen ajuste de la curva experimental.

El análisis con multiexponenciales, si bien es útil, carece de interpretación física directa. Por eso también se utilizaron modelos físicos para el ajuste de las relajaciones obtenidos de la bibliografía. Para las relajaciones de subida se emplearon dos modelos: el primero introduce un factor de peso (R ec. 6.1) a través de un cociente entre las orientaciones debidas a dipolos permanentes ($\beta = \frac{\vec{\mu} \cdot \vec{E}}{k_B T}$) y a dipolos inducidos ($\gamma = \frac{\Delta\alpha^e \cdot E^2}{k_B T}$), como se ha mencionado en el Capítulo 2. Este modelo surge de la obtención de $f(\theta)$ y la resolución de la ecuación 2.17 presentada en el Capítulo 2 por Benoit [20]; asume que las partículas tienen simetría axial, que se encuentran altamente diluidas y que el campo aplicado es bajo (régimen Kerr). El segundo modelo elimina la condición de dilución, incluyendo además un parámetro (δ) que da cuenta de la interacción entre partículas para sistemas en regímenes semidiluidos [21]. Para ambos modelos se incluye el parámetro D correspondiente al coeficiente de difusión rotacional.

$$R = \frac{\beta^2}{2\gamma} = \frac{\mu^2}{\Delta\alpha^e k_B T} \quad (6.1)$$

$$\text{Modelo 1 subida: } \frac{\Delta n}{\Delta n_\infty} = 1 - \frac{R}{2(R+1)} e^{-2Dt} + \frac{R-2}{2(R+1)} e^{-6Dt} \quad (6.2)$$

$$\text{Modelo 2 subida: } \frac{\Delta n}{\Delta n_\infty} = 3 \left(\left(1 - 2\frac{\delta}{\beta}\right) + \frac{1}{2R} \right)^{-1} \left[\left(1 - 2\frac{\delta}{\beta}\right) \left(\frac{1-e^{-6Dt}}{3} - \frac{e^{-2Dt}-e^{-6Dt}}{2} + \frac{1}{6R}(1 - e^{-6Dt}) \right) \right] \quad (6.3)$$

Para las relajaciones de bajada, también se utilizaron dos modelos: el primero relacionado a la posibilidad de que las partículas se deformen tras la aplicación del campo a través de la inclusión de un parámetro de estiramiento, el mismo utilizado en el capítulo 4. En este capítulo lo llamaremos θ . El segundo modelo se corresponde con el modelo 2 dado por la ecuación 6.3 por lo que responde a las mismas hipótesis, y da cuenta de las relajaciones de las partículas al estado isótropo en un régimen semidiluido,

con interacciones interpartículas mediadas por el parámetro δ y A que se relaciona con R y β a través de: $A = 5[\beta(R^{-1} + 1)]^{-1}$ [21]:

$$\text{Modelo 1 bajada: } \frac{\Delta n}{\Delta n_{\infty}} = e^{-(-Dt)^{\theta}} \quad (6.4)$$

$$\text{Modelo 2 bajada: } \frac{\Delta n}{\Delta n_{\infty}} = e^{-Dt\left(6-\frac{d^2}{7}\right)} - \frac{3\delta}{10}A \left[e^{-Dt\left(2-\frac{d^2}{5}\right)} - e^{-Dt\left(6-\frac{d^2}{7}\right)} \right] \quad (6.5)$$

Nótese que en las ecuaciones 6.2 a 6.5 se le da sentido físico a las relajaciones multiexponenciales, siendo este su principal aporte a pesar de la simpleza de los modelos.

6.3. Resultados

6.3.1. Propiedades del ADN

El ADN se compone de bases nitrogenadas, estructuras anisotrópicas que se encuentran apiladas en el centro de la hélice con dimensiones determinadas: 0.34 nm de espesor y de 2 nm de diámetro cada una, como se esquematiza en la Figura 6.2. La muestra de este estudio se compone de 300 pares de base, dando una longitud de contorno de $L = 102$ nm. Cada monómero se compone de un par de base, aportando dos cargas por monómero y con una distancia entre cargas de $A = 0.17$ nm. La longitud de persistencia l_p , definida en el Capítulo 1, para el ADN libre en solución salina 2 mM NaBr se ha reportado en varios trabajos alrededor de 50 nm [18, 22–24]. Con este valor, se calculó la distancia R_{ee} definida a partir de la teoría de campo medio desarrollada por Flory [25] como:

$$R_{ee} = l_p(L/l_p)^{\nu} \quad (6.6)$$

con $\nu = 2/3$ para el polímero en buen solvente. En el caso de esta muestra de ADN se obtiene un valor de ~ 70 nm. El parámetro de Manning η , definido en la Introducción, permite obtener el porcentaje de contraiones condensado como $1 - 1/\eta$. η se calcula como el cociente entre la longitud de persistencia y la separación entre monómeros A , por lo que η vale 4 para el ADN y se obtiene que cerca de un 75 % de los contraiones se encuentran condensados en la cadena de ADN; dejando un 25 % de la carga efectiva del ADN sin compensar. Para esta muestra, se calculó la concentración a la cual se pasa de un régimen diluido a uno semidiluido, en el que las partículas presentarían interacción entre ellas. Esta concentración, llamada concentración de solapamiento se calculó según lo propuesto por Dobryn [26, 27] como $c_{ov} = M_w / [\text{Na}]L^3 \sim 285 \text{ mg L}^{-1}$ la cual es menor a la concentración utilizada en las soluciones estudiadas, 360 mg L^{-1} . Por esta razón, el sistema se encuentra en un régimen semidiluido y pueden

considerarse efectos de interacción entre cadenas. Por lo tanto, existe una longitud característica llamada longitud de correlación ξ , en la que cualquier elemento que exceda la misma presentará interacciones con otras cadenas. En función de la concentración de solapamiento y en condiciones de buen solvente se puede calcular de la siguiente forma $\xi = L \frac{c}{c_{ov}} 0,5$ [28], obteniéndose para este sistema un valor de 90 nm.

Todos estos conceptos y cálculos serán útiles al analizar el interpretar los resultados de efecto Kerr.

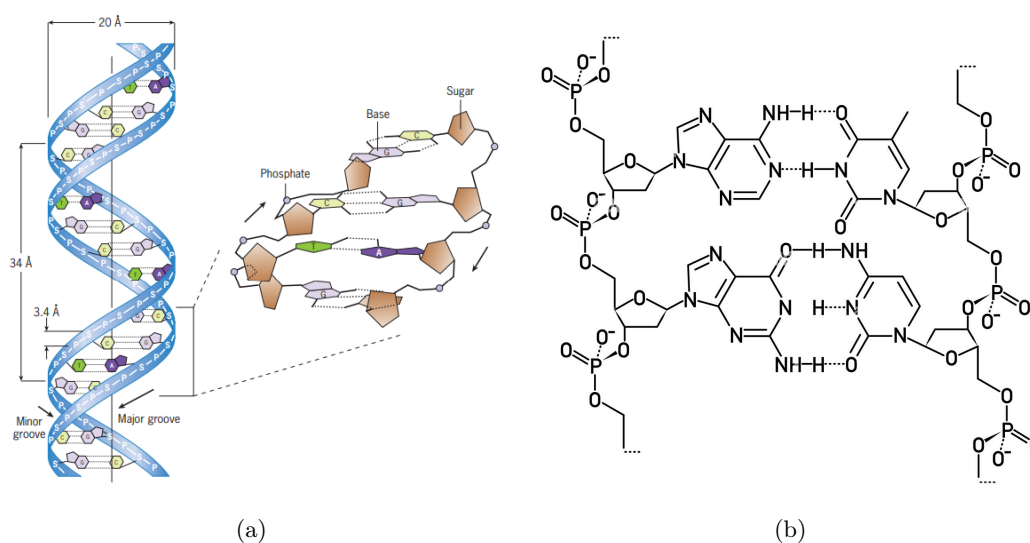


Figura 6.2: (a) Esquema de la doble cadena de ADN con las longitudes características de la doble hélice y la configuración espacial de las bases nitrogenadas [29]. (b) Estructura molecular de las bases apareadas.

6.3.2. Señales de birrefringencia

En la Figura 6.3 se muestran las señales de birrefringencia obtenidas para una solución de ADN libre de surfactante y las demás mezcladas con concentraciones de DTAB c_s : 1 mM y 1.7 mM; y para tres campos efectivos aplicados 175 kV/m, 325 kV/m y 450 kV/m. En la misma se encuentran condensados la diversidad de comportamientos observados en función de la concentración de surfactante y de la tensión aplicada a los sistemas. Debido a esta diversidad se procederá a segmentar el análisis en tres regiones agrupando por similitud en las señales (cantidad de tiempos de relajación presentes, cambios con el campo aplicado) lo que permitirá utilizar el mismo análisis para cada grupo:

- Bajas concentraciones de DTAB: desde ADN libre hasta 1 mM
- Concentraciones intermedias de DTAB: desde 1 mM (inclusive) hasta 1.7 mM

- Altas concentraciones de DTAB: 1.7 mM y 2.1 mM

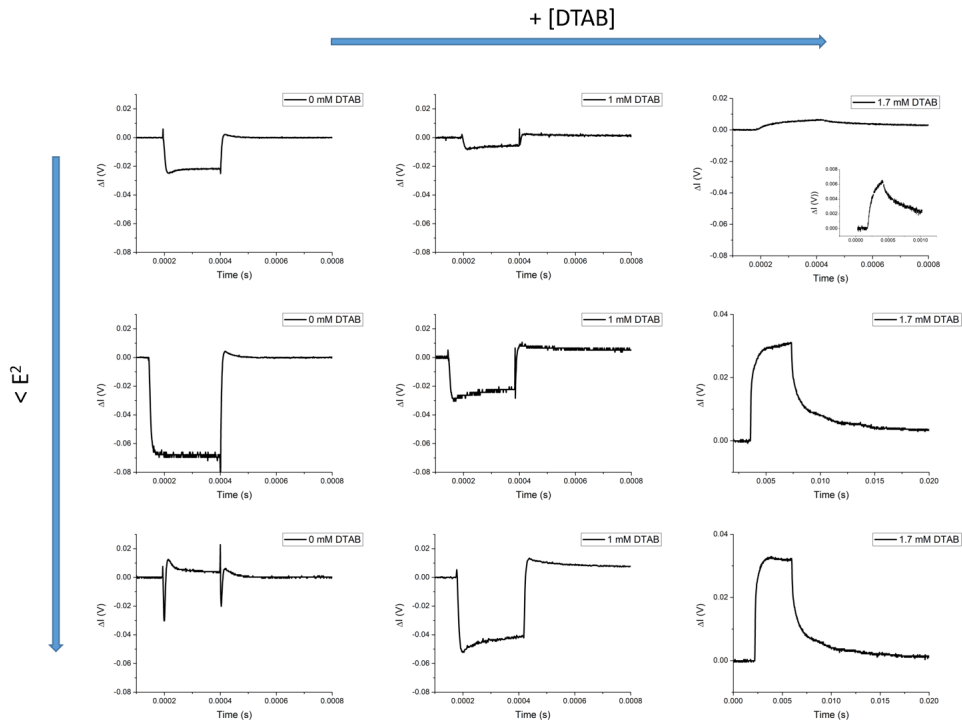


Figura 6.3: Resumen de la evolución de las señales de birrefringencia de una solución de ADN en función de la cantidad de DTAB presente y del campo aplicado

A continuación se mostrarán los resultados y análisis para la birrefringencia estacionaria y del régimen transitorio de los sistemas estudiados.

6.3.3. Birrefringencia estacionaria

A excepción de las mezclas con altas concentraciones de DTAB, todas las señales alcanzan un valor de birrefringencia estacionaria en el tiempo y rango de campo eléctrico aplicado. En la Figura 6.4(a) se muestra la variación de la birrefringencia estacionaria con el cuadrado del campo aplicado. Lo primero a notar es que, aunque sea en intervalos de E^2 , Δn varía linealmente con E^2 , lo que se espera de la ley de Kerr 2.15

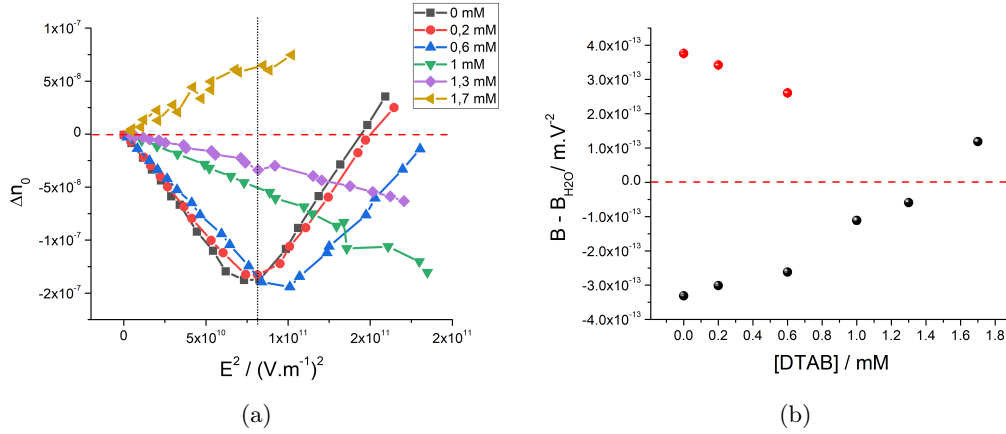
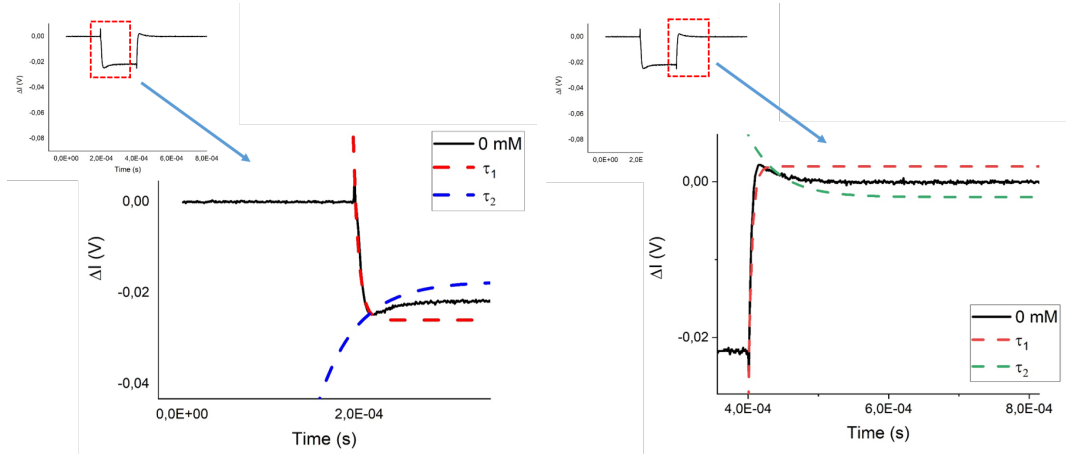


Figura 6.4: (a) Birrefringencia estacionaria en función del cuadrado del campo aplicado (b) Constantes de Kerr para los sistemas ADN/DTAB en función de la concentración de DTAB

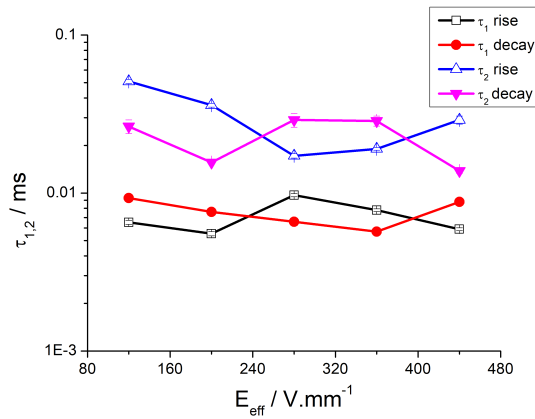
Las mezclas con bajas concentraciones de DTAB se caracterizan por presentar señales cuya birrefringencia estacionaria es negativa y decreciente, cambiando la tendencia a partir de un cierto valor de campo y llegando a ser positiva para los campos más intensos. Para las mezclas con concentraciones intermedias, se mantienen negativas en todo el rango, pero la variación es menor en valor absoluto. Para altas concentraciones, en los casos en los que se alcanza un estacionario, la birrefringencia siempre es positiva y de tendencia creciente. Para el caso de 1.5 mM la birrefringencia estacionaria es cercana a cero en el rango de campos estudiados y para 2.1 mM las señales de birrefringencia se ven alteradas porque el pulso orientador no es perfectamente cuadrado debido a que la alta concentración de iones provistos por el surfactante vuelve a la solución conductora.

En la Figura 6.4(b) se observan las constantes de Kerr obtenidas a partir de ajuste lineal de las curvas mostradas en la Figura 6.4(a). Para los sistemas con baja concentración de DTAB que presentan un cambio de tendencia se ajustaron dos rectas y se obtuvieron dos constantes de Kerr, una positiva y una negativa. Se puede observar que son prácticamente simétricas alrededor del valor de $B - B_0 = 0$ (Figura 6.4(b)). A medida que aumenta la concentración de DTAB presente en la mezcla, las constantes disminuyen en valor absoluto, volviéndose la muestra menos birrefringente en el estado estacionario, hasta desaparecer para 1 mM DTAB, cuyo $\Delta n \sim 0$ para la rama positiva de la Figura 6.4(b) (puntos negros). La rama negativa, continua disminuyendo en valor absoluto hasta que cambia de signo para altas concentraciones de DTAB (puntos rojos, Figura 6.4(b)).



(a) Esquema de tiempos de relajación de build up

(b) Esquema de tiempos de relajación



(c)

Figura 6.5: Esquema de las exponenciales necesarias para describir el (a) build up y (b) la relajación señal de birrefringencia obtenida a 350 kV/m.(c) Tiempos de relajación para el sistema ADN + 0.2 mM DTAB en función del campo aplicado

6.3.4. Régimen transitorio

Análisis con exponenciales

En el sistema de ADN libre de surfactante como en las mezclas con bajas concentraciones de DTAB se observa que el régimen transitorio depende de la intensidad del campo aplicado, aunque la cantidad de relajaciones involucradas es la misma en el establecimiento de la birrefringencia (subida-build up) como en la relajación a la condición inicial (bajada) y parecen ser simétricas. Para los campos menos intensos, a simple vista se observan dos contribuciones (Figura 6.5(a) y 6.5(b)), una rápida y negativa (τ_1) y la otra más lenta y positiva (τ_2). Por lo tanto, se utilizaron ecuaciones de ajuste biexponenciales para la determinación de los tiempos característicos de las

relajaciones. En la Figura 6.5(c) se muestran estos parámetros en función del campo aplicado para la mezcla de ADN + 0.2 mM DTAB

Primeramente, se puede observar que las relajaciones de subida como las de bajada no presentan una dependencia significativa con el campo eléctrico. A su vez, se distinguen dos regímenes, uno rápido con valores menores a 0.01 ms (τ_1 de subida y bajada) y otro más lento alrededor de 0.03 ms (τ_2 de subida y bajada), como ya se había notado previamente. Se puede observar que las relajaciones se agrupan de a pares subida-bajada, consecuencia de que la señal efectivamente presenta simetría.

Para campos más intensos, las señales manifiestan tres relajaciones tanto de subida como de bajada (ver Figura 6.6): una rápida y negativa al igual que antes τ_1 , una igual de rápida pero positiva τ_2 y otra más lenta y negativa τ_3 . Siguiendo la línea de análisis previa, se ajustaron multiexponenciales para obtener los tiempos de característicos de cada proceso; sin embargo, dado que la cantidad de puntos del primero era insuficiente para obtener un buen ajuste, se procedió a ajustar con una función biexponencial los otros dos procesos. Se observó también independencia con el campo aplicado. Para los tiempos de subida y bajada rápidos (τ_2) no se observó diferencia con respecto a las mediciones a campos bajo. Para el tiempo lento, τ_3 , los valores se ubicaron en (0.035 ± 0.005) ms

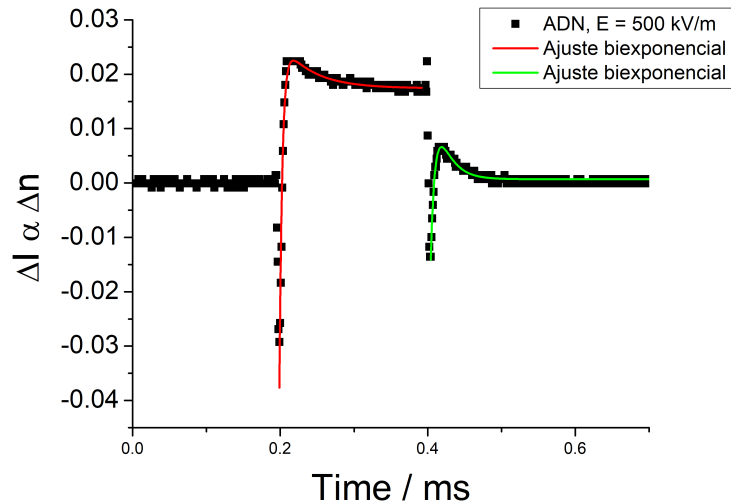


Figura 6.6: Señal de birrefringencia de ADN libre a un campo aplicado efectivo de 500 kV/m, se observan tres tiempos de relajación característicos en la subida como en la bajada, dos rápidos y de signo contrario y uno más lento y negativo.

En el caso de las mezclas con concentraciones intermedias de DTAB (1, 1.3 y 1.5 mM) la cantidad de relajaciones de subida como de bajada no se vieron alteradas por el campo eléctrico aplicado en casi todas las medidas. En el rango estudiado, se tuvieron dos relajaciones para cada parte de la señal: una rápida y negativa (τ_1) y una más lenta

y positiva. A su vez, en estos sistemas se observó que las relajaciones de bajada no regresaban al estado isotrópico original, sin embargo, no se manifestaron diferencias en el proceso intercalado de medición (ver Metodología y Métodos), por lo tanto se concluye que el sistema relajó completamente en un tiempo mayor al de la ventana temporal de medición y no resultó alterado en su estructura de forma permanente por el proceso de medición. Se ajustaron los transitorios con multiexponenciales y se obtuvieron los tiempos característicos τ_i para los procesos involucrados tanto en el build-up como en la relajación. En la Figura 6.7(a) se muestran los tiempos obtenidos para una mezcla de ADN + 1.3 mM DTAB:

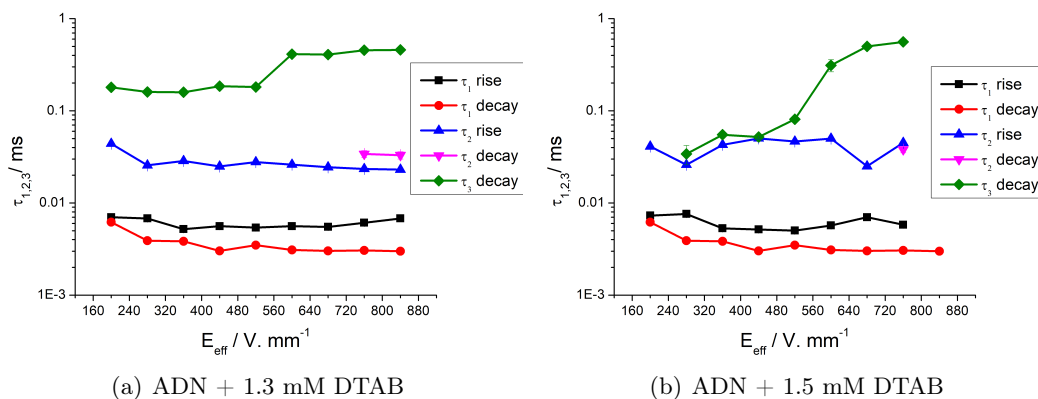


Figura 6.7: Tiempos de relajación para el sistema ADN + (a) 1.3 mM DTAB y (b) 1.5 mM DTAB en función del campo aplicado

Se observa que el proceso rápido y negativo, τ_1 , relaja en el mismo tiempo tanto para la subida como para la bajada y se mantiene en valores similares a los obtenidos para las mezclas de baja concentración de DTAB. En cambio, no se observó esta coincidencia en los tiempos de bajada lentos y positivos de subida y bajada en la mayor parte del rango de campos estudiado. El tiempo de subida más lento y positivo caracterizado por τ_2 *rise* coincide con los tiempos observados en el sistema de baja concentración de DTAB (llamados de la misma forma). Al tiempo de bajada más lento y positivo se lo llamó τ_3 *decay* ya que difiere del de subida en un orden de magnitud. Es más, para campos más intensos se necesitó incluir en los ajustes de las relajaciones de bajada un tercer tiempo característico τ_2 *decay*, cuyo valor obtenido del ajuste coincide con el τ_2 *rise*, por lo que puede ser que la relajación de bajada correspondiente a este proceso se haya encontrado tapada por la de un proceso más largo y lento caracterizado por τ_3 *decay*.

Siendo ligeramente distinto el comportamiento de τ_3 *decay*, se muestra en la Figura 6.7(b) el caso de la mezcla de ADN + 1.5 mM DTAB. Este proceso muestra una dependencia del tiempo de relajación con el campo eléctrico, a diferencia de los demás, y es curioso que para campos poco intensos coincida con el tiempo de relajación de subida positivo τ_2 *rise* y luego se despegue progresivamente a medida que el campo se

intensifica hasta alcanzar el valor observado para la mezcla de ADN + 1.3 mM DTAB.

Finalmente para las mezclas con altas concentraciones de DTAB, se muestran en la Figura 6.8 los tiempos obtenidos para la solución ADN + 1.7 mM DTAB

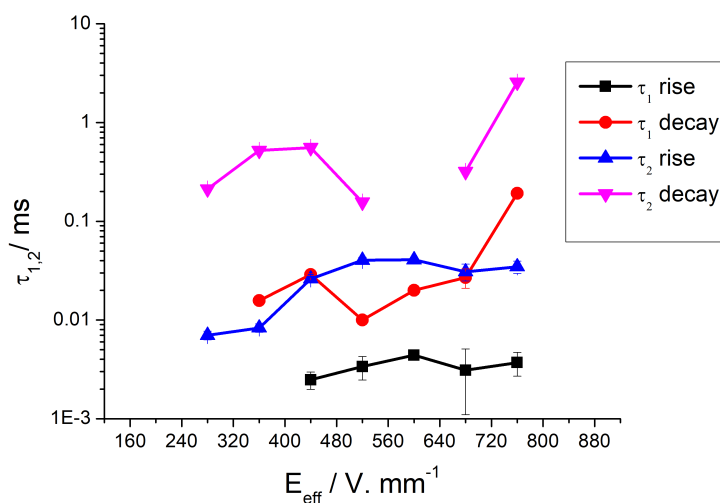


Figura 6.8: Tiempos de relajación para el sistema ADN + 1.7 mM DTAB en función del campo aplicado

A las señales obtenidas para la muestra de 2.1 mM DTAB se realizó un ajuste biexponencial en la relajación de bajada y únicamente se consideró para el análisis el tiempo de relajación más lento, ya que el sistema no llega al estacionario y por lo tanto no se pueden ajustar las relajaciones de subida como tampoco comparar los valores del tiempo de bajada más rápido.

Con los datos de los tiempos de relajación de bajada y utilizando la ecuación dada por Broersma ¹ (ec.2.21) se calcularon las longitudes del agregado (considerado como un cilindro) para los tiempos rápidos y lentos obtenidos de los ajustes, para dos valores de diámetro de cilindro de 2 y 5 nm. Estos valores para el diámetro se eligieron por los resultados de dispersión de luz dinámica obtenidos para estos sistemas en el estudio de la referencia [7]. Los resultados se muestran en las Tablas 6.9 y 6.10, no se realizó distinción por campo debido a que en la región donde el modelo es aplicable, el campo no afecta significativamente los tiempos de relajación.

¹Recuerde que la ec. de Broersma da el tiempo característico de relajación difusional de un cilindro en un medio viscoso, en términos del cociente $\frac{L}{d}$, siendo L el largo del cilindro y d el diámetro

[DTAB]	$\tau_{\text{trap}} / \text{ms}$	L / nm	
		d = 2 nm	d = 5 nm
0 mM	0,00476	64	54
0.2 mM	0,00657	73	62
0.6 mM	0,005	66	55
1 mM	0,0054	68	57
1.3 mM	0,0039	60	50
1.5 mM	0,01	86	73
1.7 mM	0,0036	58	48

Figura 6.9: Tiempos de relajación rápidos ajustados por la ecuación de Broersma para las mezclas de ADN con distintas concentraciones de DTAB

Para los tiempos rápidos se puede notar que los valores obtenidos a través de la ecuación de Broersma coinciden en su mayoría con la longitud de persistencia del ADN. En cambio, los tiempos lentos son anormalmente altos y pueden indicar la relación con interacciones intermolécula debido a que las soluciones se encuentran en régimen semidiluido.

[DTAB]	$\tau_{\text{largo}} / \text{ms}$	L / nm	
		d = 2 nm	d = 5 nm
0 mM	0,0306	129	113
0.2 mM	0,029	127	112
0.6 mM	0,0181	106	93
1 mM	0,055	161	143
1.3 mM	0,16	239	215
1.5 mM	0,97	460	423
1.7 mM	0,212	561	607
2.1 mM	0,487	765	840

Figura 6.10: Tiempos de relajación lentos ajustados por la ecuación de Broersma para las mezclas de ADN con distintas concentraciones de DTAB

Análisis con modelos

Como se ha mencionado previamente, el ajuste con modelos permite darle un significado físico a los parámetros del ajuste. El Modelo 1 (ec. 6.2) ajustó correctamente las relajaciones de subida de las señales de ADN y las mezclas con 0.2 mM y 0.6 mM de DTAB hasta la región del cambio de tendencia observada a campos altos (ca. 350 kV/m). Para las mezclas con 1 mM y 1.3 mM, la bondad del ajuste siguió siendo alta (R^2 cercano a 0.9) pero la combinación de parámetros no llega a reproducir en su totalidad la forma de la curva. Las relajaciones de subida para las mezclas con 1.7 mM de DTAB se pudieron ajustar en un estrecho rango de campos debido a que no todas las señales presentaban un estacionario de birrefringencia o eran demasiado ruidosas; a su vez el

modelo no llega a describir correctamente la forma de la curva. En las Figuras 6.11(a) y 6.11(b) se observan los resultados de los parámetros ajustados con el Modelo 1, R y D , para las relajaciones de subida en función del campo aplicado sobre el ADN libre y las mezclas con surfactante.

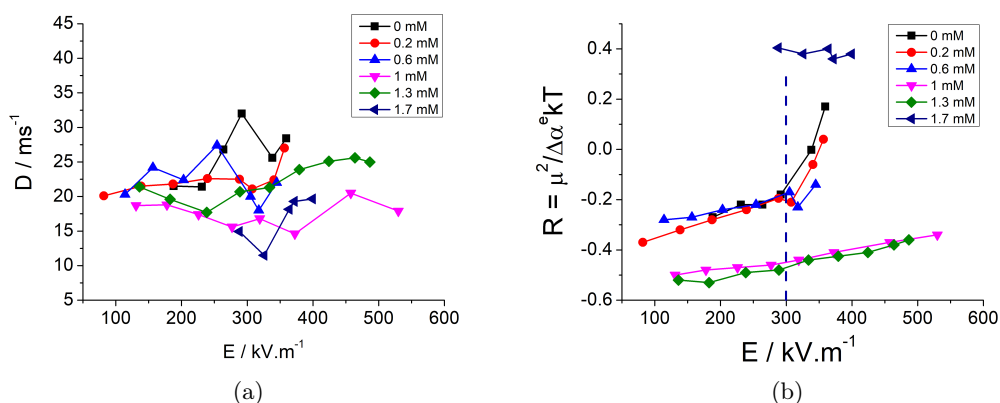


Figura 6.11: (a) Coeficiente de difusión rotacional y (b) relación entre dipolos permanentes e inducidos en función del campo efectivo aplicado para cada uno de los sistemas con ADN estudiados. La línea punteada indica el cambio de tendencia en R en las mezclas con baja concentración de DTAB. Las barras de error se quitaron para mayor claridad de la imagen (error de ajuste $\sim 5\%$)

Como se puede observar en la Figura 6.11(a), los sistemas que presentan mayor variabilidad en el coeficiente D son los sistemas con bajas concentraciones de DTAB, variando entre 17 y 30 ms^{-1} en el rango estudiado. Para la mezcla con 1 mM, D permanece prácticamente constante con el campo, ubicándose alrededor de 18 ms^{-1} , similar al sistema con 1.3 mM ubicado alrededor de 20 ms^{-1} . Para las concentraciones más altas, la variabilidad va de 12 a 20 ms^{-1} . En general, estos sistemas no presentaron una dependencia clara respecto al coeficiente difusión rotacional. Sin embargo, con el parámetro R (ec. 6.1) se observa un comportamiento particular para cada región de concentraciones. Para las concentraciones bajas, a medida que aumenta el campo aplicado, R crece desde aproximadamente -0.3 a 0. Esto coincide con la presencia y el paso de dos tiempos característicos a uno con el aumento en la intensidad del campo, exhibidos en la Figura 6.3 para la muestra de ADN libre. La transición se encuentra para un campo aplicado de alrededor de 300 kV/m , cercano al campo aplicado (280 kV/m) en el que se produce el cambio de tendencia en la birrefringencia en la Figura 6.4(a) para estos sistemas.

Para las muestras con c_s : 1 mM y 1.3 mM se observa un aumento prácticamente lineal desde -0.5 a -0.4 para el rango de campos estudiado. Para las concentraciones más altas, R se ubica en valores positivos y constantes, alrededor de 0.4.

El Modelo 2 de subida, tal como se mencionó en el apartado de Materiales y métodos, incluye una modificación por el agregado de interacciones interpartículas codificadas en el parámetro δ , propias de una solución en régimen semidiluido. En las Figuras 6.12(a) y 6.12(b) se observan los resultados de los ajustes de los parámetros D y δ/β respectivamente, con β la contribución de los dipolos permanentes. No se muestra los resultados para R en este modelo porque reproducen el comportamiento del Modelo 1 (ver Figura 6.11(b))

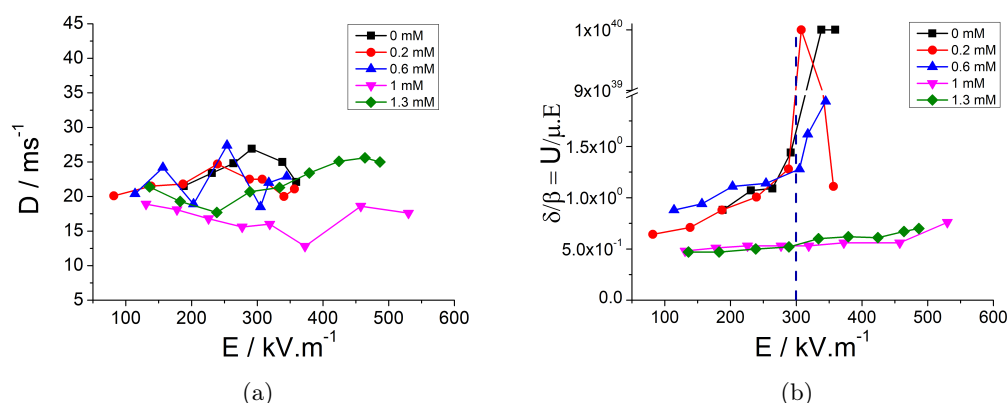


Figura 6.12: (a) Coeficiente de difusión rotacional y (b) relación entre la interacción interpartícula y los dipolos permanentes en función del campo efectivo aplicado para cada uno de los sistemas con ADN estudiados. La línea punteada indica el cambio de tendencia en δ/β en las mezclas con baja concentración de DTAB. Las barras de error se quitaron para mayor claridad de la imagen (error de ajuste $\sim 5\%$)

Comparando con el Modelo 1, la variabilidad de D para este modelo es un poco menor para la solución de ADN libre y con 0.2 mM de DTAB. Para los demás sistemas, los ajustes no dieron grandes cambios respecto a este parámetro. Debido a que δ aparece acoplado a β en el modelo, se graficó el cociente entre ambos en la Figura 6.12(b); se observa que para las soluciones de ADN libre y con bajas concentraciones de DTAB, δ/β crece hasta cierto valor de campo, en el que se dispara de forma singular, indicando o que $\delta = \infty$ o que $\beta = 0$. Estos valores singulares guardan relación con lo que sucede para el parámetro R en el ajuste del Modelo 1. Para las concentraciones intermedias de DTAB, 1 mM y 1.3 mM, el comportamiento es prácticamente el mismo que R en el rango estudiado, con una leve tendencia ascendente lineal entre 0.5 y 0.6. Las concentraciones altas (1.7 mM) no permitieron el ajuste ya que la introducción del parámetro δ/β introducía codependencia con R y D.

Respecto a las relajaciones de bajada, con el Modelo 1 se ajustaron las relajaciones correspondientes a los tiempos más largos debido a que únicamente contempla la relajación del proceso de rotación de las partículas al estado isotrópico. En las Figuras 6.13(a) y 6.13(b) se observan los resultados de los ajustes de los parámetros de

stretching θ y el coeficiente de difusión rotacional respectivamente.

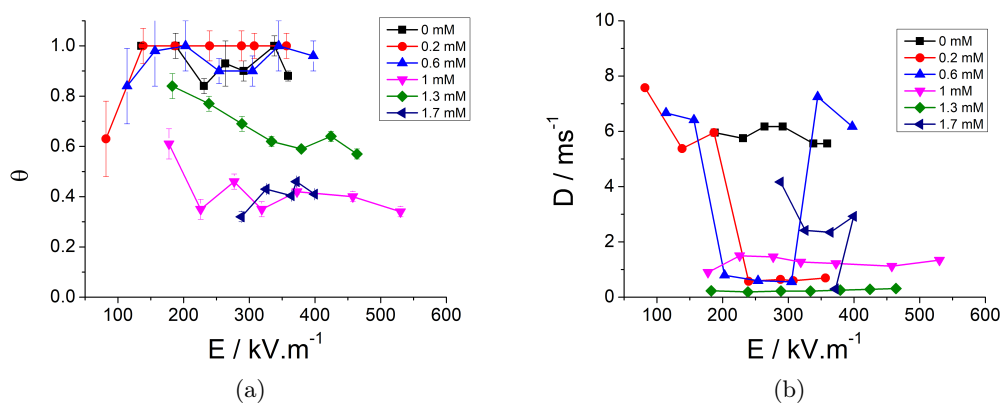


Figura 6.13: (a) Coeficiente de estiramiento y (b) Coeficiente de difusión rotacional en función del campo efectivo aplicado para cada uno de los sistemas con ADN estudiados.

Se puede notar que los coeficientes de estiramiento se encuentran entre 0.9 y 1 para los sistemas de bajas concentraciones de DTAB. Para campos menores a 150 kV/m la curva de relajación es ruidosa y la pobre bondad del ajuste, por lo que los resultados de 0.62 para la mezcla con 0.2 mM de DTAB y 0.82 para la de 0.6 mM de DTAB se pueden considerar fuera de rango. Para los sistemas con concentraciones 1 mM y 1.3 mM se observa que el coeficiente disminuye con el aumento del campo y que los segundos resultan ser más rígidos que los primeros, variando entre 0.84 y 0.57 para 1.3 mM de DTAB y entre 0.61 y 0.34 para 1 mM de DTAB. Para altas concentraciones se nota un valor poco variable en el rango en que se pudo ajustar, similar al obtenido para 1 mM de DTAB en ese rango, entre 0.32 y 0.46.

En relación a los coeficientes de difusión rotacional D se puede mencionar que los valores difieren significativamente de los obtenidos para las relajaciones de subida. Asimismo no son demasiado concluyentes en la tendencia para las mezclas con concentraciones bajas de DTAB. En todos los casos se observan que D es menor para las mezclas con DTAB que para el ADN libre.

Para intentar reproducir la totalidad de la curva de relajación de bajada, se ajustaron con el Modelo 2 (ec. 6.5). Se dejó R fijo (utilizando como entrada los valores obtenidos en las subidas) y los parámetros obtenidos del ajuste resultaron en D , δ y $A = \frac{5}{\beta(R^{-1}+1)}$. Se realizaron dos ajustes, uno considerando a A como un parámetro y otro desdoblándolo en lo que es y dejando variar β . Sin embargo, en ambos casos de ajustes, D , δ y A (o β) presentaron codependencia en el ajuste, a excepción de los sistemas con 1 mM, 1.3 mM y 1.7 mM de DTAB. Por lo tanto, se mostrarán para todos los casos de estudio D (Figura 6.14(a) y 6.15(a)), el producto $\delta\cdot A$ (Figura 6.14(b)) o δ/β (Figura 6.15(b)).

Modelo 2 con A:

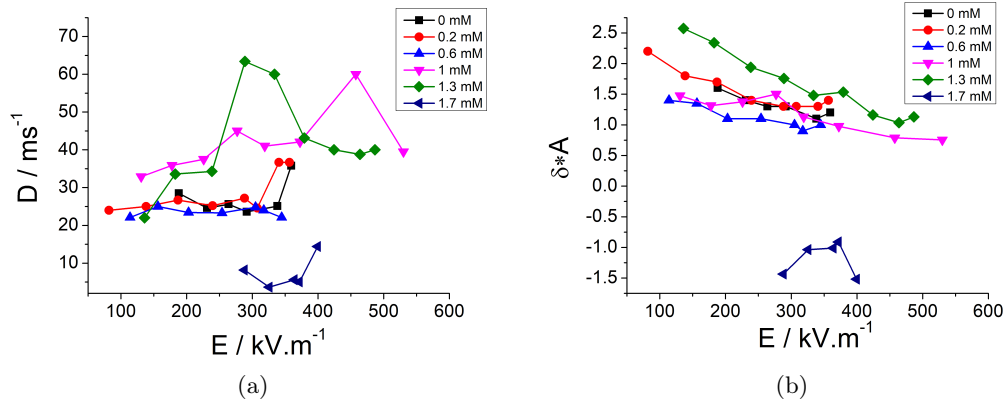


Figura 6.14: (a) Coeficiente de difusión rotacional y (b) producto del parámetro A con la energía de interacción interpartículas δ en función del campo efectivo aplicado para cada uno de los sistemas con ADN estudiados.

Modelo 2 con β :

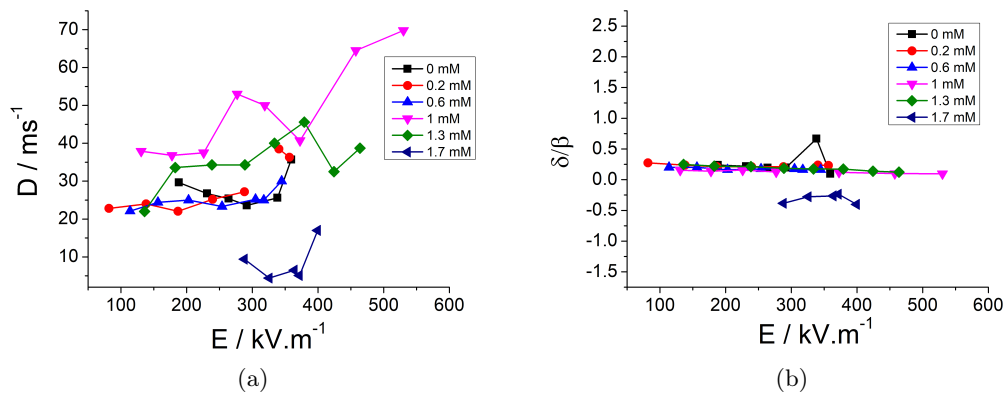


Figura 6.15: (a) Coeficiente de difusión rotacional y (b) cociente de la energía de interacción interpartículas δ con la contribución por dipolos permanentes β en función del campo efectivo aplicado para cada uno de los sistemas con ADN estudiados.

En ambos ajustes, el modelo reprodujo correctamente la forma de las relajaciones de las mezclas con bajas concentraciones de DTAB. Al igual que para las subidas, el modelo presenta inconvenientes para seguir las relajaciones largas que presentan los demás sistemas, por lo que la bondad del ajuste de los mismos se encuentra entre R^2 0.7 y 0.85. Para ambos ajustes, el coeficiente de difusión en los sistemas sin DTAB y

con 0.2 mM y 0.6 mM DTAB presentó un valor constante, presentándose un aumento del mismo al superar lo 350 kV/m, en las inmediaciones del cambio de tendencia de la birrefringencia estacionaria (ver Figura 6.4(a)).

6.4. Discusión

En primer lugar se analizará la progresión de la birrefringencia estacionaria. En general, a excepción de campos altos (>800 kV/m) se puede observar como se pasa de un sistema que presenta birrefringencia negativa a uno con birrefringencia positiva con el agregado subsecuente de DTAB (Figura 6.3). Recordando lo expuesto en el Capítulo 2 en la ec. 2.16, la birrefringencia viene dada por el producto de la anisotropía óptica intrínseca ($\Delta\alpha^0$) y el factor de orientación Φ , $\Delta n(t) = \Delta\alpha^0 \Phi(t)$. Por lo tanto, una birrefringencia negativa se debe a que la anisotropía óptica ($\Delta\alpha^0$) y el factor orientador Φ (que contiene el término de anisotropía eléctrica $\Delta\alpha^e$) son de signos opuestos.

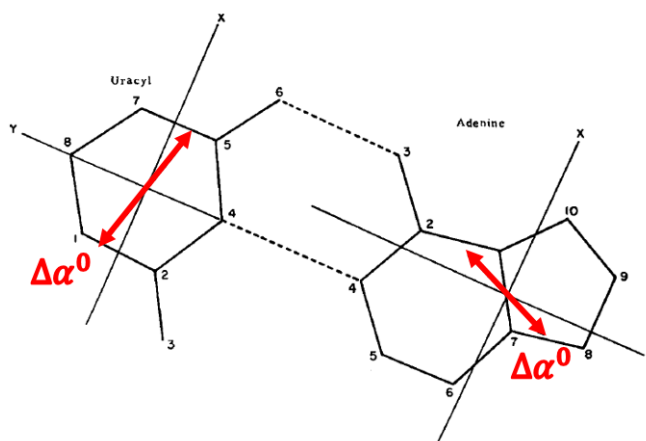


Figura 6.16: Par de bases nitrogenadas, se marca en rojo las direcciones de polarización óptica de cada base de acuerdo a los cálculos efectuados por Takashima et al. [30]. Se observa que los dominios están contenidos en el plano que definen las bases.

Debido a la simetría helicoidal de la molécula de ADN y la larga longitud de persistencia, es altamente probable que en solución el ADN sea poco flexible y no haya presencia de dipolos permanentes. Esto es indicio de que el mecanismo orientador es debido a la polarización eléctrica inducida sobre los contraiones condensados en la molécula, como se ha mencionado para el sistema PAA-Gemini en el Capítulo 4. Por lo tanto, $\Delta\alpha^e > 0$ y el eje principal de la molécula se orienta paralelo al campo E. En consecuencia, $\Delta\alpha^0$ debe ser negativo. El origen de este comportamiento radica en la estructura química de las bases nitrogenadas, los anillos que componen la columna del ADN. Los mismos presentan anisotropía óptica en los ejes que determinan el plano que las contiene y no en la dirección normal, debido a la simetría que presentan los enlaces $\pi - \pi$, como se esquematiza en la Figura 6.16. Por lo tanto, las bases nitrogenadas agregan una fase a la luz que las atraviesa en la dirección transversal al eje principal

del ADN y por lo tanto $\Delta\alpha_{\parallel}^0 < \Delta\alpha_{\perp}^0$, tornando la birrefringencia en negativa [30]. La Figura 6.17 esquematiza el origen los dos términos de anisotropía y su la ubicación espacial de los fenómenos que les dan origen en presencia de un campo eléctrico.

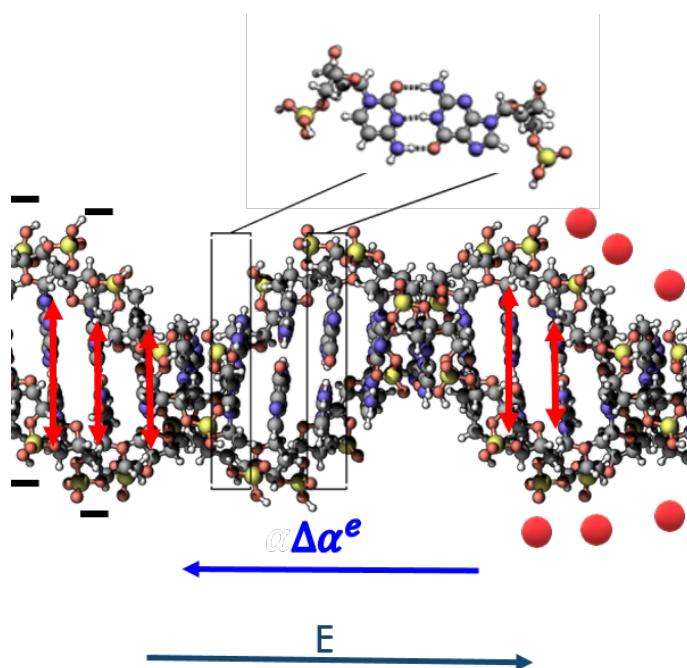


Figura 6.17: Esquema del fenómeno de polarización del ADN libre reportado. Al aplicar un campo eléctrico, los contraiones condensados (esferas rojas) se desplazan sobre la cadena, generando un desbalance de carga entre los extremos. Esto provoca una polarización inducida de la cadena y una orientación de la partícula en la dirección del campo. Por lo tanto, las bases nitrogenadas quedan perpendicular al campo al igual que la polarizabilidad óptica $\Delta\alpha^0$ de la partícula.

En el caso de estudio de esta tesis, con el agregado de DTAB hasta 0.6 mM no se producen cambios significativos en la birrefringencia estacionaria. Analizando la constante de Kerr (Fig. 6.4(b)) se observa una pequeña disminución hasta 0.6 mM, pero no tan abrupta como el cambio que se produce cuando la cantidad de surfactante en la mezcla es 1 mM, pasando de un valor de -2.7 a -1.1 m V^2 , casi tres veces menor. El cambio no es casual y se da en las inmediaciones de la CAC, reportada para este sistema por Jain et al. (ver Figura 6.18) [31, 7]. A partir de la CAC, los surfactantes condensados en la cadena favorecen la condensación de más moléculas tensoactivas, por lo que la asociación es de tipo cooperativa [32, 33], dando lugar a múltiples estructuras como micelas poliméricas o tipo collar de perlas (ver Figura 1.7 en el Capítulo 1). La presencia de mayor cantidad de moléculas surfactantes condensadas en la molécula polimérica produce una disminución en la birrefringencia estacionaria, como se puede ver en las Figuras 6.4(a) y 6.4(b). La condensación cooperativa de DTAB tiene un efecto de *ancla*

para la orientabilidad del ADN, ya que al asociarse más fuertemente que un contraión, se mueve menos a lo largo de la cadena, disminuyendo su potencial polarización en dicha dirección y por lo tanto, disminuyendo la orientabilidad del ADN. Esto alcanza su punto crítico, para la mezcla con 1.5 mM de DTAB, en la que prácticamente $\Delta n_\infty = 0$. Finalmente, al aumentar la concentración, para las mezclas con 1.7 y 2.1 mM de DTAB la birrefringencia es positiva en todo el rango de campos estudiado (aunque en el último caso no se alcanza un estado estacionario), por lo que la anisotropía óptica y el factor de orientabilidad coinciden en la misma dirección. En esta región es probable que se den agregados entre complejos ADN-DTAB. Esta afirmación encuentra sustento en que la zona de precipitado reportada para este sistema [31] se encuentra alrededor de 2 mM de DTAB. Asimismo, la ausencia de birrefringencia negativa también sería indicativo de la presencia de agregados de varias hebras de ADN, con orientaciones aleatorias de las bases nitrogenadas que lo componen.

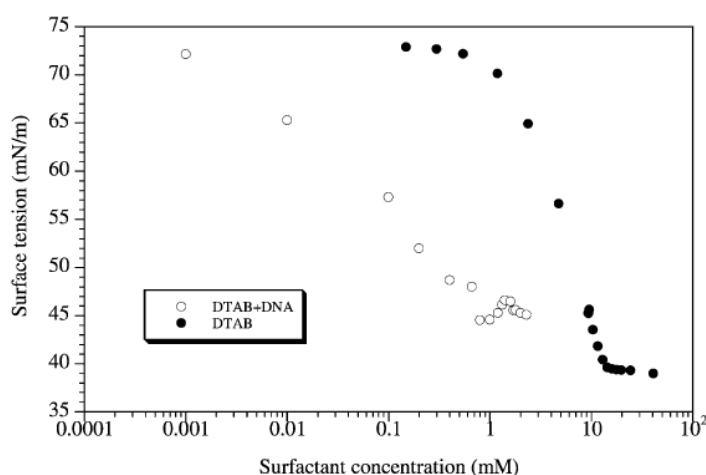


Figura 6.18: Isotermas de tensión superficial para el sistema ADN/DTAB. Se muestra en puntos negros la isoterma correspondiente al DTAB libre. Tomado de la referencia [31].

Del análisis de la birrefringencia transitoria, para sistemas cuya c_s es menor a 1 mM (CAC), se evidencia que las señales son simétricas, o sea que la forma de las relajaciones de subida son las mismas que las de bajada salvo un signo de diferencia. Esto es evidencia de que el mecanismo orientador está dominado por dipolos inducidos, ya que se establecen al aplicar el campo y desaparecen al retirarse; por lo que la vuelta al estado isotrópico de la solución se da únicamente por agitación térmica. La explicación se encuentra en que el agregado de DTAB por debajo de la CAC no altera la estructura, sino que reemplazan progresivamente los iones Na^+ condensados en el ADN, manteniéndose la simetría axial. Con lo dicho, se esperaría que la molécula de ADN (sin y con DTAB hasta la CAC) fuera estrictamente una barra rígida, orientada por la polarización de los contraiones a lo largo de la dirección axial. De esta forma se

observaría una señal de birrefringencia con un único modo de relajación de subida como de bajada (caracterizado por un único tiempo), como han demostrado otros trabajos [34, 35]. Sin embargo se observan dos relajaciones, una negativa y rápida, y una positiva más lenta (para campos menores a 300 kV/m). Se ha observado para fragmentos más largos de ADN la presencia de dos tiempos de relajación, usualmente atribuidos a la flexibilidad cinética de los mismos, pero no de signos contrarios [13]. Manning describe este fenómeno como **birrefringencia anómala** y lo atribuye a la polarizabilidad perpendicular de los contraiones condensados en un conjunto de barras rígidas paralelas de diámetro del orden de la longitud de la barra [36]. Esta idea puede ampliarse diciendo que una polarización de los contraiones perpendicular al eje principal del polímero surge cuando los contraiones condensados están lo suficientemente cerca de una macromolécula vecina, de modo que la barrera energética para abandonar la molécula en la que están condensados puede superarse a medida que estos iones se condensan en un sitio equivalente en la molécula vecina. Este tipo de comportamiento se ha observado en arcillas y micelas en un determinado rango de concentración en la que la distancia media entre las partículas era del orden de la longitud de los coloides, como plantea Manning. Una medida de la distancia entre partículas es la longitud de correlación ξ que, para este sistema a la concentración que se realizaron las soluciones, es de 90 nm aproximadamente. Como se puede notar, $L = 102 \text{ nm} \sim \xi$, por lo que una explicación plausible es que para la concentración de trabajo del ADN se cumple la condición de Manning. Otra posible explicación para este fenómeno es que las doble capas eléctricas del ADN a lo largo del eje principal se superpongan cuando las moléculas se alinean [37] paralelamente al campo. Para una solución diluida, las capas difusas no se solapan y los contraiones condensados tienden a orientar a la partícula hacia los electrodos correspondientes dando lugar a un momento dipolar inducido en la dirección del campo; alineando a las partículas paralelo a él, mientras que los contraiones libres polarizan las partículas en dirección perpendicular. En cambio, cuando la concentración de partículas aumenta, el momento dipolar inducido a lo largo del eje principal (que da origen al ordenamiento de las bases nitrogenadas y su correspondiente contribución negativa) se ve disminuido por la superposición de contraiones en la zona de solapamiento. El solapamiento de las capas dobles difusas conduce a que los contraiones de una partícula que migran hacia un electrodo sean reemplazados por los provenientes de la partícula adyacente, provocando un desbalance en el proceso de orientación en la dirección del eje principal. Esto lleva a una reducción de la polarización total a lo largo de su eje principal, pero no a lo largo de su eje corto, ya que en esta dirección las capas dobles no se solapan. Como consecuencia, la polarización para una fracción de las partículas se hace mayor en la dirección perpendicular que en la paralela y el resultado es que estas partículas se alinean perpendicularmente al campo, apareciendo el efecto de anomalía, caracterizado por ser más lento. Esta suposición ha sido apoyada por mediciones de otros grupos que mostraron que la polarizabilidad eléctrica de las partículas cargadas disminuye drásticamente cuando las dobles capas eléctricas comienzan a superponerse [38–40]. Evidencia adicional en este sentido es el hecho que la longitud correspondiente obtenida de la ecuación de Broersma (ec. 2.21) para los tiempos rápidos coincide con la longitud R_{ee} , demostrándose que este proceso se corresponde únicamente con la

orientación de la molécula de ADN.

Para campos altos (mayores a 300 kV/m) se observan tres tiempos de relajación característicos, del mismo valor para la subida como para la bajada. Este fenómeno no se ha podido explicar con seguridad ya que se ha observado en contados casos un comportamiento similar [41].

En las mezclas con 1, 1.3 y 1.5 mM de DTAB, las señales presentan los dos tiempos de subida (τ_1 rápido y negativo, τ_2 lento y positivo), al igual que en las mezclas con menor cantidad de DTAB. Son de índole *anómala* según lo definido en los párrafos anteriores, pero no se observa la aparición de un tercer tiempo característico con la aplicación de campos intensos. Observando los tiempos de relajación de bajada, se nota que también son dos para la mayor parte de los campos aplicados; sin embargo las señales dejan de ser simétricas. El tiempo lento y positivo de bajada no guarda relación con τ_2 de subida, sino que es un orden de magnitud más lento (ver Figura 6.7(a)). En esta región, el DTAB se une al ADN cooperativamente, superando el 75 % de iones condensados de la zona pre-CAC. Es posible que se den agregados entre complejos ADN-DTAB, lo que explicaría el aumento de un orden de magnitud en los tiempos de relajación, debido a un mayor tamaño de agregado o de polidispersidad en el tamaño de los mismos. Aunque también puede resultar de una flexibilización de la cadena de ADN por una disminución en la repulsión de los grupos fosfato debido a la mayor compensación de cargas por las moléculas de DTAB. También cabe destacar que las relajaciones de bajada no vuelven al estado isotrópico $\Delta n = 0$, en ausencia de campo en la ventana temporal medida. Este hecho es comúnmente atribuido a un cambio en la estructura o el deterioro de la muestra, aunque este último caso es menos probable por la consistencia obtenida a través del método de medición (ver apartado de Materiales y Métodos)

Para las mezclas con concentraciones altas de DTAB los mecanismos de orientación difieren respecto a los demás ya que las señales son positivas. La formación de agregados de complejos ADN-DTAB es evidente debido a que la solución medida se vuelve turbia lechosa. Gorelov et al [7] han reportado una disminución en la movilidad electroforética de los complejos con el aumento de la concentración de DTAB a partir de la CAC. Dias et al. [1] también han reportado que entre 1.8 mM y 2 mM se está en las inmediaciones de la zona de precipitado. Todo esto es evidencia de que la repulsión electrostática superficial de los complejos es lo suficientemente baja como para la formación de agregados, evidenciado por los largos tiempos de relajación observados en las señales de efecto Kerr. Estos complejos distan de ser rígidos por la asimetría evidente de las señales, a su vez, tampoco vuelven al estado isotrópico en el tiempo medido. Para la concentración de 2.1 mM de DTAB ni siquiera alcanza el estacionario de birrefringencia, aumentando continuamente en el tiempo que dura la aplicación del pulso. Esto es clara evidencia de un agregado flexible, deformable, ya que se sigue orientando a medida que se estira. Si se supone que son monodispersos y admiten una simetría axial, los tamaños serían del orden del medio micrón según el modelo de Broersma.

Con la implementación de modelos de ajuste en los transitorios de las curvas de birrefringencia se puede acceder a información física del sistema y de los procesos que dan lugar a las señales obtenidas. Según la interpretación del Modelo 1 (ec. 6.2), el parámetro R da el cociente entre la anisotropía eléctrica debida a un dipolo permanente y la debida a dipolos inducidos. Para el caso del ADN libre y las mezclas con concentraciones bajas de DTAB, al observar el parámetro R , se concluye que existen dos contribuciones a la birrefringencia, contrarias y que varían con el campo: una debido a un dipolo inducido en la dirección del campo y otra que actuaría como un pseudo dipolo permanente. El origen de este comportamiento tipo "dipolo permanente" dependiente del campo entra en contradicción con lo que se ha reportado acerca de la alta simetría de la molécula de ADN. Sin embargo, no es la primera vez que se utiliza este concepto para explicar la fenomenología observada del ADN libre por efecto Kerr [42]. Usualmente, para cadenas largas de ADN, con más de 300 pares de base, se lo relaciona con la aparición de dominios internos debido a que se supera la longitud de persistencia del sistema y la cadena se vuelve menos rígida [24]. Otras explicaciones proponen una sustitución del ideario de barra rígida por una "doblada"; simulaciones computacionales han reproducido el comportamiento observado utilizando una configuración de monómeros unidos formando una \mathbf{V} con un ángulo de 120° y un dipolo inducido como el del ADN y uno permanente en la dirección que une las puntas de la \mathbf{V} [43], siendo esta asimetría morfológica la que permitiría el establecimiento de dominios que den lugar a un dipolo permanente.

Descartada la propuesta de dipolo permanente para este sistema, se concluye que el mecanismo de orientación es debido al establecimiento dos dipolos inducidos: uno, $\Delta\alpha^e_{rap}$ que polariza rápido en la dirección del eje principal de la cadena (contraiones condensados) y el otro, $\Delta\alpha^e_{len}$, que lo hace en la dirección perpendicular (contraiones condensados que rompen la barrera energética entre moléculas de ADN), siendo este último más lento en el establecimiento de la polarización, representado por el parámetro β . En la Figura 6.19 se condensa la discusión previa, ubicando las partículas orientadas en un campo eléctrico y marcando las posibles direcciones en las que los contraiones polarizan.

Uniendo información de los dos modelos de subida, se observa que $\Delta\alpha^e_{len}$ es el que produce la variabilidad de las señales en función del campo eléctrico ya que es el parámetro que coincide en ambos modelos. Según lo observado en la Figura 6.11(b), actuando como numerador en el parámetro R , tiende a 0 a medida que el campo aumenta y en la zona de inversión (ver Figura 6.4(a), $E \sim 300$ kV/m) provoca que R se vuelva 0. En el Modelo 2, el cociente de interacciones interpartículas (δ) y dipolos permanentes (β) (actúa como denominador) crece con el campo, provocando que el cociente tienda abruptamente a infinito en las inmediaciones 300 kV/m. Este comportamiento se puede interpretar como la saturación en la polarización debida a $\Delta\alpha^e_{len}$. A medida que aumenta la intensidad de campo $\Delta\alpha^e_{rap}$ continúa aumentando su valor, mientras que la polarización perpendicular se va alineando progresivamente con el eje principal de la cadena, hasta quedar paralela a ella, saturando su valor. Los coeficientes de difusión rotacional tanto para el Modelo 1 como 2 de bajada, no presentan variaciones

significativas o tendencias en función del campo ni de la concentración para el rango de concentraciones estudiadas. Por lo que no se mencionará en el posterior análisis.

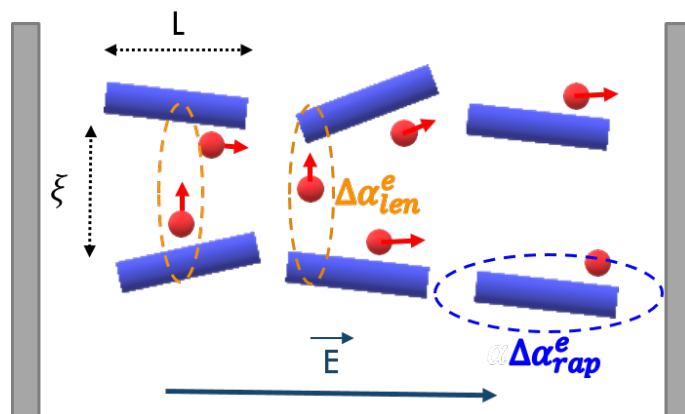


Figura 6.19: Esquema del proceso de establecimiento de los dipolos inducidos. En un sistema que cumple que $L \sim \xi$, según Manning, se establece el típico dipolo inducido en la dirección del campo por la polarización de los contraiones condensados y, al establecerse un arreglo de partículas paralelas, los contraiones pueden saltar también cadenas paralelas, generando un dipolo inducido pero en la dirección perpendicular al campo. El tiempo de establecimiento de esta polarización es más lento porque depende del establecimiento y orientación que genera la primera.

Para los sistemas con concentraciones intermedias de DNA, los modelos de subida evidenciaron que los parámetros R y del δ/β no presentan diferencias en el comportamiento entre las mezclas (ver modelo 2 de subida ec. 6.3). Para todas ellas, R se mantuvo en valores negativos con una leve variación creciente con el campo, pasando de -0.5 para campos bajos a -0.4 para los más altos. Como se ha explicado, la gran variabilidad de R (o δ/β) se debe a la saturación del dipolo inducido lento. El agregado de DTAB por encima de 1 mM anula en gran parte el mecanismo que hace saturar el término $\Delta\alpha_{len}^e$ para campos bajos. La presencia de DTAB por encima de la CAC produce que la compensación de cargas del ADN sea mayor, ya que las moléculas DTAB se agregan de forma cooperativa a la cadena, condensándose efectivamente en ella. Esto inevitablemente produce una reducción en la repulsión entre las cadenas de ADN y provoca que se acerquen. Esto aumenta la intensidad de los dipolos inducidos en la dirección perpendicular, $\Delta\alpha_{len}^e$, provocando que el campo aplicado tenga menor influencia. A su vez, la condensación efectiva de los iones DTA⁺ en la cadena provoca menor movilidad de contraiones en la dirección de la cadena y por lo tanto, menor contribución a $\Delta\alpha_{rap}^e$. La combinación de ambos efectos produce que R adquiera un valor con una variación lenta en el rango de campos aplicados.

Al analizar las relajaciones de bajada, se observa a través del parámetro θ del Modelo 1 que los complejos son flexibles respecto de las mezclas a concentraciones pre-

CAC; llegándose a obtener el menor valor de θ para $c_s = 1$ mM de DTAB. Como es esperable, al superar la CAC, las moléculas de DTAB tienden a agregarse cooperativamente al ADN y a disminuir la carga del mismo. Es posible que se reduzca la interacción entre los monómeros y los complejos sean más flexibles. Este resultado compromete la aplicación de los modelos que asumen rigidez de los complejos. Al aplicar el Modelo 2 de bajada, se observa una menor bondad en el ajuste, obteniéndose que el parámetro δ/β es constante con el campo, al igual que en la subida. Al comparar los coeficientes de difusión rotacional, se nota la mayor discrepancia entre los modelos, ya que para el modelo 1 de bajada, D es menor a la unidad y para el 2, se obtienen los mayores valores ajustados, entre 35 y 70 ms^{-1} .

Finalmente, al considerar el sistema con la mayor concentración de DTAB que se pudo ajustar, 1.7 mM, se encontró que el cociente R resultó mayor a cero, a diferencia de las mezclas anteriores, alrededor de 0.4. Es posible que la asociación de complejos, facilitada por la disminución en la repulsión electrostática por unión de DTAB a las cadenas, forme estructuras con ordenamientos internos aleatorios que disminuyan la anisotropía óptica intrínseca proveniente de las bases nitrogenadas del ADN. Para este sistema, los coeficientes de difusión obtenidos en los ajustes de los transitorios de bajada coinciden y se corresponden con sistemas con baja difusión rotacional, o sea más grandes. El modelo 1 indica también partículas flexibles y por el modelo 2 se puede observar que el cociente entre la interacción interpartículas y el término dipolo permanente es negativo. Sin embargo profundizar en este análisis cuando claramente no se cumplen los supuestos mínimos de ambos modelos puede acarrear conclusiones carentes de validez.

6.5. Conclusiones

Con el objetivo de entender el proceso y los mecanismos físicos del ensamblado en complejos de ADN/DTAB, se han realizado mediciones de birrefringencia eléctrica en estos sistemas en función de la concentración de tensoactivo y de la intensidad de campo eléctrico aplicado. El efecto Kerr es una técnica no comercial, desarrollada durante esta tesis, muy sensible al entorno eléctrico de los sistemas coloidales, que da información imposible de obtener por técnicas usuales como dispersión de luz o movilidad electroforética. Si bien el comportamiento observado por efecto Kerr es muy complejo y que no se cuenta con una teoría de efecto Kerr desarrollada para estos sistemas, el análisis cualitativo y semicuantitativo, tanto de la birrefringencia estacionaria como de los tiempos de relajación de subida y baja, ha permitido formar una imagen más clara del proceso de autoensamblado de los complejos ADN/DTAB. Los detalles y la evidencia en la que se basan estas conclusiones fueron dadas en la discusión previa, así que se resumirá inmediatamente en forma general la visión que emerge de los resultados de efecto Kerr:

A campo eléctrico aplicado constante, y bajo (régimen Kerr), la birrefringencia eléctrica cambia de signo (Figura 6.3), de negativa para ADN en ausencia de DTAB, a positiva a cierto valor de concentración de tensoactivo. Este cambio se ubica en las

inmediaciones de la concentración de saturación de los puntos de unión en el ADN, T_3 (ver Figura 1.6, en la Introducción), encontrada a partir de las isoterms de tensión superficial. También se observa que las relajaciones dejan de ser simétricas luego de superar la concentración correspondiente a la concentración de agregación crítica, CAC. A concentraciones por debajo de la CAC, tanto la birrefringencia estacionaria como el comportamiento de las relajaciones de subida y bajada, indican un proceso de intercambio de contraiones entre el ADN y el DTAB. El catión DTA^+ reemplaza progresivamente, a medida que aumenta la concentración de tensoactivo, al pequeño ion Na^+ , en el entorno de la cadena de ADN, pero sin condensar efectivamente sobre ella hasta que se alcanza la CAC. A la CAC, la agregación es cooperativa dando lugar a complejos ADN/DTAB, donde las moléculas de DTAB están efectivamente asociadas a la cadena por fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas (de origen entrópico).

Ahora, si fijamos la concentración de DTAB a algún valor por debajo de la CAC, e incrementamos paulatinamente el campo eléctrico aplicado, se observa también un cambio de signo en la birrefringencia, de negativa a positiva, esta vez inducida por la intensidad de campo eléctrico. Este cambio de signo es resultado del balance entre dos mecanismos de polarización/orientación opuestos, de la molécula en el campo. Uno de estos mecanismos tiende a orientar la molécula de ADN con su eje principal en la dirección del campo y el otro en la dirección perpendicular. El cambio de signo observado a cierto valor de campo eléctrico es debido a que el componente negativo satura, y solo sobrevive la componente positiva. Esto está relacionado con la polarización de los contraiones en las direcciones perpendicular y paralela a la cadena de ADN y, estando el sistema en régimen semidiluido, a la interacción de estos con cadenas vecinas.

A concentraciones mayores a la CAC, pero por debajo de la concentración T_3 , de saturación de los sitios de unión en el ADN, las relajaciones de subida y bajada de las señales Kerr dejan de ser simétricas, y la birrefringencia estacionaria se vuelve negativa para toda concentración por sobre la CAC. Aparecen múltiples tiempos característicos de relajación, algunos con valores grandes, indicando procesos relativamente lentos. Esto indica la formación de agregados grandes, posiblemente multicadenas. Estos agregados tienen una menor anisotropía óptica intrínseca, lo que hace disminuir la birrefringencia en presencia de campo.

A concentraciones aun mayores de DTAB, por encima de T_3 , los agregados entran en la zona cercana a la separación de fases y la aparición de precipitados. En esta zona de concentraciones se presume la formación de micelas de tensoactivo decorando la cadena principal del ADN, unidas por interacción electrostática entre la superficie micelar, cargada positivamente, y las cargas negativas del ADN. Esta estructura es abierta, deformable y la razón por la cual no se alcanza la birrefringencia estacionaria a estas concentraciones: el campo provoca la deformación continua de los agregados. Esta deformación sería también responsable de que, en ausencia de campo, la birrefringencia no vuelva al estado original previo a la aplicación del campo eléctrico. Lo cual implica que son estructuras fuera del equilibrio termodinámico, atrapadas en algún estado metaestable (mínimo local de energía).

Desafortunadamente la cantidad de ADN monodisperso disponible impidió la realización de experimentos de dispersión de rayos-X (y neutrones) que se pretendían encarar para obtener información acerca de las estructuras de los complejos, y validar así (o no) los cambios estructurales inferidos de las medidas de Efecto Kerr.

Bibliografía

- [1] Rita Dias and Bjorn Lindman. *DNA interactions with polymers and surfactants*. John Wiley & Sons, 2008.
- [2] Alexander Yu Grosberg, Alexei R Khokhlov, H Eugene Stanley, A John Mallinckrodt, and Susan McKay. Statistical physics of macromolecules. *Computers in Physics*, 9(2):171–172, 1995.
- [3] Anthony Trewavas. A new method for counting labeled nucleic acids by liquid scintillation. *Analytical Biochemistry*, 21(2):324–329, 1967.
- [4] Brian W Pontius and Paul Berg. Rapid renaturation of complementary dna strands mediated by cationic detergents: a role for high-probability binding domains in enhancing the kinetics of molecular assembly processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(18):8237–8241, 1991.
- [5] Danilo D Lasic. *Liposomes in gene delivery*. CRC press, 2019.
- [6] Federica Ponti, Matilde Campolungo, Clara Melchiori, Nina Bono, and Gabriele Candiani. Cationic lipids for gene delivery: Many players, one goal. *Chemistry and Physics of Lipids*, 235:105032, 2021.
- [7] Alexander V Gorelov, Evgeny D Kudryashov, Jean-Christophe Jacquier, Daragh M McLoughlin, and Kenneth A Dawson. Complex formation between dna and cationic surfactant. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 249(1-4):216–225, 1998.
- [8] RS Dias, B Lindman, and MG Miguel. Interactions between dna and surfactants. *Trends in Colloid and Interface Science XV*, pages 163–167, 2001.
- [9] Chester T O’Konski. *Molecular electro-optics*. M. Dekker, 1977.
- [10] Dietmar Porschke. Persistence length and bending dynamics of dna from electrooptical measurements at high salt concentrations. *Biophysical chemistry*, 40(2):169–179, 1991.
- [11] S Diekmann, W Hillen, B Morgeneyer, RD Wells, and D Pörschke. Orientation

- relaxation of dna restriction fragments and the internal mobility of the double helix. *Biophysical Chemistry*, 15(4):263–270, 1982.
- [12] Dietmar Porschke. Time-resolved analysis of macromolecular structures during reactions by stopped-flow electrooptics. *Biophysical journal*, 75(1):528–537, 1998.
- [13] Joan C Marini, Stephen D Levene, Donald M Crothers, and Paul T Englund. Bent helical structure in kinetoplast dna. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(24):7664–7668, 1982.
- [14] Paul J Hagerman. Evidence for the existence of stable curvature of dna in solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(15):4632–4636, 1984.
- [15] J Greve and ME De Heij. Transient electric birefringence of sonicated dna. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 14(11):2441–2443, 1975.
- [16] C Hornick and G Weill. Electrooptical study of the electric polarizability of rodlike fragments of dna. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 10(11):2345–2358, 1971.
- [17] S Sokerov and G Weill. Polarized fluorescence in an electric field: Comparison with other electro optical effects for rodlike fragments of dna and the problem of the saturation of the induced moment in polyelectrolytes. *Biophysical Chemistry*, 10(2):161–171, 1979.
- [18] Yongjun Lu, Brock Weers, and Nancy C Stellwagen. Dna persistence length revisited. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 61(4):261–275, 2002.
- [19] Nancy C Stellwagen. Electric birefringence of restriction enzyme fragments of dna: optical factor and electric polarizability as a function of molecular weight. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 20(3):399–434, 1981.
- [20] H Benoit. Theorie de leffet kerr dune solution soumise a une impulsion electrique rectangulaire. *COMPTES RENDUS HEBDOMADAIRES DES SEANCES DE L ACADEMIE DES SCIENCES*, 229(1):30–32, 1949.
- [21] Jean-Louis Déjardin. *Dynamic Kerr Effect: The use and limits of the Smoluchowski equation and nonlinear inertial responses*, volume 7. World Scientific Publishing Company, 1995.
- [22] John E Hearst and Dennis A Reese. Sedimentation of wormlike coils. ii. *The Journal of Chemical Physics*, 73(6):3007–3009, 1980.
- [23] Marshal Mandelkern, John G Elias, Don Eden, and Donald M Crothers. The dimensions of dna in solution. *Journal of molecular biology*, 152(1):153–161, 1981.
-

- [24] Paul J Hagerman. Flexibility of dna. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*, 17(1):265–286, 1988.
- [25] Somendra M Bhattacharjee, Achille Giacometti, and Amos Maritan. Flory theory for polymers. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 25(50):503101, 2013.
- [26] Andrey V Dobrynin and Michael Rubinstein. Theory of polyelectrolytes in solutions and at surfaces. *Progress in Polymer Science*, 30(11):1049–1118, 2005.
- [27] Andrey V Dobrynin. Theory and simulations of charged polymers: From solution properties to polymeric nanomaterials. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 6(13):376–388, 2008.
- [28] P-Gd De Gennes, P Pincus, RM Velasco, and F Brochard. Remarks on polyelectrolyte conformation. *Journal de physique*, 37(12):1461–1473, 1976.
- [29] Gerald Karp, Janet Iwasa, and Wallace Marshall. *Karp’s Cell and Molecular Biology*. John Wiley & Sons, 2020.
- [30] Shiro Takashima. Optical anisotropy of synthetic polynucleotides. i. flow birefringence and π -electron polarizability of bases. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 6(10):1437–1452, 1968.
- [31] Nirmesh Jain, Siwar Trabelsi, Samuel Guillot, Daragh McLoughlin, Dominique Langevin, Pierre Letellier, and Mireille Turmine. Critical aggregation concentration in mixed solutions of anionic polyelectrolytes and cationic surfactants. *Langmuir*, 20(20):8496–8503, 2004.
- [32] Katumitu Hayakawa, J Paul Santerre, and Jan CT Kwak. The binding of cationic surfactants by dna. *Biophysical chemistry*, 17(3):175–181, 1983.
- [33] Keishiro Shirahama, Koji Takashima, and Noboru Takisawa. Interaction between dodecyltrimethylammonium chloride and dna. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 60(1):43–47, 1987.
- [34] Roger J Lewis, R Pecora, and Don Eden. Transient electric birefringence measurements of the rotational and internal bending modes in monodisperse dna fragments. *Macromolecules*, 19(1):134–139, 1986.
- [35] Suzanne E Peterson, Anne E Stellwagen, Scott J Diede, Miriam S Singer, Zara W Haimberger, Catherine O Johnson, Monika Tzoneva, and Daniel E Gottschling. The function of a stem-loop in telomerase rna is linked to the dna repair protein ku. *Nature genetics*, 27(1):64–67, 2001.
- [36] GS Manning. Transverse polarizability of an aligned assembly of charged rods. *The European Physical Journal E*, 30(4):411–415, 2009.
-

- [37] H. Hoffmann and Dieter Gräbner. Electric birefringence anomaly of solutions of ionically charged anisometric particles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 216:20–35, 2015.
- [38] X Schlagberger and RR Netz. Anomalous birefringence and polarizability saturation of charged elastic rods: Field-strength, salt and finite-concentration effects. *EPL (Europhysics Letters)*, 83(3):36003, 2008.
- [39] Chester T O’Konski and Sonja Krause. Theory of the kerr constant of rigid conducting dipolar macromolecules. *The Journal of Physical Chemistry*, 74(17):3243–3250, 1970.
- [40] E Hecht and H Hoffmann. Adsorption of eoxpoyeox block copolymers onto saponite. *Tenside, surfactants, detergents*, 35(3):185–199, 1998.
- [41] Stephan Diekmann and Dietmar Pörschke. Thresholds in field-induced reactions of linear biopolymers: Strong chain-length dependence of field effects in dna. *Biophysical Chemistry*, 16(3):261–267, 1982.
- [42] Jan Antosiewicz and Dietmar Porschke. An unusual electrooptical effect observed for dna fragments and its apparent relation to a permanent electric moment associated with bent dna. *Biophysical Chemistry*, 33(1):19–30, 1989.
- [43] J García de la Torre. Dynamic electro-optic properties of macromolecules and nanoparticles in solution: A review of computational and simulation methodologies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 56(1-2):4–15, 2007.

Conclusiones generales

Esta tesis se planteó como objetivo general el estudio de la física de complejos formados entre polielectrolitos y moléculas pequeñas de carga opuesta, en disolución acuosa. Estas moléculas pequeñas incluyen surfactantes, sales y medicamentos. El objetivo central era aportar al entendimiento de los procesos de autoensamblado de estos sistemas complejos en el marco del diseño de nanotransportadores para aplicaciones nanomédicas, así como estudiar sus propiedades fisicoquímicas y evaluar su estabilidad frente a diferentes condiciones físicas, como ser el pH.

Se estudiaron cuatro sistemas distintos, a saber, (1) complejos de polielectrolitos con Doxorrubicina, un medicamento para el tratamiento del cáncer, ensamblados sobre superficies sólidas (multicapas); (2) complejos de un polielectrolito capaz de responder a cambios de pH, el PAA, con un tensoactivo de carga opuesta, el Gemini 12-2-12, como modelo de nanotransportador de fármacos cuya administración pudiera ser modulada por cambios en el pH; (3) Complejos de poliaminas basados en otro polielectrolito, PAH, con sales de polifosfatos para la formulación de nanocarriers cuya respuesta al pH pudiera ser modulada, y finalmente (4) Complejos de ADN con un tensoactivo catiónico, el DTAB, como modelo físico de vector para terapias génicas.

Los sistemas se caracterizaron usando una batería de técnicas, pero entre ellas se destaca una, desarrollada durante esta tesis doctoral: la birrefringencia eléctrica o Efecto Kerr, la cual es muy sensible al entorno eléctrico de los complejos. El montaje, la puesta a punto y el desarrollo del software de control fue una tarea importante y demandante durante esta tesis doctoral.

Los principales resultados obtenidos para los cuatro sistemas estudiados son:

(1) Complejos de PSS (o PAA) / Doxorrubicina: Para fabricar multicapas de polielectrolitos que sirvan como transportadores de fármacos se deben controlar finalmente las propiedades de las multicapas para lograr una liberación controlada de los mismos en el rango temporal deseado. Para ello, tener información acerca de la polaridad que enfrentan los fármacos en cada capa puede optimizar el diseño de las multicapas para la liberación de las drogas, ya sea que se liberen por mecanismos difusivos o por desprendimiento de las capas. Esta propiedad, en trabajos previos, se había medido de

forma promedio, pero no localmente en una capa individual. Es por ello que nos hemos propuesto utilizar un sistema multicapa ampliamente estudiado, PSS/PAH y PAA/-PAH, pero introduciendo en ciertas capas específicas de la multicapa, complejos PSS (o PAA) /Doxorrubicina (Dx). El espectro de emisión de fluorescencia de la Dx depende de la polaridad del entorno. De esta manera fuimos capaces de determinar como cambia la polaridad local dependiendo de la posición dentro de la multicapa, del tipo de polielectrolito utilizado y del contenido de agua en la multicapa. Se obtuvieron resultados que mejoran cuantitativa y cualitativamente nuestro entendimiento de la estructura en las multicapas respecto a las medidas realizadas previamente con sondas de pireno. Este aporte ayudará en la comprensión de la dinámica de administración y, por tanto, en el diseño de multicapas para la administración controlada de fármacos.

(2) Complejos PAA/Gemini 12-2-12: Con la intención de formular nanosistemas para la administración controlada de fármacos capaces de responder a cambios de pH (un estímulo muy útil debido a la variación que presenta en el entorno fisiológico del cuerpo humano y sus órganos), se ensayó un sistema formado por un polielectrolito que es un ácido débil, el ácido poliacrílico (PAA), y un tensoactivo catiónico bivalente, el Gemini 12-2-12 (G12). Además de caracterizar desde el punto de vista fisicoquímico los complejos, tanto en volumen como interfaces, fuimos capaces de demostrar que este sistema tiene potencial como nanocarrier responsivo a pH. En este sentido, este sistema tiene una aplicación dual, ya que sirve también para formular espumas responsivas a pH, con potencial aplicación no solo en tratamientos tópicos, sino también en sistemas responsivos para remediación de suelos y remoción de contaminantes.

(3) El tercer sistema estudiado, también resultó responsivo a pH. En el capítulo 5, estudiamos nanopartículas de poliaminas (PANs) de PAH formando complejos con sales conteniendo distinto número de grupos fosfato. La utilización de sistemas basados en poliaminas se fundamenta en que las células usan estas moléculas en el mecanismo de transporte intramembrana, lo que las convierte en un vector de administración conveniente. Para realizar este estudio, se implementaron técnicas de caracterización en volumen morfológicas, electrónicas y termodinámicas que permitieron comprender la dinámica de complejación de las nanopartículas, ampliamente influenciada por la cantidad de grupos fosfato. También permitieron seleccionar candidatos a sistemas de transporte para evaluar su responsividad frente al pH. De esta forma se obtuvieron complejos, de tamaño aparente fijo y carga positiva, fundamental para aplicaciones intracelulares. Un hallazgo crucial en estos sistemas es el hecho que, a través de la elección de la sal de fosfato con la que se fabrican, es posible ajustar la estabilidad de los mismos frente a distintos rangos de pH. Cuanto mayor es el número de fosfatos en la sal, mayor es el rango de pH en la cual las nanopartículas son estables.

(4) Finalmente, se ha estudiado un sistema modelo de plataforma para terapia génica a través de Efecto Kerr. Este sistema está formado por complejos de ADN monodisperso de 300 pares de bases, con un tensoactivo catiónico, el DTAB. En base a las señales de efecto Kerr, medidas en función de la concentración de DTAB y de la intensidad de campo eléctrico aplicado, hemos sido capaces de seguir el proceso de

formación de los complejos. Hemos demostrado que existen tres zonas según la concentración de tensoactivo, que difieren en la estructura y conformación de los complejos ADN/DTAB. Por debajo de la CAC, tenemos un intercambio de contraiones entre el DTAB y el ADN sin que esto implique la formación de complejos. A la CAC (1 mM), se produce una condensación efectiva de los iones DTA^+ sobre la cadena de ADN, dando lugar a complejos polielectrolito/tensoactivo; siendo este proceso cooperativo. A concentraciones de DTAB cercanas a 2 mM, la concentración T3, el sistema se acerca a la zona de cambio de fase. Aquí los agregados son abiertos y deformables, tal como lo evidencian las señales Kerr correspondientes. Desde el punto de vista de la física del proceso de autoensamblado supramolecular, la implementación de modelos físicos, aunque sobresimplificados, fueron determinantes para llegar a la conclusión de que existen dos mecanismos que compiten para orientar a la molécula de ADN en el campo eléctrico: la polarización de los contraiones condensados a lo largo de la cadena, y la polarización perpendicular a la cadena que emerge de los contraiones que "saltan" entre moléculas adyacentes. Este último mecanismo desaparece o satura a cierto valor de campo eléctrico aplicado. Los mecanismos de polarización de polielectrolitos en un campo eléctrico es un problema no resuelto desde hace décadas; los resultados aquí aportados son un avance, al menos para el caso de polielectrolitos rígidos, como lo es el ADN de cadena corta estudiado aquí, y en régimen semidiluido.

Trabajo futuro y perspectivas.

Desde el punto de vista físico, la caracterización de los complejos polielectrolitos/molécula pequeña necesita de técnicas avanzadas de caracterización estructural, como ser Dispersión de neutrones a bajo ángulo (SANS). No se mencionó, pero en esta tesis se intentó caracterizar los complejos usando dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS), sin embargo, debido al muy bajo contraste de densidad electrónica entre los complejos y las disoluciones, no fue muy útil, y por ello, esos resultados no fueron incluidos. Las técnicas neutrónicas permitirían estudiar las estructuras internas de los agregados gracias a la posibilidad de variar el contraste por sustitución isotópica con deuterio. A futuro se realizarán estos experimentos.

Respecto a los sistemas particulares estudiados en esta tesis, se ha propuesto para los sistemas responsivos a pH, PAH/sales de fosfato y PAA/Gemini 12-2-12, cambiar el estímulo de respuesta por uno de tipo externo como la luz; generando así dispositivos fotomodulables. Para ello se planea explorar el uso de sales de difenil yononio para la formulación de estos sistemas. Estas sales tienen la particularidad que realizan fotólisis mediante la irradiación con luz ultravioleta, lo que en solución acuosa, conduce a una disminución del pH.

En el caso de los sistemas en base a PAA, también se considera sintetizar tensoactivos iónicos fotosensibles que incluyan grupos azo, y formar complejos con los mismos para explorar la posibilidad de obtener complejos fotosensibles para el desarrollo de nanovectores modulables por luz. También se han propuesto estudiar la complejación

con moléculas de PAA con menor masa molecular para intentar lograr complejos más pequeños y útiles para otras aplicaciones nanomédicas. El estudio de los procesos de formación de complejos en función del peso molecular de los polímeros, es una de las cosas que han quedado pendientes en este trabajo.

En cuanto a los estudios de polaridad, se ha mencionado en el Capítulo 3 continuar los estudios con otros sistemas PEMs que presenten un crecimiento no lineal en las multicapas para seguir explorando el potencial de la doxorubicina como sensor de polaridad local.

Finalmente, se ha propuesto incorporar la tecnología de lab-on-chip para lograr tener un control mayor de las propiedades morfológicas de los complejos y poder explotar la sensibilidad de la técnica de efecto Kerr, esto daría mayor sistematicidad en las mediciones, con vistas a contribuir en el posterior desarrollo teórico y computacional de esta técnica.

Apéndice A

Anexo de Capítulo 2

A continuación se presenta el código desarrollado en C++ para la comunicación PC-osciloscopio y para la adquisición y procesamiento preliminar de las señales de birrefringencia.

```
#include <Windows.h>
#include <stdio.h>
#include <string.h>
#include <conio.h>
#include <math.h>
#include <time.h>
#include <cstdint>
#include <dirent.h>
// #include <direct.h>
#include <stdlib.h>
// #include <iostream>

#define LOGNAME_FORMAT "log/%Y%m%d_%H%M%S"
#define LOGNAME_SIZE 20

int seguir=0;
int medida=0;
char fecha[32];
char hora[32];
char nombre_muestra[64];
char nombre_archivo_info_mediciones[]=".\\Datos\\";
char nombre_carpeta_info_mediciones[64];
char nombre_archivo_individual[64];
```

```
char codigo_samplerate [4];
char codigo_samplerate_corto [4];
float ancho_u_segundos;

HANDLE com_osc;
BOOL Status_osc;
BOOL Status;
char TempChar;
char datos_recibidos_1 [10000000];
char datos_recibidos_2 [10000000];
char encabezado_1 [18];
char encabezado_2 [18];
char encabezado_corto [16];
int primer_bit1 [5000000];
int segundo_bit1 [5000000];
int primer_bit2 [5000000];
int segundo_bit2 [5000000];
int datos_en16_1 [5000000];
int datos_en16_2 [5000000];
float valores_1 [5000000];
float valores_2 [5000000];

char datos_recibidos_1_corto [10000000];
char datos_recibidos_2_corto [10000000];
int primer_bit1_corto [5000000];
int segundo_bit1_corto [5000000];
int primer_bit2_corto [5000000];
int segundo_bit2_corto [5000000];
int datos_en16_1_corto [5000000];
int datos_en16_2_corto [5000000];
float valores_1_cortos [5000];
float valores_2_cortos [5000];
char n_puerto_osc [5];
char nombre_archivo [32];
char nombre_archivo1 [32] = "salida1 ";
char nombre_archivo2 [32] = "salida2 ";
char orden [32];
char param_osc [32];
float escalaV1;
float escalaV2;
float offset1;
float offset2;
```

```

float angulo_alfa;

int tpi=0;
int tpf=0;
int delta_t;
int t0, t1, t2, t3, t4, t5, t6, t7;
float factor=25;

float Vapl0, Vapl0cuadrado, varVapl0, desvestVapl0, errVapl0;
float Vapl, Vaplcuadrado, varVapl, desvestVapl, errVapl;
float Vapl_final;
float V0, V0cuadrado, varV0, desvestV0, errV0;
float V1, V1cuadrado, varV1, desvestV1, errV1;
float V2, V2cuadrado, varV2, desvestV2, errV2;
float V3, V3cuadrado, varV3, desvestV3, errV3;
float V4, V4cuadrado, varV4, desvestV4, errV4;
float V5, V5cuadrado, varV5, desvestV5, errV5;
float deltaV1, errdeltaV1;
float deltaV2, errdeltaV2;
float deltaV3, errdeltaV3;
float deltaV4, errdeltaV4;
float deltaV5, errdeltaV5;
float deltaV1_V, errdeltaV1_V;
float deltaV2_V, errdeltaV2_V;
float deltaV3_V, errdeltaV3_V;
float deltaV4_V, errdeltaV4_V;
float deltaV5_V, errdeltaV5_V;
float delta1, delta2, delta3, delta4, delta5;

float dist_t[512]= {}
//distribucion t para alfa=0.05 arrancando en n=3,
//o sea si tengo 3 muestras tengo que usar el valor dist_t[0],
// si tengo 4 muestras el valor dist_t[1] etc

float IEEE754()
{ // for (int k=0; k<4; k++) {printf("en el codigo de
  samplerate hay: %i %i ",k,codigo_samplerate[k]);}
int signo;
signo=pow(-1,codigo_samplerate[0]/128);
// printf("\n signo: %i ",signo);

```

```

int exponente;
exponente=codigo_samplerate[0]*2 + codigo_samplerate[1]/128;
// printf("\n exponente: %i \n",exponente);
int exponentes [23];
for (int i=0; i<7; i++)
{ // printf("%i ",(int)pow(2,6-i));
exponentes [i]=((int)codigo_samplerate [1] >> 6-i) & 1;
// printf("exponente [%i]: %i\n",i ,exponentes [i]);
}
for (int i=7;i<15; i++)
{ // printf("%i ",(int)pow(2,14-i));
exponentes [i]=((int)codigo_samplerate [2] >> 14-i) &1;
// printf("exponente [%i ]: %i\n",i ,exponentes [i]);
}
for (int i=15; i<23; i++)
{ // printf("%i ",(int)pow(2,22-i));
exponentes [i]=((int) codigo_samplerate [3] >> 22-i) & 1;
// printf("exponente [%i ]: %i\n",i ,exponentes [i]);
}
float mantisa;
for(int j=0; j<23; j++)
{
mantisa=mantisa + (float)exponentes [j]*pow(2,-j-1);
// printf("mantisa %i : %f\n",j ,mantisa);
}
float resultado= signo*(1+mantisa)*(pow(2,exponente-127));
// printf("%4.2e",resultado);
return resultado;
}

float calcular_delta(float a, float b)
{ //a = angulo b= deltaI/I
//calculo el seno cuadrado
// printf("\nEL ANGULO ALFA ES EN GRADOS %f\n",angulo_alfa);
// printf("\n el dV/V es: %f\n",b);
float angulo_rad=3.141592654*a/180;
// printf("\nEANGLO EN RADIANTES ES: %F",angulo_rad);
float senocuadrado=sin(angulo_rad)*sin(angulo_rad);
// printf("\n el seno cuadrado es: %f\n",senocuadrado);
float raizcuadrada=sqrt(b*senocuadrado+senocuadrado);
// printf("\nla raiz cuadrada es: %f\n",raizcuadrada);
float resultado_delta=2*asin(raizcuadrada);
// printf("\nel resultado es: %f\n",resultado_delta);
return resultado_delta;
}

```

```
}

void preguntar_nombre()
{
printf(" Nombre de la muestra: ");
scanf( "%s", &nombre_muestra);
strcat(nombre_archivo_info_mediciones, nombre_muestra);
}

void elegir_puerto_osc()
{
printf("Puerto del osciloscopio: ");
scanf( "%s", &n_puerto_osc); //espera un string del teclado y
    lo guarda como n_puerto_osc
}

void abrir_puerto_osc() {

    com_osc = CreateFile( n_puerto_osc,                //
        Name of the Port to be Opened
        GENERIC_READ | GENERIC_WRITE,                // Read/
            Write Access
        0,                                             // No
            Sharing, ports cant be shared
        NULL,                                         // No
            Security
        OPEN_EXISTING,                               // Open
            existing port only
        0,                                           // Non
            Overlapped I/O
        NULL);                                       // Null for
            Comm Devices

    if (com_osc == INVALID_HANDLE_VALUE)
    {
printf("\n  Error! – El puerto %s no se pudo
        abrir, verifique configuracion y conexiones.\n
        n Saliendo...\n", n_puerto_osc);
        exit (EXIT_FAILURE);
    }
}
```

```

        else
            {
                printf(" Puerto %s abierto\n", n_puerto_osc);
            }

/*----- Setting the Parameters for
the SerialPort -----*/

DCB dcbSerialParams = { 0 };           //
    Initializing DCB structure
dcbSerialParams.DCBlength = sizeof(dcbSerialParams);

Status_osc = GetCommState(com_osc, &dcbSerialParams);    //
    retrieves the current settings

if (Status_osc == FALSE)
    printf("\n Error! in GetCommState()");

dcbSerialParams.BaudRate = CBR_115200;    // Setting
    BaudRate = 9600
dcbSerialParams.ByteSize = 8;            // Setting
    ByteSize = 8
dcbSerialParams.StopBits = ONESTOPBIT;    // Setting
    StopBits = 1
dcbSerialParams.Parity = NOPARITY;        // Setting Parity
    = None

Status_osc = SetCommState(com_osc, &dcbSerialParams); //
    Configuring the port according to settings in DCB

if (Status_osc == FALSE)
    {
        printf("\n Error! in Setting DCB Structure
        ");
    }
else
    {/*
        printf("\n Setting DCB Structure
        Successfull\n");
        printf("\n Baudrate = %d",
        dcbSerialParams.BaudRate);
        printf("\n ByteSize = %d",
        dcbSerialParams.ByteSize);
    }

```

```
        printf("\n        StopBits = %d",
            dcbSerialParams.StopBits);
        printf("\n        Parity    = %d",
            dcbSerialParams.Parity);*/
    }

/*----- Setting Timeouts -----*/

COMMTIMEOUTS timeouts = { 0 };

timeouts.ReadIntervalTimeout      = 50;
timeouts.ReadTotalTimeoutConstant = 50;
timeouts.ReadTotalTimeoutMultiplier = 10;
timeouts.WriteTotalTimeoutConstant = 50;
timeouts.WriteTotalTimeoutMultiplier = 10;

if (SetCommTimeouts(com_osc, &timeouts) == FALSE)
    printf("\n    Error! in Setting Time Outs");
else
{
// printf("\n\n    Setting Serial Port Timeouts Successfull")
;
}

Status = EscapeCommFunction(com_osc, SETRTS); //Setting the
        RTS line using EscapeCommFunction();

if (Status == FALSE)
    printf("\n    Error! RTS not Set");
else
{
//    printf("\n\n    RTS Seteado\n\n ");
}

Status = EscapeCommFunction(com_osc, SETDTR); //Setting the
        DTR line using EscapeCommFunction();

if (Status == FALSE)
    printf("\n    Error! DTR not Set");
else
```

```

        {
            // printf("\n DTR Seteado,\n ");
        }
        // _getch();
    }

void leer_datos_osc_1()
{
    DWORD dwEventMask;
    DWORD NoBytesRead;

    int i = 0;
    /*----- Setting
       Receive Mask -----*/

    Status_osc = SetCommMask(com_osc, EV_RXCHAR); //
    Configure Windows to Monitor the serial device
    for Character Reception

    // if (Status_osc == FALSE)
    //     printf("\n\n Error! in Setting CommMask");
    // else
    //     printf("\n\n Setting CommMask successfull");

    /*----- Setting WaitComm() Event
       -----*/

    printf(" Leyendo canal 1 ");

    Status_osc = WaitCommEvent(com_osc, &dwEventMask,
        NULL); //Wait for the character to be received

    /*----- Program will Wait here
       till a Character is received -----*/

    if (Status_osc == FALSE)
    {
        printf("\n Error! in Setting WaitCommEvent()");
        ;
    }
}

```

```

else //If WaitCommEvent()==True Read the RXed data
using ReadFile();
{
    //printf("\n\n    Characters
    Received");
do
{
    Status_osc = ReadFile(com_osc, &TempChar,
        sizeof(TempChar), &NoBytesRead, NULL);
    datos_recibidos_1[i] = TempChar;
    // printf("%i ",
    TempChar);
    // printf("\n");
    i++;
    if(i%100000==0) {printf(".");}
}
while (NoBytesRead > 0);

/*-----Printing the RXed
String to Console
-----*/

int j =0;
int k=0;
int l=0;
printf(" %i ",i); printf(" bytes.");

for (j=9; j<13; j++)
{
    codigo_samplerate[j-9]=datos_recibidos_1[j];
}

for (j = 17; j < i-1; j++) {
    // fprintf(archivo, "%c",
    datos_recibidos_1[j] ); //
    guardar todos los datos
    if (j % 2 != 0)
    {
        primer_bit1[k]=datos_recibidos_1[j];
    }
    else
    {
        segundo_bit1[k]=datos_recibidos_1[j];
        if (segundo_bit1[k] < 0){

```

```

        segundo_bit1[k]=segundo_bit1[k]+257;
    }
    datos_en16_1[k]=primer_bit1[k]*256+
        segundo_bit1[k];
    k++;
}

}

printf(" Cantidad de puntos: %i\n",k);
}
}

void leer_datos_osc_2()
{
    DWORD dwEventMask;
    DWORD NoBytesRead;

    int i = 0;
    /*----- Setting
       Receive Mask
       -----*/

    Status_osc = SetCommMask(com_osc, EV_RXCHAR); //
    Configure Windows to Monitor the serial device
    for Character Reception

    // if (Status_osc == FALSE)
    //     printf("\n\n Error! in Setting CommMask");
    // else
    //     printf("\n\n Setting CommMask successfull");

    /*----- Setting WaitComm() Event
       -----*/

    printf(" Leyendo canal 2 ");

    Status_osc = WaitCommEvent(com_osc, &dwEventMask,
        NULL); //Wait for the character to be received

    /*----- Program will Wait here
       till a Character is received
       -----*/
}

```

```

if (Status_osc == FALSE)
{
    printf("\n    Error! in Setting WaitCommEvent() ")
    ;
}
else //If  WaitCommEvent()==True Read the RXed data
using ReadFile();
{
    //printf("\n\n    Characters
    Received");
do
{
    Status_osc = ReadFile(com_osc, &TempChar,
        sizeof(TempChar), &NoBytesRead, NULL);
    datos_recibidos_2[i] = TempChar;
    i++;
    if(i%100000==0) {printf(".");}
}
while (NoBytesRead > 0);

    /*-----Printing the RXed
    String to Console
    -----*/

int j =0;
int k=0;
int l=0;
printf(" %i ",i); printf(" bytes.");

for (j=0; j<18; j++)
{
    encabezado_2[j]=datos_recibidos_2[j];
}

for (j = 17; j < i-1; j++)
{
    // fprintf(archivo, "%c",
    datos_recibidos_2[j] ); //
    guardar todos los datos
    if (j % 2 != 0)
    {
        primer_bit2[k]=datos_recibidos_2[j];
    }
}

```

```

    }
    else
    {
        segundo_bit2[k]=datos_recibidos_2[j];

        if (segundo_bit2[k] < 0){

            segundo_bit2[k]=segundo_bit2[k]+257;
        }

        datos_en16_2[k]=primer_bit2[k]*256+segundo_bit2
            [k];

        k++;
    }

}
printf(" Cantidad de puntos: %i\n",k);

}
}

void leer_osc_corto_1()
{

    DWORD dwEventMask;
    DWORD NoBytesRead;

    int i = 0;
    /*----- Setting
       Receive Mask
       -----*/

    Status_osc = SetCommMask(com_osc, EV_RXCHAR); //
    Configure Windows to Monitor the serial device
    for Character Reception

    // if (Status_osc == FALSE)
    //     printf("\n\n Error! in Setting CommMask");
    // else
    //     printf("\n\n Setting CommMask successfull");

```

```

/*----- Setting WaitComm() Event
-----*/

printf(" Leyendo canal 1 ");

Status_osc = WaitCommEvent(com_osc, &dwEventMask,
    NULL); //Wait for the character to be received

/*----- Program will Wait here
till a Character is received
-----*/

if (Status_osc == FALSE)
{
    printf("\n    Error! in Setting WaitCommEvent() ")
        ;
}
else //If WaitCommEvent()==True Read the RXed data
    using ReadFile();
{
    //printf("\n\n    Characters
    Received");

do
{
    Status_osc = ReadFile(com_osc, &TempChar,
        sizeof(TempChar), &NoBytesRead, NULL);
    datos_recibidos_1_corto[i] = TempChar;
    // printf("%i ",
    TempChar);
    // printf("\n");

    i++;
    if(i%400==0) {printf(".");}
}
while (NoBytesRead > 0);

/*-----Printing the RXed
String to Console
-----*/

int j =0;
int k=0;
int l=0;
printf(" %i ",i); printf(" bytes.");

```

```
for (j=0; j<15; j++)
{
    encabezado_corto[j]=datos_recibidos_1_corto[j];
}

for (j=6; j<10; j++)
{
    codigo_samplerate[j-6]=datos_recibidos_1[j];
}

for (j = 14; j < i-1; j++) {

    if (j % 2 == 0)
    {
        primer_bit1_corto[k]=datos_recibidos_1_corto[j
        ];
    }
    else
    {
        segundo_bit1_corto[k]=datos_recibidos_1_corto[
        j];
        if (segundo_bit1_corto[k] < 0){
            segundo_bit1_corto[k]=segundo_bit1_corto[k
            ]+257;
        }
        datos_en16_1_corto[k]=primer_bit1_corto[k
        ]*256+segundo_bit1_corto[k];
        k++;
    }
}

printf(" Cantidad de puntos: %i\n",k);
}
}

void leer_osc_corto_2()
{
```

```

DWORD dwEventMask;
DWORD NoBytesRead;

int i = 0;
/*----- Setting
   Receive Mask
-----*/

Status_osc = SetCommMask(com_osc, EV_RXCHAR); //
    Configure Windows to Monitor the serial device
    for Character Reception

// if (Status_osc == FALSE)
//     printf("\n\n    Error! in Setting CommMask");
// else
//     printf("\n\n    Setting CommMask successfull");

/*----- Setting WaitComm() Event
-----*/

printf(" Leyendo canal 2 ");

Status_osc = WaitCommEvent(com_osc, &dwEventMask,
    NULL); //Wait for the character to be received

/*----- Program will Wait here
   till a Character is received
-----*/

if (Status_osc == FALSE)
{
    printf("\n    Error! in Setting WaitCommEvent() ")
    ;
}
else //If WaitCommEvent()==True Read the RXed data
    using ReadFile();
{
    //printf("\n\n    Characters
        Received");
do
{
    Status_osc = ReadFile(com_osc, &TempChar,
        sizeof(TempChar), &NoBytesRead, NULL);

```

```

        datos_recibidos_2_corto[i] = TempChar;
                                // printf("%i ",
                                TempChar);
                                // printf("\n");

        i++;
        if(i%400==0) {printf(".");}
    }
while (NoBytesRead > 0);
    /*-----Printing the RXed String to
        Console-----*/

int j =0;
int k=0;
int l=0;
printf(" %i ",i); printf(" bytes.");

for (j = 14; j < i-1; j++) {
    // fprintf(archivo , "%c",
    datos_recibidos_1[j] ); //
    guardar todos los datos
    if (j % 2 == 0)
    {
        primer_bit2_corto[k]=datos_recibidos_2_corto[j
        ];
    }
    else
    {
        segundo_bit2_corto[k]=datos_recibidos_2_corto[
        j];
        if (segundo_bit2_corto[k] < 0){
            segundo_bit2_corto[k]=segundo_bit2_corto[k
            ]+257;
        }
        datos_en16_2_corto[k]=primer_bit2_corto[k
        ]*256+segundo_bit2_corto[k];
        k++;
    }
}

printf(" Cantidad de puntos: %i\n",k);
}
}

```

```

float leer_param_osc()
{
    DWORD dwEventMask;
    DWORD NoBytesRead;
    float n;
    int i = 0;
    /*----- Setting
    Receive Mask
    -----*/

    Status_osc = SetCommMask(com_osc, EV_RXCHAR); //
    Configure Windows to Monitor the serial device
    for Character Reception

    // if (Status_osc == FALSE)
    //     printf("\n\n    Error! in Setting CommMask");
    // else
    //     printf("\n\n    Setting CommMask successfull");

    /*----- Setting WaitComm() Event
    -----*/

    //     printf("lectura puerto: ");

    Status_osc = WaitCommEvent(com_osc, &dwEventMask,
    NULL); //Wait for the character to be received

    /*----- Program will Wait here
    till a Character is received
    -----*/

    if (Status_osc == FALSE)
    {
        printf("\n    Error! in Setting WaitCommEvent() ")
        ;
    }
    else //If WaitCommEvent()==True Read the RXed data
    using ReadFile();
    {
        //printf("\n\n    Characters
        Received");
    }
    do
    {

```

```

        Status_osc = ReadFile(com_osc, &TempChar,
            sizeof(TempChar), &NoBytesRead, NULL);
        param_osc[i] = TempChar;
        i++;
    }
    while (NoBytesRead > 0);
        /*-----Printing the RXed
           String to Console
           -----*/

    int j =0;
    int k=0;
    for (j = 0; j < i-1; j++)
    {
        printf("%c", param_osc[j] );
    }
    n=atoi(param_osc);
    for (j = 0; j < i-1; j++)
    {
        param_osc[j]=NULL;
    }
}
return n;
}

void ejecutar(const char* command)
{
    strcpy(orden, command);

/*----- ESCRIBIR TIMEBASE SCALE; EL
   VALOR LO PONGO DESPUES
   -----*/

DWORD dNoOFBytestoWrite;           // No of bytes to write
    into the port
DWORD dNoOfBytesWritten = 0;       // No of bytes written
    to the port

dNoOFBytestoWrite = strlen(orden); // Calculating the no of
    bytes to write into the port

```

```
Status_osc = WriteFile(com_osc,          // Handle to the
    Serialport
        orden,          // Data to be written to
            the port
        dNoOfBytesToWrite, // No of bytes to write
            into the port
        &dNoOfBytesWritten, // No of bytes written
            to the port
        NULL);

if (Status_osc == TRUE) {
// printf(" %s - escrito a %s\n", orden, n_puerto_osc); //
    return 1;
}

else {
printf("\n\n  Error %d Al escribir ",GetLastError()); //return
    0;
}

}

void escalasV ()
{
ejecute(":chan1:scal?\n");
printf(" Escala del canal 1: ");
escalaV1=leer_param_osc();
//printf("\nel nro en string es %s y en float es: %f",param_osc
    ,escalaV1);
ejecute(":chan2:scal?\n");
printf(" Escala del canal 2: ");
escalaV2=leer_param_osc();
//printf("\nel nro en string es %s y en float es: %f",param_osc
    ,escalaV2);
}

void calculo_voltajes()
{
printf(" Calculando voltajes ");
/* FILE * archivo;
archivo=fopen("salida.dat","a+"); */
```

```
float correccion=65536; // corrimiento por el complemento a 2

for( int i=0; i< 1000000; i++)
{
valores_1[i]=(float)datos_en16_1[i]*escalaV1/factor;
                /*escalaV1/factor;
valores_2[i]=(float)datos_en16_2[i]*escalaV2/factor;
                /*escalaV2/factor;
/*      fprintf(archivo,"%f",valores_1[i]);
fprintf(archivo,"%c",9);
fprintf(archivo,"%f",valores_2[i]);
fprintf(archivo,"%c",10); */
if(i%62500==0) { printf("."); }
}
printf(" hecho\n");
}

void detectar_subida()
{ //detectar cuando el canal 2 tiene el pulso
int a=30000;
bool est_pulso_act=0;
bool pulso_detectado=0;
int i=0;
printf(" Detectando pulso ");
while (i<1000000 && pulso_detectado==0)
{
if (valores_2[i]>0.8 && est_pulso_act==0 )
{
tpi=i;
est_pulso_act=1;
i++;
if(i%a==0) { printf("."); }
}
else if (valores_2[i]<0.8 && est_pulso_act==1)
{
tpf=i;
est_pulso_act=0;
if (tpf-tpi> 1000) { pulso_detectado=1;}
i++;
if(i%a==0) { printf("."); }
}
else i++;
if(i%a==0) { printf("."); }
}
```

```

}

printf(" ");
delta_t=tpf-tpi;
t0=tpi-delta_t;
t1=tpi-delta_t/10;
t2=tpi+delta_t/10; // margen de tiempo porque el foto no
    responde inmediatamente
t3=tpi+delta_t/5; // me tomo un margen porque el pulso no decae
    inmediatamente
t4=tpi+2*delta_t/5;
t5=tpi+3*delta_t/5;
t6=tpi+4*delta_t/5;
t7=tpf-delta_t/10;
float sample_time_largo=IEEE754();
ancho_u_segundos=1000000*(float)delta_t*sample_time_largo;
printf(" inicio: %i fin: %i ancho: %i puntos = %4.2e us.\n", tpi
    , tpf , delta_t , ancho_u_segundos);
// printf(" t0: %i t1: %i t2: %i t3: %i t4: %i t5: %i t6: %i t7:
    %i\n", t0 , t1 , t2 , t3 , t4 , t5 , t6 , t7);
}

void calculo_promedios()
{
    printf("\n calculando promedios...\n");
    // calculo V aplicado
    int suma_baseVapl=0;
    int suma_baseVapl2=0;
    int sumaVapl=0;
    int sumaVaplcuadrado=0;

    float divisor1= (float)t1*25-(float)t0*25;
    float divisor2= (float)t3*25-(float)t2*25;
    float divisor3= (float)t4*25-(float)t3*25;
    float divisor4= (float)t5*25-(float)t4*25;
    float divisor5= (float)t6*25-(float)t5*25;
    float divisor6= (float)t7*25-(float)t6*25;

    for (int x=t0; x<t1; x++)
    {
        suma_baseVapl=suma_baseVapl+datos_en16_2[x];
        suma_baseVapl2=suma_baseVapl2+datos_en16_2[x]*datos_en16_2[x];
    }
    Vapl0=escalaV2*(float)suma_baseVapl/divisor1;

```

```

Vapl0cuadrado=escalaV2*escalaV2*(float)suma_baseVapl2/(25*
    divisor1);
// printf("base al cuadrado promedio %f\n",Vapl0cuadrado);
varVapl0=Vapl0cuadrado-Vapl0*Vapl0;
desvestVapl0=pow(varVapl0,0.5);
if (t1-t0-3<512) {errVapl0=dist_t[t1-t0-3]*desvestVapl0*pow(t1-
    t0,-0.5);}
else errVapl0=1.96*desvestVapl0*pow(t1-t0,-0.5);

// printf("\n el voltaje base del campo aplicado es: %f +/-%f V
    N: %i s: %f",Vapl0,errVapl0,t1-t0,desvestVapl0);
for (int l= t2; l<t3; l++)
{
sumaVapl=sumaVapl+datos_en16_2[l];
sumaVaplcuadrado=sumaVaplcuadrado+datos_en16_2[l]*datos_en16_2[
    l];
}

Vapl=escalaV2*((float)sumaVapl/divisor2);
Vaplcuadrado=escalaV2*escalaV2*((float)sumaVaplcuadrado/
    divisor2)/25;
varVapl=Vaplcuadrado-Vapl*Vapl;
desvestVapl=pow(varVapl,0.5);

if (t1-t0-3<512) {errVapl=dist_t[t3-t2-3]*desvestVapl*pow(t3-t2
    ,-0.5);}
else errVapl=1.96*desvestVapl*pow(t3-t2,-0.5);
// printf("el valor de Vapl sin restar base es %f%c%f la SD: %f
    ",Vapl,241,errVapl,desvestVapl);
float err_finalVapl=100*pow(errVapl*errVapl+errVapl0*errVapl0
    ,0.5);
Vapl_final=100*Vapl-100*Vapl0;

int sumaV0=0;
int sumaV1=0;
int sumaV2=0;
int sumaV3=0;
int sumaV4=0;
int sumaV5=0;
int sumaV0cuadrado=0;
int sumaV1cuadrado=0;
int sumaV2cuadrado=0;
int sumaV3cuadrado=0;

```

```

int sumaV4cuadrado=0;
int sumaV5cuadrado=0;

for (int k=t0; k<t1; k++)
{
sumaV0=sumaV0+datos_en16_1[k];
sumaV0cuadrado=sumaV0cuadrado+datos_en16_1[k]*datos_en16_1[k];
}

V0=escalaV1*(float)sumaV0/divisor1;
V0cuadrado=escalaV1*escalaV1*(float)sumaV0cuadrado/(divisor1
*25);
varV0=V0cuadrado-V0*V0;
desvestV0=pow(varV0,0.5);
if (t1-t0<512)
{
errV0=dist_t[t1-t0-3]*desvestV0*pow(t1-t0,-0.5);
}
else errV0=1.96*desvestV0*pow(t1-t0,-0.5);
// printf("\n El valor del V0 es: %f%c%f la SD es: %f N: %i ",
1000*V0,241,1000*errV0,1000*desvestV0,t1-t0);

for (int i= t2; i<t3; i++)
{
sumaV1=sumaV1+datos_en16_1[i];
sumaV1cuadrado=sumaV1cuadrado+datos_en16_1[i]*datos_en16_1[i];
}
V1=escalaV1*(float)sumaV1/divisor2;
V1cuadrado=escalaV1*escalaV1*sumaV1cuadrado/(divisor2*25);
varV1=V1cuadrado-V1*V1;
desvestV1=pow(varV1,0.5);
if (t3-t2<512)
{
errV1=dist_t[t3-t2-3]*desvestV1*pow(t3-t2,-0.5);
}
else errV1=1.96*desvestV1*pow(t3-t2,-0.5);

// printf("\nEl valor del V1 es: %f%c%f la SD es: %f N: %i ", V1
,241,errV1,desvestV1,t3-t2);
deltaV1=V1-V0;
errdeltaV1=pow(errV0*errV0+errV1*errV1,0.5);
// printf("\nEl valor del deltaV es: %f%c%f", deltaV1,241,
errdeltaV1);

```

```

deltaV1_V=(V1-V0)/V0;
errdeltaV1_V=pow((errdeltaV1/deltaV1)*(errdeltaV1/deltaV1)+(
    errV0/V0)*(errV0/V0),0.5)*deltaV1_V;
// printf("\nEl valor del deltaV/V0 es: %f%c%f", deltaV1_V
    ,241,errdeltaV1_V);
// SEGUNDO DELTA V / V
for (int i= t3; i<t4; i++)
{
sumaV2=sumaV2+datos_en16_1[i];
sumaV2cuadrado=sumaV2cuadrado+datos_en16_1[i]*datos_en16_1[i];
}

V2=escalaV1*(float)sumaV2/divisor3;
V2cuadrado=escalaV1*escalaV1*(float)sumaV2cuadrado/(divisor3
    *25);
varV2=V2cuadrado-V2*V2;
desvestV2=pow(varV2,0.5);
if (t4-t3<512)
{
errV2=dist_t[t4-t3-3]*desvestV2*pow(t4-t3,-0.5);
}
else errV2=1.96*desvestV2*pow(t4-t3,-0.5);

// printf("\nEl valor del V2 es: %f%c%f la SD es: %f N: %i",
    V2,241,errV2,desvestV2,t4-t3);
deltaV2=V2-V0;
errdeltaV2=pow(errV0*errV0+errV2*errV2,0.5);
// printf("\nEl valor del deltaV es: %f%c%f", deltaV2,241,
    errdeltaV2);
deltaV2_V=(V2-V0)/V0;
errdeltaV2_V=pow((errdeltaV2/deltaV2)*(errdeltaV2/deltaV2)+(
    errV0/V0)*(errV0/V0),0.5)*deltaV2_V;
// printf("\nEl valor del deltaV/V0 es: %f%c%f", deltaV2_V,241,
    errdeltaV2_V);

// TERCER DV/V

for (int i= t4; i<t5; i++)
{
sumaV3=sumaV3+datos_en16_1[i];
sumaV3cuadrado=sumaV3cuadrado+datos_en16_1[i]*datos_en16_1[i];
}

```

```

V3=escalaV1*(float)sumaV3/divisor4;
V3cuadrado=escalaV1*escalaV1*(float)sumaV3cuadrado/(divisor4
    *25);
varV3=V3cuadrado-V3*V3;
desvestV3=pow(varV3,0.5);
if (t5-t4<512)
{
errV3=dist_t[t5-t4-3]*desvestV3*pow(t5-t4,-0.5);
}
else errV3=1.96*desvestV3*pow(t5-t4,-0.5);

// printf("\nEl valor del V3 es: %f%c%f la SD es: %f N: %i", V3
    ,241,errV3,desvestV3,t5-t4);
deltaV3=V3-V0;
errdeltaV3=pow(errV0*errV0+errV3*errV3,0.5);
// printf("\nEl valor del deltaV es: %f%c%f", deltaV3,241,
    errdeltaV3);
deltaV3_V=(V3-V0)/V0;
errdeltaV3_V=pow((errdeltaV3/deltaV3)*(errdeltaV3/deltaV3)+(
    errV0/V0)*(errV0/V0),0.5)*deltaV3_V;
// printf("\nEl valor del deltaV/V0 es: %f%c%f", deltaV3_V,241,
    errdeltaV3_V);

//cuarto deltaV
for (int i= t5; i<t6; i++)
{
sumaV4=sumaV4+datos_en16_1[i];
sumaV4cuadrado=sumaV4cuadrado+datos_en16_1[i]*datos_en16_1[i];
}

V4=escalaV1*(float)sumaV4/divisor5;
V4cuadrado=escalaV1*escalaV1*(float)sumaV4cuadrado/(divisor5
    *25);
varV4=V4cuadrado-V4*V4;
desvestV4=pow(varV4,0.5);
if (t6-t5<512)
{
errV4=dist_t[t6-t5-3]*desvestV4*pow(t6-t5,-0.5);
}
else errV4=1.96*desvestV4*pow(t6-t5,-0.5);

// printf("\nEl valor del V4 es: %f%c%f la SD es: %f N: %i", V4
    ,241,errV4,desvestV4,t6-t5);
deltaV4=V4-V0;

```

```

errdeltaV4=pow(errV0*errV0+errV4*errV4,0.5);
// printf("\nEl valor del deltaV es: %f%c%f", deltaV4,241,
    errdeltaV4);
deltaV4_V=(V4-V0)/V0;
errdeltaV4_V=pow(((errdeltaV4/deltaV4)*(errdeltaV4/deltaV4)+(
    errV0/V0)*(errV0/V0),0.5)*deltaV4_V);
// printf("\nEl valor del deltaV/V0 es: %f%c%f", deltaV4_V,241,
    errdeltaV4_V);

//quinto deltaV
for (int i= t6; i<t7; i++)
{
sumaV5=sumaV5+datos_en16_1[i];
sumaV5cuadrado=sumaV5cuadrado+datos_en16_1[i]*datos_en16_1[i];
}

V5=escalaV1*(float)sumaV5/divisor6;
V5cuadrado=escalaV1*escalaV1*(float)sumaV5cuadrado/(divisor6
    *25);
varV5=V5cuadrado-V5*V5;
desvestV5=pow(varV5,0.5);
if (t7-t6<512)
{
errV5=dist_t[t7-t6-3]*desvestV5*pow(t7-t6,-0.5);
}
else errV5=1.96*desvestV5*pow(t7-t6,-0.5);

//printf("\nEl valor del V5 es: %f%c%f la SD es: %f N: %i", V5
    ,241,errV5,desvestV5,t7-t6);
deltaV5=V5-V0;
errdeltaV5=pow(errV0*errV0+errV5*errV5,0.5); // ver arriba
// printf("\nEl valor del deltaV es: %f%c%f", deltaV5,241,
    errdeltaV5);
deltaV5_V=(V5-V0)/V0;
errdeltaV5_V=pow(((errdeltaV5/deltaV5)*(errdeltaV5/deltaV5)+(
    errV0/V0)*(errV0/V0),0.5)*deltaV5_V);
// printf("\n El valor del deltaV5/V0 es: %f%c%f", deltaV5_V
    ,241,errdeltaV5_V);

// calculo de deltas

```

```

delta1=calcular_delta(angulo_alfa,deltaV1_V);
delta2=calcular_delta(angulo_alfa,deltaV2_V);
delta3=calcular_delta(angulo_alfa,deltaV3_V);
delta4=calcular_delta(angulo_alfa,deltaV4_V);
delta5=calcular_delta(angulo_alfa,deltaV5_V);

float V1promedio=(V2+V3+V4)/3;
float deltaVpromedio=(deltaV2+deltaV3+deltaV4)/3;
float deltaVVpromedio=(deltaV2_V+deltaV3_V+deltaV4_V)/3;
float deltapromedio=(delta2+delta3+delta4)/3;

printf("\n Valor <V aplicado>: %c %4.2f+/-%4.2f V",9,Vapl_final,
      err_finalVapl);
printf("\n Valor <deltaV234/V0>: %c %4.5f\n",9,deltaVVpromedio);
printf(" Valor <deltaV234>: %c %4.2f mV\n",9,1000*deltaVpromedio
      );
printf(" Valor de V0 es: %c %4.2f mV \n",9,1000*V0);
printf(" Valor <V234>: %c%c %4.2f mV\n",9,9,1000*V1promedio);
printf(" Valor <delta234>: %c%f\n",9,deltapromedio);

// printf("angulo: %f deltaV/V: %f delta1: %f\n",angulo_alfa,
      deltaV1_V,delta1);
printf("\n V1 %c V2 %c V3 %c V4 %c V5\n",9,9,9,9,9);
printf(" %4.2f %c %4.2f %c %4.2f %c %4.2f %c %4.2f\n",1000*V1
      ,9,1000*V2,9,1000*V3,9,1000*V4,9,1000*V5);
printf(" DV1 %c DV2 %c DV3 %c DV4 %c DV5\n",9,9,9,9,9);
printf(" %4.2f %c %4.2f %c %4.2f %c %4.2f %c %4.2f\n",1000*
      deltaV1,9,1000*deltaV2,9,1000*deltaV3,9,1000*deltaV4,9,1000*
      deltaV5);
printf(" dV1/V0%c dV2/V0%c dV3/V0%c dV4/V0%c dV5/V0\n",9,9,9,9);
printf(" %4.4f%c %4.4f%c %4.4f%c %4.4f%c %4.4f\n",deltaV1_V,9,
      deltaV2_V,9,deltaV3_V,9,deltaV4_V,9,deltaV5_V);
printf(" delta1%c delta2%c delta3%c delta4%c delta5\n",9,9,9,9);
printf(" %4.4f%c %4.4f%c %4.4f%c %4.4f%c %4.4f\n\n",delta1,9,delta2
      ,9,delta3,9,delta4,9,delta5);

}

void obtener_fecha()
{
time_t rawtime;
struct tm * timeinfo;

```

```

time (&rawtime);
timeinfo = localtime (&rawtime);
strftime (fecha,80,"%Y-%m-%d_%H-%M-%S%p",timeinfo);
strftime (hora,80,"%H_%M_%S_%p",timeinfo);
}

void guardar_info()
{
    strcat(nombre_archivo_info_mediciones,"_");
    strcat(nombre_archivo_info_mediciones,fecha);
    mkdir(nombre_archivo_info_mediciones); //hago el directorio
        antes q conicida con el archivo
    //printf("AHAHHA");

    // printf("%s",nombre_archivo_individual);
    strcpy(nombre_carpeta_info_mediciones,
        nombre_archivo_info_mediciones);
    strcat(nombre_archivo_info_mediciones, ".txt");
    FILE * archivo_info;
    archivo_info=fopen(nombre_archivo_info_mediciones,"w");
    fprintf(archivo_info,"%s", "MUESTRA: ");
    fprintf(archivo_info,"%s",nombre_muestra);
    fprintf(archivo_info, "%c",10);
    fprintf(archivo_info,"%s", "FECHA: ");
    fprintf(archivo_info,"%s",fecha);
    fprintf(archivo_info, "%c",10);
    fprintf(archivo_info,"%s", "ALFA: ");
    fprintf(archivo_info,"%f",angulo_alfa);
    fprintf(archivo_info, "%c",10);
    fprintf(archivo_info,"%s","N medida"); fprintf(archivo_info, "%c",9);
    fprintf(archivo_info,"%s","Vapl(V)"); fprintf(archivo_info, "%c",9);
    fprintf(archivo_info,"%s","V^2"); fprintf(archivo_info, "%c",9);
    ;
    fprintf(archivo_info,"%s","delta1"); fprintf(archivo_info, "%c",9);
    fprintf(archivo_info,"%s","delta2"); fprintf(archivo_info, "%c",9);
    fprintf(archivo_info,"%s","delta3"); fprintf(archivo_info, "%c",9);
    fprintf(archivo_info,"%s","delta4"); fprintf(archivo_info, "%c",9);
    fprintf(archivo_info,"%s","delta5"); fprintf(archivo_info, "%c",9);
}

```

```
fprintf(archivo_info,"%s","V0 (mV)"); fprintf(archivo_info , "%c",9);
fprintf(archivo_info,"%s","V1"); fprintf(archivo_info , "%c",9);
fprintf(archivo_info,"%s","V2"); fprintf(archivo_info , "%c",9);
fprintf(archivo_info,"%s","V3"); fprintf(archivo_info , "%c",9);
fprintf(archivo_info,"%s","V4"); fprintf(archivo_info , "%c",9);
fprintf(archivo_info,"%s","V5"); fprintf(archivo_info , "%c",9);
fprintf(archivo_info,"%s","deltaV1/V0"); fprintf(archivo_info , "%c",9);
fprintf(archivo_info,"%s","deltaV2/V0"); fprintf(archivo_info , "%c",9);
fprintf(archivo_info,"%s","deltaV3/V0"); fprintf(archivo_info , "%c",9);
fprintf(archivo_info,"%s","deltaV4/V0"); fprintf(archivo_info , "%c",9);
fprintf(archivo_info,"%s","deltaV5/V0"); fprintf(archivo_info , "%c",9);
fprintf(archivo_info,"%s","ancho de pulso (s)"); fprintf(archivo_info , "%c",10);

fclose(archivo_info);
}

void pedir_offsets()
{
ejecute(":chan1:offset?\n");
printf(" Offset del canal 1: ");
offset1=leer_param_osc();
ejecute(":chan2:offset?\n");
printf(" Offset del canal 2: ");
offset2=leer_param_osc();
}

void leer_configuracion()
{
char contenido_archivo[4096];
char puerto[32];
char angle[32];
for (int y=0; y<32; y++) {puerto[y]=NULL; angle[y]=NULL;}

FILE *archivo;
archivo= fopen("config.txt","r");
```

```
if (archivo==NULL){printf("\nError al abrir archivo de
    configuracion!! Saliendo...\n");exit(EXIT_FAILURE);}
fseek (archivo, 0, SEEK_END);
int tamano_archivo=ftell(archivo);
//printf("el archivo tiene %i bytes\n",tamano_archivo);
int m=0;
int n=0;
fseek (archivo, 0, SEEK_SET);
int lineas=0;
int comienzos_lineas[64];
while (m<tamano_archivo)
{
    contenido_archivo[m]=getc(archivo);
    // printf("%c",contenido_archivo[m]);
    if (contenido_archivo[m]==10) {lineas++;}
m++;
comienzos_lineas[lineas]=m;
}
//printf("\nel archivo tiene %i lineas\n",lineas);
//printf("las lineas comienzan en: ");
//for (int i=0; i<lineas; i++) { printf("%i; ",comienzos_lineas
    [i]);}
//printf(" \n");
for (int i=0; i<lineas; i++)
{
    // printf("\n %i %i %c",i+1,comienzos_lineas[i],
        contenido_archivo[comienzos_lineas[i]+1]);
    if (contenido_archivo[comienzos_lineas[i]+1]==112) // si la
        linea arranca con una p
    {
        if (contenido_archivo[comienzos_lineas[i]+7]!=61) {printf
            ("\nConfig puerto en el archivo erronea\n"); exit(
                EXIT_FAILURE);}
        //caracter inicial de la linea
        // printf("\n caracter inicial de la linea %c\n",
            contenido_archivo[comienzos_lineas[i]+1]);
        //caracter final de la linea
        // printf("\n caracter final de la linea %c\n",
            contenido_archivo[comienzos_lineas[i+1]-1]);
        int a=comienzos_lineas[i]+8;
        int b=comienzos_lineas[i+1];
        for (int u=a;u<b; u++) {puerto[u-a]=contenido_archivo[u];}
    }
}
```

```
else if (contenido_archivo[comienzos_lineas[i]+1]==97) //si la
    linea comienza con una a
{
    if (contenido_archivo[comienzos_lineas[i]+7]!=61) {printf
        ("\nConfig angulo en el archivo erronea\n"); exit(
        EXIT_FAILURE);}
//caracter inicial de la linea
//    printf("\n caracter inicial de la linea %c\n",
        contenido_archivo[comienzos_lineas[i]+1]);
//caracter final de la linea
//    printf("\n caracter final de la linea %c\n",
        contenido_archivo[comienzos_lineas[i+1]-1]);
int c=comienzos_lineas[i]+8;
int d=comienzos_lineas[i+1];
for (int t=c;t<d; t++) {angle[t-c]=contenido_archivo[t];}

}
}
//printf("\n el puerto es: %s\n",puerto);
//printf("\n el angle es %s, y convertido a float es: %f",angle
    ,atof(angle));
strcat(n_puerto_osc,puerto);
angulo_alfa=atof(angle);

}

void cerrar_puerto()
{
CloseHandle(com_osc);//Closing the Serial Port
}

void crear_directorios()
{
char directorio []="Datos";
mkdir(directorio);

}

void guardar_encabezado()
{
FILE * archivo_info3;
archivo_info3=fopen("encabezado1.txt","w");
for (int i=0;i<18; i++) fprintf(archivo_info3,"%c",encabezado_1
    [i]);
```

```

fclose(archivo_info3);
FILE * archivo_info4;
archivo_info4=fopen("encabezado2.txt","w");
for (int i=0;i<18; i++) fprintf(archivo_info4,"%c",encabezado_2
    [i]);
fclose(archivo_info4);

FILE * encabezado_corto_archivo;
encabezado_corto_archivo=fopen("encabezado_corto.txt","w");
for (int i=0; i<15; i++) fprintf(encabezado_corto_archivo,"%c",
    encabezado_corto[i]);
fclose(encabezado_corto_archivo);

}

void guardar_curvas()
{ float escala_tiempo;
  ejecute("timebase:scale?\n");
  printf(" Tiempo por division: ");
  escala_tiempo=leer_param_osc();
  float sample_time=escala_tiempo/250;
  printf(" Tiempo por muestra: %e\n", sample_time);

FILE * archivo_individual;
archivo_individual=fopen(nombre_archivo_individual,"w");
printf("%s",nombre_archivo_individual);
if(archivo_individual==NULL) {printf("ERROR AL GUARDAR ARCHIVO
    INDIVIDUAL");}
float correccion=65536; // corrimiento por el complemento a 2
float tiempo_muestra;
for( int i=0; i< 4000; i++)
{ tiempo_muestra=(float)i*sample_time;
valores_1_cortos[i]=(float)datos_en16_1_corto[i]*escalaV1/25;
    /*escalaV1/factor;
valores_2_cortos[i]=(float)datos_en16_2_corto[i]*escalaV2/25;
    /*escalaV2/factor;

fprintf(archivo_individual,"%4.5e",tiempo_muestra);
  fprintf(archivo_individual,"%c",9);
fprintf(archivo_individual,"%f",valores_1_cortos[i]);
fprintf(archivo_individual,"%c",9);
fprintf(archivo_individual,"%f",valores_2_cortos[i]);

```

```
fprintf(archivo_individual,"%c",10);
//if(i%200==0) { printf("."); }
}
// printf(" hecho\n");
}

void guardar_bruto_corto()
{
FILE * archivo_corto_bruto;
archivo_corto_bruto=fopen("CANAL_CORTO.dat","w");

for (int i=0; i<8015; i++)
{
fprintf(archivo_corto_bruto,"%c",datos_recibidos_2_corto[i]);
}

FILE * archivo_corto_concatenado;
archivo_corto_concatenado=fopen("canal_concatenado.dat","w");
for (int i=0; i<4000; i++)
{
fprintf(archivo_corto_concatenado,"%i",datos_en16_1_corto[i]);
fprintf(archivo_corto_concatenado,"%c",10);
}

}

void confirmar_alfa()
{
int k=0;
char respuesta_alfa[32];
printf(" El alfa elegido es: %f; s/n ... ",angulo_alfa);
scanf("%s",&respuesta_alfa);
while (k==0)
{

char si1 []="s";
char si2 []="S";
char si3 []="Y";
char si4 []="y";
char no1 []="n";
char no2 []="N";
if (strcmp(si1,respuesta_alfa) == 0 || strcmp(si2,
respuesta_alfa) == 0 )
{
k++;

```

```
printf(" OK\n");

}
else if ( strcmp(si3 ,respuesta_alfa) == 0 || strcmp(si4 ,
    respuesta_alfa) == 0)

{    k++;
printf(" OK\n");

}

else if (strcmp(no1 ,respuesta_alfa) == 0  || strcmp(no2 ,
    respuesta_alfa) == 0)
{    k++;
printf("\nCorrija la configuracion , saliendo... \n");
exit(EXIT_FAILURE);

}
else { printf(" El alfa elegido es: %f; S/N ... ",angulo_alfa)
;
scanf("%s",&respuesta_alfa);}

}

}

void preguntar_si_seguir()
{    int seguir_respondido=0;
while(seguir_respondido==0)
{

printf("\n Quiere adquirir otra medida? s/n ... \n ");
char respuesta_seguir[32];
char seguir1 []="s ";
char seguir2 []="S ";
char seguir3 []="Y ";
char seguir4 []="y ";
char frenar1 []="n ";
char frenar2 []="N ";
scanf("%s",respuesta_seguir);
if (strcmp(respuesta_seguir ,seguir1)==0 || strcmp(
    respuesta_seguir ,seguir2)==0 || strcmp(respuesta_seguir ,
```

```
    seguir3)==0 || strcmp(respuesta_seguir ,seguir4)==0)
{
printf("\n Adquiriendo siguiente ... \n");
seguir_respondido=1;
}
else if(strcmp(respuesta_seguir ,frenar1)==0 || strcmp(
    respuesta_seguir ,frenar2)==0)
{
printf("\n terminando... \n");
seguir=1;
seguir_respondido=1;
}
else
{
printf("\n Quiere adquirir otra medida? S/N ... \n ");
scanf("%s",respuesta_seguir);
}
}
}

int main()
{ // elegir_puerto_osc();

char n_medida[8];
crear_directorios();
obtener_fecha();
leer_configuracion();
abrir_puerto_osc();
PurgeComm(com_osc,0x0001);
PurgeComm(com_osc,0x0002);
PurgeComm(com_osc,0x0004);
PurgeComm(com_osc,0x0008);
confirmar_alfa();
pedir_offsets();
escalasV();
preguntar_nombre();
guardar_info();
cerrar_puerto();
printf(" Cuando la medida este lista presione cualquier tecla
    para continuar... \n");
getch();
while (seguir==0) {
abrir_puerto_osc();
escalasV();
```

```
ejecute (":acq1:lmem?\n");
leer_datos_osc_1();
ejecute (":acq2:lmem?\n");
leer_datos_osc_2();
calculo_voltajes();
detectar_subida();
calculo_promedios();
ejecute (":acquire1:memory?\n");
leer_osc_corto_1();
ejecute (":acquire2:memory?\n");
leer_osc_corto_2();
guardar_encabezado();
obtener_fecha();
char Vapl_string[32];
strcpy(nombre_archivo_individual,nombre_carpeta_info_mediciones
); //meto la carpeta en el nombre
strcat(nombre_archivo_individual,"\\");
strcat(nombre_archivo_individual,nombre_muestra);
strcat(nombre_archivo_individual,"_");
int q=sprintf(Vapl_string,"%4.2f",Vapl_final);
strcat(nombre_archivo_individual,Vapl_string);
strcat(nombre_archivo_individual,"V_");
int r=sprintf(n_medida,"%i",medida);
strcat(nombre_archivo_individual,n_medida);
strcat(nombre_archivo_individual,".dat");
guardar_curvas();

FILE * archivo_info;
archivo_info=fopen(nombre_archivo_info_mediciones,"a");
fprintf(archivo_info,"%s",n_medida); fprintf(archivo_info, "%c
",9);
fprintf(archivo_info,"%4.3e",Vapl_final); fprintf(archivo_info,
"%c",9);
fprintf(archivo_info,"%4.3e",Vapl_final*Vapl_final*10000);
fprintf(archivo_info, "%c",9);
fprintf(archivo_info,"%4.3e",delta1); fprintf(archivo_info, "%c
",9);
fprintf(archivo_info,"%4.3e",delta2); fprintf(archivo_info, "%c
",9);
fprintf(archivo_info,"%4.3e",delta3); fprintf(archivo_info, "%c
",9);
fprintf(archivo_info,"%4.3e",delta4); fprintf(archivo_info, "%c
",9);
```

```
fprintf(archivo_info,"%4.3e",delta5); fprintf(archivo_info,"%c",9);
fprintf(archivo_info,"%4.3f",V0*1000); fprintf(archivo_info,"%c",9);
fprintf(archivo_info,"%4.3f",V1*1000); fprintf(archivo_info,"%c",9);
fprintf(archivo_info,"%4.3f",V2*1000); fprintf(archivo_info,"%c",9);
fprintf(archivo_info,"%4.3f",V3*1000); fprintf(archivo_info,"%c",9);
fprintf(archivo_info,"%4.3f",V4*1000); fprintf(archivo_info,"%c",9);
fprintf(archivo_info,"%4.3f",V5*1000); fprintf(archivo_info,"%c",9);
fprintf(archivo_info,"%f",deltaV1_V); fprintf(archivo_info,"%c",9);
fprintf(archivo_info,"%f",deltaV2_V); fprintf(archivo_info,"%c",9);
fprintf(archivo_info,"%f",deltaV3_V); fprintf(archivo_info,"%c",9);
fprintf(archivo_info,"%f",deltaV4_V); fprintf(archivo_info,"%c",9);
fprintf(archivo_info,"%f",deltaV5_V); fprintf(archivo_info,"%c",9);
fprintf(archivo_info,"%4.3e",ancho_u_segundos); fprintf(archivo_info,"%c",10);
fclose(archivo_info);
cerrar_puerto();
preguntar_si_seguir();
medida++;

}
return 0;
}
```


Apéndice B

Anexo de Capítulo 4

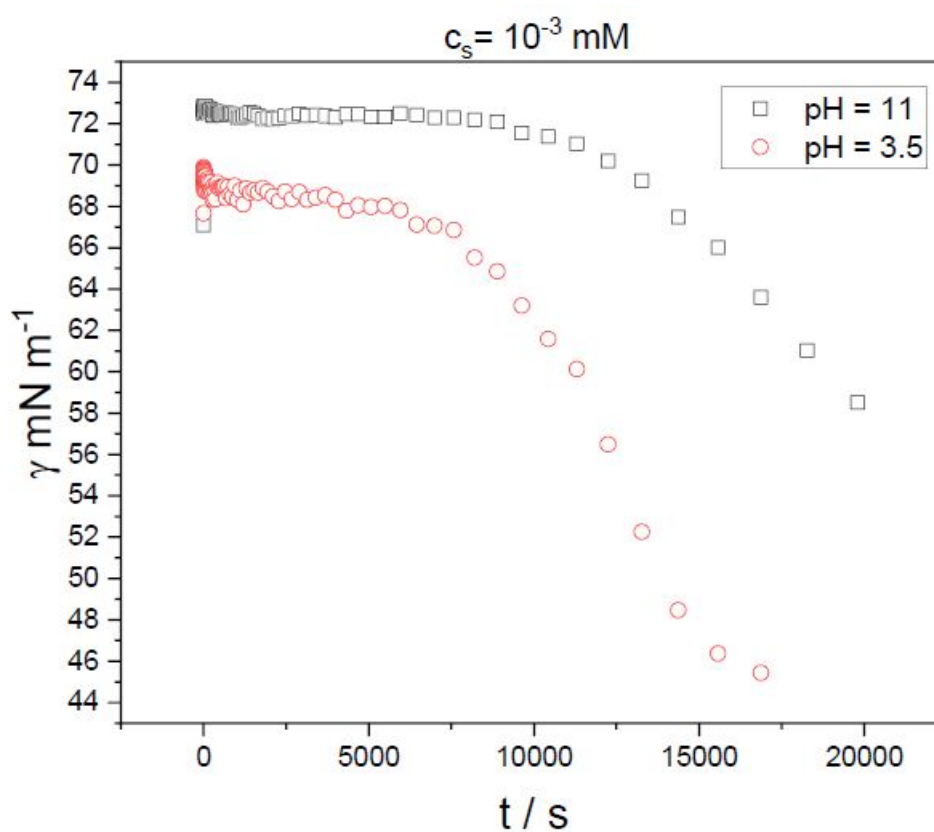


Figura B.1: Tensión superficial dinámica de 1 mg mL^{-1} PAA mezclado con G12 a la concentración de 10^{-3} mM . Se muestran las curvas para tres pHs: 3.5 (círculos) y 11 (cuadrados)

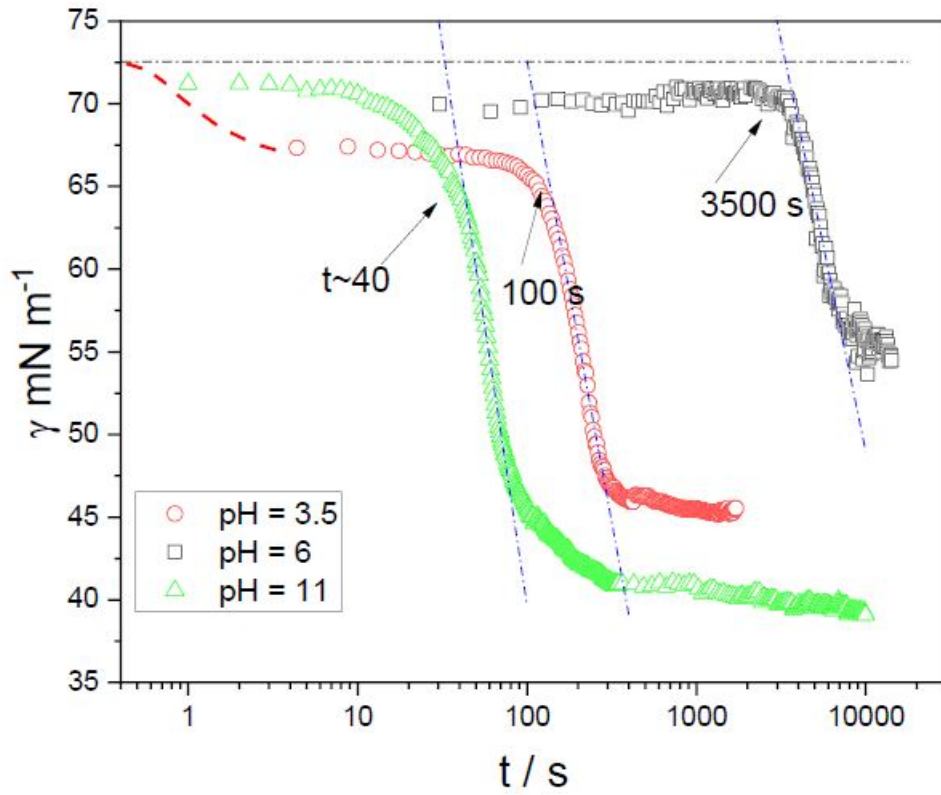


Figura B.2: Tensión superficial dinámica de 1 mg mL^{-1} PAA mezclado con G12 a la concentración de $4 \times 10^{-2} \text{ mM}$. Se muestran las curvas para tres pHs: 3.5 (cuadrados), 6 (círculos) y 11 (triángulos)

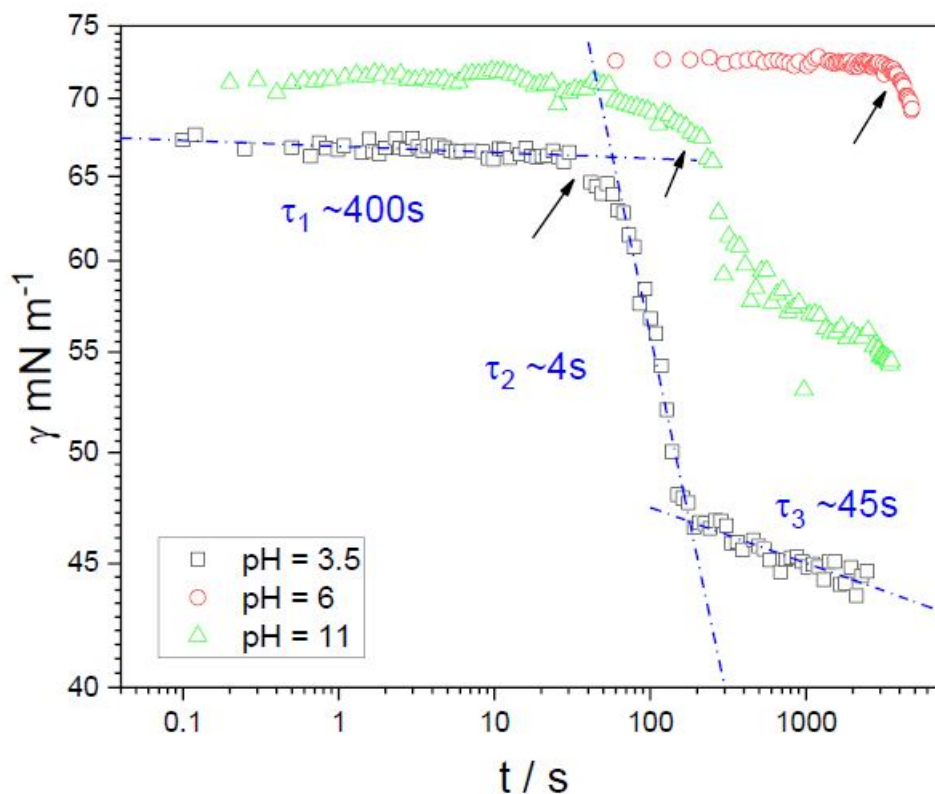


Figura B.3: Tensión superficial dinámica de 1 mg mL^{-1} PAA mezclado con G12 a la concentración de 0.1 mM . Se muestran las curvas para tres pHs: 3.5 (cuadrados), 6 (círculos) y 11 (triángulos)

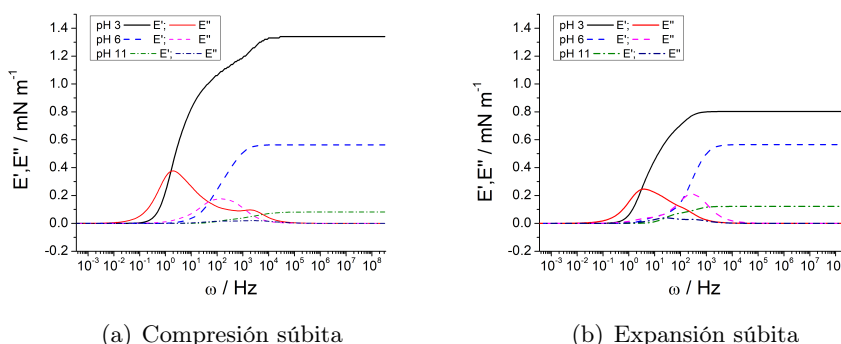


Figura B.4: Coeficientes elástico y viscosos obtenidos de experimentos de compresión y expansión súbita para el sistema 1 mg mL^{-1} PAA mezclado con G12 a la concentración de $4 \cdot 10^{-2} \text{ mM}$.

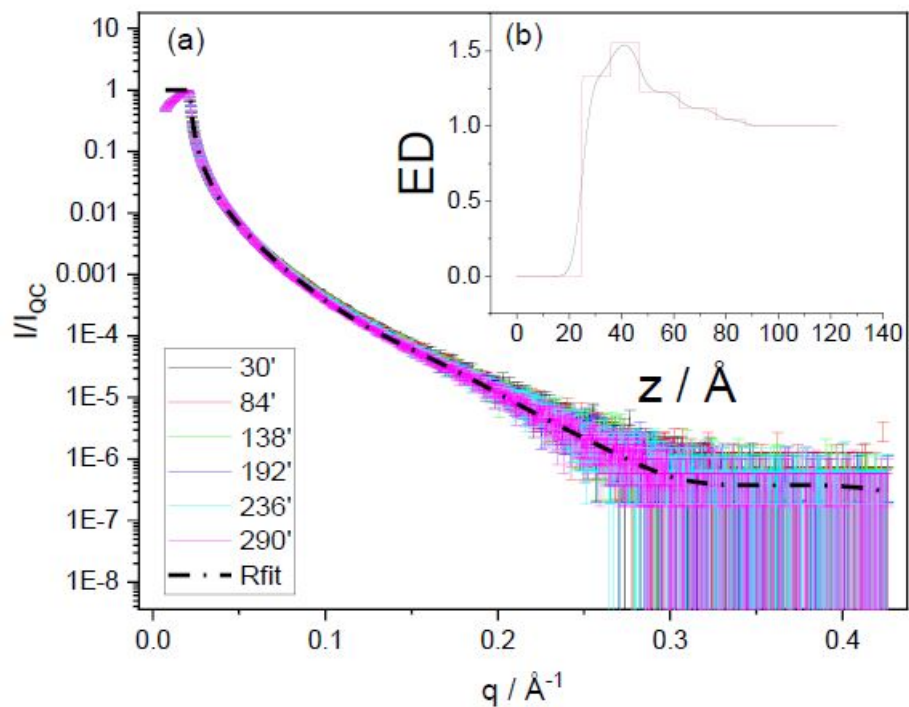


Figura B.5: Resultados de XRR para una solución de 1 mg mL^{-1} PAA + 4×10^{-2} mM G12. Reflectividad vs. vector de onda (Inset) Perfil de densidad electrónica (ED) obtenido con un ajuste modelo-independiente (línea negra) y con un modelo de caja (línea punteada roja)

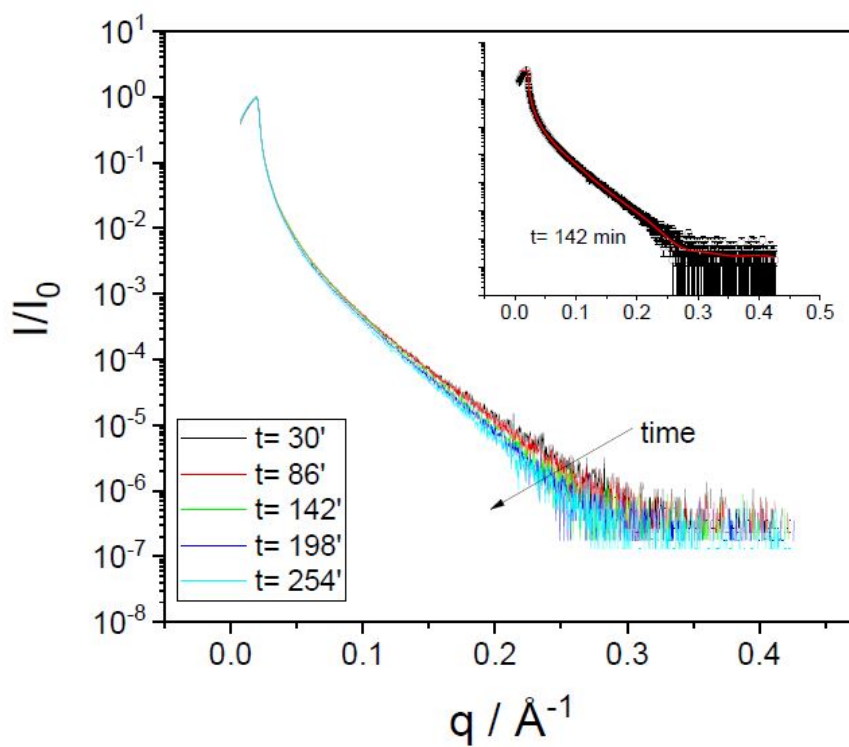
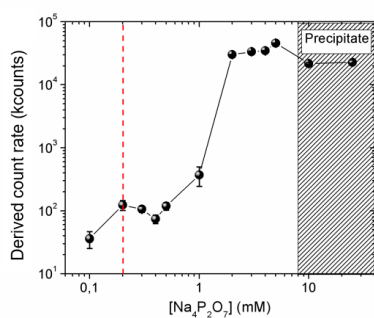


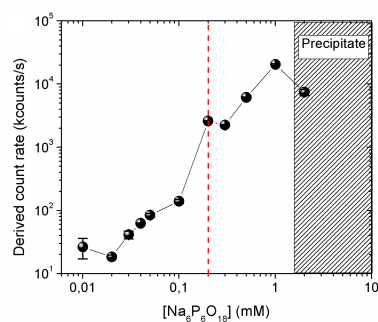
Figura B.6: Curvas de XRR para 1 mg mL^{-1} PAA + 10^{-3} mM G12 a pH 3, como función del tiempo de adsorción. El inset muestra el resultado de ajuste modelo-independiente; en este caso, la curva corresponde a un tiempo de adsorción de 142 min.

Apéndice C

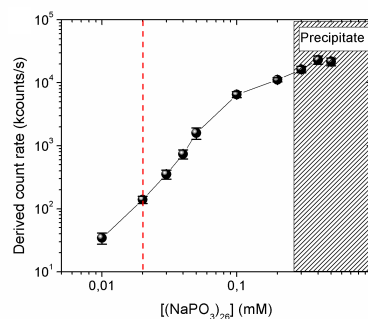
Anexo de Capítulo 5



(a) $Na_4P_2O_7$



(b) $Na_6P_6O_{18}$



(c) $(NaPO_3)_{26}$

Figura C.1: Tasa de cuentas para el PAH vs distintas concentraciones de varios polifosfatos

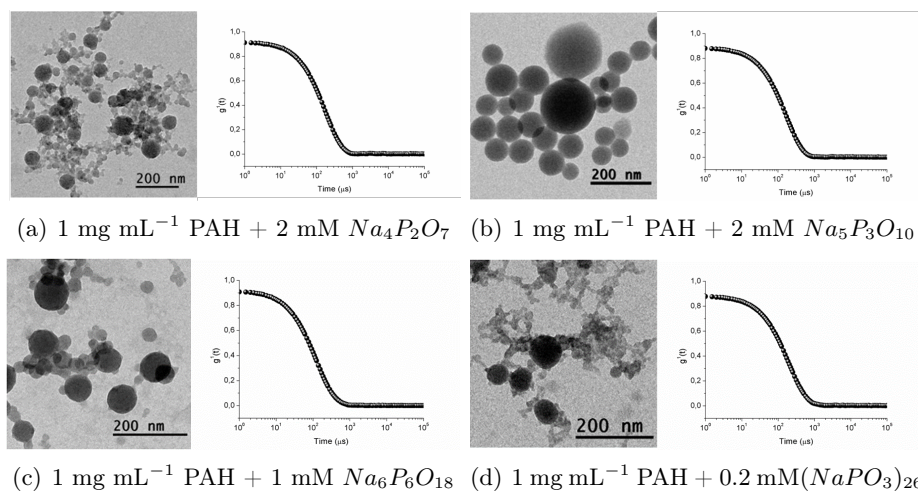


Figura C.2: Imágenes TEM y funciones de autocorrelación obtenidas por DLS para los sistemas PAH-sales de fosfato