

UNIVERSIDAD DE SONORA

DEPARTAMENTO DE FISICA
POSGRADO EN NANOTECNOLOGIA

“INTERACCION DE UN SISTEMA DE NANOPARTICULAS HÍBRIDO CON UN
MODELO DE MEMBRANA”



TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN NANOTECNOLOGIA

Presenta:

Julio Cesar Melendres Sánchez

Asesor:

Dr. Miguel Ángel Valdés Covarrubias

HERMOSILLO, SONORA

SEPTIEMBRE 2015

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

“Cuando alguien que de verdad necesita algo
lo encuentra, no es la casualidad quien se lo procura,
sino el mismo. Su propio deseo y su propia necesidad
lo conducen a ello”

-Herman Hesse (1877-1962)

DEDICATORIA

A MIS PADRES.

Ricardo Melendres y Lourdes Sánchez, quienes me han dado las herramientas para defenderme en este mundo e infundado con los valores para ser una mejor persona.

A MIS HERMANOS.

Israel Chávez y Ricardo Melendrez, quienes han sido mis compañeros, cómplices, consejeros y me han apoyado en cada paso de todo este viaje.

A MIS AMIGOS.

Todos y cada uno de ustedes ha contribuido en mí con su amistad y los guardo a ustedes en mis recuerdos, pero debo mencionar:

Félix Pérez, quien ha creído en mí y seguirá creyendo en mi potencial, aquel que se preocupó y preocupa por mí aun cuando la distancia nos aparta, nos volveremos a ver amigo.

AGRADECIMIENTOS

Es para mí un honor el haber trabajado con los doctores que menciono a continuación y es por ello me permito agradecer su asesoría, paciencia y atención:

Dr. Miguel Ángel Valdés Covarrubias por el apoyo y consejo en cada paso, por la dedicación a todos y cada uno de sus estudiantes por igual.

Dr. Josué Elías Juárez Onofre por mantener siempre su puerta abierta y darse el tiempo para brindar apoyo, consejo y una amistad a todo aquel que siempre lo ha necesitado.

Dr. Mario Enrique Álvarez Ramos por dar el voto de confianza en aquellos que desean superarse.

Me permito también agradecer al técnico **MCM Jaime Manuel Ibarra Hurtado** por su colaboración y asesoría en la realización de este proyecto.

A la **Universidad de Sonora** que ha prestado sus instalaciones y personal para contribuir en mi formación.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** con el proyecto 151794 por su apoyo en la formación de profesionistas capacitados.

Al **Posgrado en Nanotecnología** por permitirme realizar un paso más en mi desarrollo profesional.

Y por último un agradecimiento a **mis compañeros** del posgrado en nanotecnología

ABSTRACT

At this work we researched the interaction of a hybrid functional nanoplatfrom with a cell membrane model. The model was prepared using a mix of phospholipids such as: 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, L- α -phosphatidylserine, and sphingomyelin. This phospholipids are the main components of the endothelial cells which all together form the blood brain barrier[1]. The hybrid nanoplatfrom consisted of a core of magnetite (Fe_3O_4) and a matrix of poly lactic co-glycolic acid (PLGA) covered with different concentrations of chitosan, with the objective of control, modify and invert the superficial charge of the nanoplatfrom from anionic to cationic to promote nonspecific interactions on our nanoplatfrom with the membrane model.

Additionally we characterized the nanoplatfrom in size and shape using a dynamic light scattering (DLS) and an atomic force microscopy (AFM), alongside we used a Ubbelohde viscometer to determine the concentration of nanoparticles obtaining a promising system as a drug carrier and early diagnostic on degenerative diseases.

The membrane model was carried out using a Langmuir Blodgett trough in a water-air interface dispositioning a mix of phospholipids on the surface of clean water. The study of adsorption was carried out injecting nanoparticles at different concentrations of chitosan; isotherms and adsorption graphics were obtained as a result.

RESUMEN

En este trabajo se realizó la investigación de la interacción de una nanoplataforma híbrida funcional con un modelo de membrana celular. El modelo de membrana consistió en una mezcla de fosfolípidos tales como: 1,2 dipalmitoil-sn-glicerol-3 fosfocolina, L- α -fosfatidilserina, esfingomiélin. Estos fosfolípidos son los componentes principales de la células endoteliales que forman la barrera hematoencefálica[1]. La nanoplataforma híbrida consiste en un núcleo de magnetita (Fe_3O_4) y un recubrimiento de ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA por sus siglas en inglés) así como un segundo recubrimiento de quitosano, con el objetivo de controlar e invertir la carga de la superficie de la nanoplataforma de aniónica a catiónica, para favorecer las interacciones no específicas nanoplataforma-modelo de membrana.

Adicionalmente, el tamaño y forma de la nanoplataforma se caracterizó con dispersión de luz (DLS), microscopía de fuerza atómica (AFM) y un viscosímetro de Ubbelohde para determinar concentración, obteniendo un sistema prometedor para la liberación controlada de fármacos y diagnóstico temprano de enfermedades.

La construcción del modelo de membrana se llevó a cabo utilizando una balanza de Langmuir (Nima Technologies) en interfase aire-agua mediante la deposición de una mezcla de fosfolípidos. Los estudios de adsorción se desarrollaron inyectando nanopartículas, preparadas con diferentes concentraciones de quitosano y se obtuvieron las isothermas de adsorción.

INDICE

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ABSTRACT	iv
RESÚMEN	v
INDICE DE FIGURAS	viii
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEORICO.....	3
FOSFOLÍPIDOS.....	3
MEMBRANA CELULAR.....	4
MODELOS DE MEMBRANA	6
NANOPARTICULAS	7
ANTECEDENTES.....	8
JUSTIFICACION	10
HIPOTESIS	11
OBJETIVOS	12
DESCRIPCIÓN DE TÉCNICAS	13
DISPERSION DINAMICA DE LUZ.....	13
POTENCIAL ZETA.....	15
ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER ...	16
MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA.....	18
VISCOSIMETRO DE UBBELOHDE.....	19
BALANZA DE LANGMUIR.....	21
METODO DE WILLHELMY.....	22
ISOTERMA PRESIÓN-ÁREA	23
MATERIALES Y METODOS	26
SINTESIS DE NANOPARTICULAS DE MAGNETITA	26
SINTESIS DE NANOPARTICULAS DE MAGNETITA CON RECUBRIMIENTO PLGA	27
SINTESIS DE NANOPARTICULAS CON UN NUCLEO DE MAGNETITA Y RECUBRIMIENTO PLGA CON QUITOSANO	28
DISTRIBUCION DE TAMAÑO POR DISPERSIÓN DE LUZ.....	28
DETERMINACIÓN DE CONCENTRACION POR VISCOSIMETRIA.....	29

POTENCIAL ZETA DE NANOPARTICULAS.....	29
MORFOLOGIA POR MICROSCOPIA DE FUERZA ATOMICA.....	30
ESPECTOMETRIA DE INFRARROJO	30
ISOTERMAS DE FOSFOLIPIDOS.....	30
ADSORCION DE LAS NANOPARTICULAS EN UN MODELO DE MEMBRANA	31
RESULTADOS Y DISCUSIONES	32
ESPECTROMETRIA DE INFRARROJO.....	32
MORFOLOGIA DE LAS NANOPARTICULAS	33
DLS Y POTENCIAL ZETA	34
POTENCIAL ZETA DE LAS NANOPARTICULAS	38
INTERACCION DE NANOPARTICULAS EN LOS MODELOS DE MEMBRANA	40
CONCLUSIONES.....	44
PERSPECTIVAS.....	45
REFERENCIAS.....	46
ANEXO 1.....	48

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de una molécula de fosfolípido. La fosfatidilcolina, representada de forma esquemática A) como fórmula química B) como modelo espacial compacto C) en forma de símbolo D).Delimitación de los grupos polar y no polar de la fosfatidilcolina.[3].....	4
Figura 2 Membrana celular esquema representativo de una bicapa semipermeable de lípidos común para todo ser vivo, la cual contiene una amplia variedad de moléculas biológicas.	5
Figura 3. <i>Representación esquemática de un experimento de dispersión de luz dinámica.</i>	14
Figura 4. Carga superficial de una partícula.....	16
Figura 5 Operación de un Infrarrojo con transformada de Fourier.	17
Figura 6 Muestra de los componentes de un microscopio de fuerza atómica.	19
Figura 7 Imagen de un Viscosímetro de Ubbelohde	20
Figura 8. Componentes de una Balanza de Langmuir	22
Figura 9 Transiciones de fase de una isoterma general y representación física de una monocapa a medida que se comprime	25
Figura 10. Espectros Infrarrojo de 1) Ácido Oleico puro 2) Nanopartículas de Magnetita cubiertas con ácido oleico.	33
Figura 11. Imágenes AFM de a) matriz polimérica b) relación molar 1:1 c) relación molar 1:3 d) relación molar 1:5.....	34
Figura 12. Diámetro hidrodinámico de la partícula (DLS) e imágenes AFM de las nanopartículas de magnetita/PLGA modificadas con diferentes concentraciones de Quitosano: a) nanopartículas de magnetita/PLGA sin Quitosano b) nanopartículas con 1.66×10^{-8} M de Quitosano c) 3.33×10^{-8} M d) 2.66×10^{-7} M e) 2.13×10^{-6} M, y f) 3.33×10^{-6} M.	36
Figura 13. Comportamiento experimental de las mediciones de las mediciones de potencial zeta en las nanopartículas de magnetita/PLGA a diferentes concentraciones de quitosano.....	39
Figura 14. Isotermas de presión-área y valores de módulos de compresibilidad contra presión superficial para nanopartículas de magnetita/PLGA/quitosano con diferente carga en la subfase (9.3×10^{10} Nps/ml) en un modelo de membrana consistente de una mezcla de tres fosfolípidos en una interfaz aire-agua.	42
Figura 15. Datos experimentales de absorción para nanopartículas de magnetita/PLGA/quitosano con diferente carga en un modelo de membrana consistente de una mezcla de tres fosfolípidos en una interfaz aire agua.	43

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proporción de fosfolípidos utilizada en el modelo de membrana.	26
Tabla 2. Diferentes relaciones molares con su correspondiente diámetro, potencial zeta, polidispersidad.....	35

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es una ciencia multidisciplinaria que aborda la manipulación de la materia en un nivel atómico, molecular y supramolecular. La escala de trabajo parte desde 1 hasta 100 nanómetros, conocida también como la nano escala, donde las propiedades físicas, químicas y biológicas de los materiales son excepcionales que difieren de manera importante en relación al material en bulto [2].

Como puede observarse de la definición, la nanotecnología es un campo multidisciplinario y extenso en donde convergen diversas ramas de la ciencia como la mecánica de superficies, química orgánica, biología molecular, física de semiconductores y medicina, por mencionar algunas. La investigación y aplicación de la nanotecnología es un tema amplio que abarca desde la obtención de dispositivos físicos convencionales hasta el desarrollo de nuevos materiales con dimensiones nanométricas, utilizando mecanismos de auto ensamblaje molecular para controlar la materia a escala atómica.

Una aplicación que tiene gran futuro es la aplicación de fármacos de tamaño nanométrico, los cuales tengan la capacidad de liberar el fármaco donde se desee, tomando en cuenta la carga de la nanopartícula para favorecer la afinidad hacia ciertas células. Es por esto que los sistemas de escala nanométrica son prometedores en la cura de enfermedades degenerativas tales como el Alzheimer, cáncer, etc., utilizándose como medios de administración dirigida de fármacos, detección y diagnóstico de enfermedades patológicas a etapas tempranas, siendo un tema fundamental la realización de modelos que expliquen el comportamiento de una membrana celular en un ambiente de nanopartículas, para la creación de nanoestructuras y nanoplataformas que sean biocompatibles con las funciones que desempeña la célula.

MARCO TEORICO

FOSFOLÍPIDOS

Los lípidos tienen un rango de propiedades interesantes para la nanotecnología, pueden autoensamblarse en nanopelículas y otras nanoestructuras tales como micelas, micelas inversas y liposomas, lo cual es debido a las diversas propiedades de autoensamblaje que ofrecen un amplio rango de trabajo en la realización de modelos [3].

Los fosfolípidos son los constituyentes principales de las membranas biológicas. Son moléculas anfifílicas con una cola hidrofóbica, tal como la serina o dos colas hidrofóbicas, como la fosfatidilcolina, con cabezas de grupos hidrófilos solubles en agua. Los grupos en la cabeza de los fosfolípidos pueden tener carga positiva, negativa o neutra, algunos con propiedades zwitteriónicas. En medio acuoso, las interacciones intermoleculares entre las moléculas de fosfolípidos están gobernadas por las interacciones hidrofóbicas que puede conducir a la formación espontánea de estructuras tales como micelas y estructuras vesiculares (bicapas), las cuales también se ven afectadas por la temperatura y la presión.

La Figura 1 muestra la estructura de una molécula de fosfolípido, la cual cuenta con una cabeza hidrofóbica consistente de un grupo fosfato y dos colas o cadenas hidrocarbonadas.

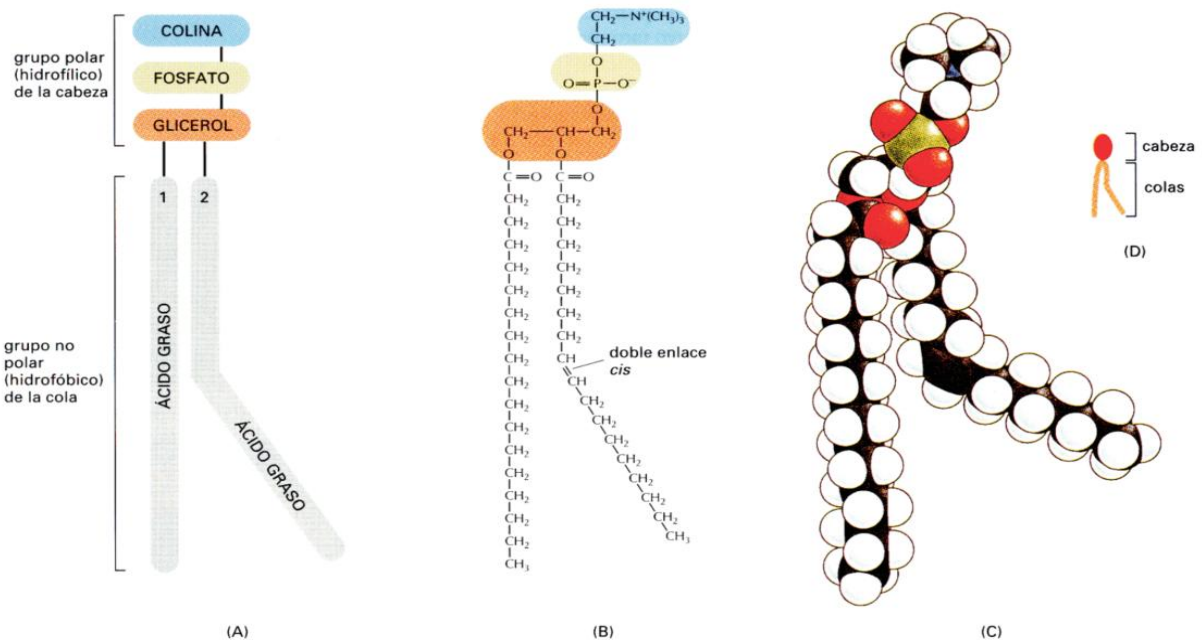


Figura 1. Estructura de una molécula de fosfolípido. La fosfatidilcolina, representada de forma esquemática A) como fórmula química, B) como modelo espacial compacto, C) en forma de símbolo, y D) delimitación de los grupos polar y no polar de la fosfatidilcolina. [3]

MEMBRANA CELULAR

La membrana celular es una estructura esencial en animales y plantas. Las funciones que realiza la membrana celular involucran aspectos vitales en el funcionamiento de una célula, partiendo desde simples funciones mecánicas tales como motilidad y atrapamiento de comida, hasta procesos bioquímicos altamente específicos tales como transducción de energía, reconocimiento inmunológico, conducción nerviosa, y biosíntesis. Las membranas biológicas son altamente complejas y variadas, consisten de una bicapa continua de lípidos en las cuales las proteínas de la membrana están embebidos. Estas bicapas son fluidas, con moléculas lipídicas capaces de difundir rápidamente a través de su propia bicapa. Los lípidos de la membrana son anfipáticos, donde la mayor parte se conforma de fosfolípidos.

Existen tres clases de moléculas en la membrana lipídica: fosfolípidos, colesterol y glicolípidos [4]. La composición de la monocapa interior varía de la monocapa exterior, reflejando las diferentes funciones de la membrana. La estructura de conformación de una mezcla de lípidos es diferente en función del tipo de membrana celular.

La fluidez de una membrana es un aspecto que debe ser regulado con gran precisión por variaciones en la temperatura. Por ejemplo, algunas membranas llevan a cabo procesos de transporte y estos se ven detenidos si se aumenta la viscosidad. Para la célula, la fluidez de la bicapa se ve afectada por su composición y temperatura, donde, dependiendo de la temperatura, la bicapa cambiará de un estado líquido a un estado rígido bidimensional similar a un gel en un proceso que se conoce como transición de fase [5].

La Figura 2 muestra la complejidad que representa la membrana celular y cómo está constituida por fosfolípidos, proteínas, anclajes para filamentos del citoesqueleto, etc. Estos ejemplos ilustran el modo en el cual las células controlan la estructura de la membrana, observándose que no es una mera respuesta mecánica simple de estirar y reducir, siendo la célula quien sintetiza los lípidos y proteínas apropiados para realizar su trabajo de una manera compleja [6].

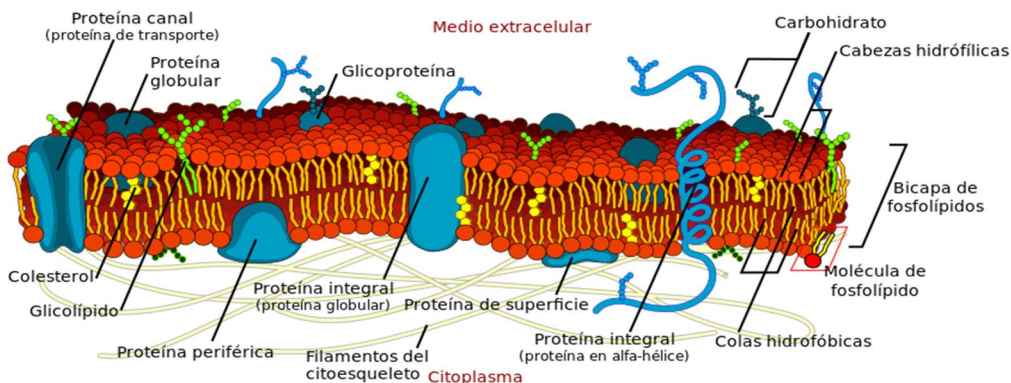


Figura 2. Membrana celular. Esquema representativo de una bicapa semipermeable de lípidos común para todo ser vivo, la cual contiene una amplia variedad de moléculas biológicas.

MODELOS DE MEMBRANA

Uno de los modelos más aceptados es el de membrana de mosaico fluido, el cual representa a la membrana celular como una enorme organización de proteínas y lípidos de las membranas biológicas donde el modelo es consistente acorde a las restricciones impuestas por la termodinámica. Este modelo describe la organización de las proteínas integrales en un arreglo heterogéneo de moléculas globulares, agrupadas en una estructura anfipática. Estas moléculas globulares están parcialmente embebidas en la matriz de fosfolípidos, donde el cuerpo de la membrana es una organización discontinua de una bicapa fluida, aun cuando alguna pequeña fracción de los fosfolípidos de la membrana interactúa de manera individual con proteínas específicas de la membrana [7].

Aun cuando se conocen muchos aspectos relativos a las funciones que se desarrollan en la membrana, este conocimiento no comenzó en el ramo de la biología como habría de esperarse, sino en el campo de la química con el estudio de lípidos y cómo estos interactuaban con el agua. Gran parte del entendimiento sobre la estructura y las propiedades de las bicapas lipídicas proviene de estudios en sistemas de modelos de membrana. Aunque estos sistemas no se consideran propiamente “modelo”, dada la complejidad que involucra las propiedades de la membrana, es posible modelar efectivamente algunas de las propiedades de estas. Es debido a la alta complejidad de la membrana celular que sin la presencia de modelos que funcionan como apoyo en la comprensión de los mecanismos que lleva a cabo la célula sería aún más difícil la comprensión de sistemas tan complicados que llevan a cabo gran cantidad de funciones simultáneamente.

Otro modelo es el de balsas lipídicas, el cual exhibe la complejidad de la membrana celular, la cual para coordinar estas funciones es capaz de realizar reacomodos en su estructura constitucional dependiendo de las necesidades de la célula. Esta capacidad está basada en la inmiscibilidad líquido-líquido que subyace del concepto de subcompartimentos de la balsa lipídica. Las balsas lipídicas se encuentran fluctuando en arreglos a nano escala de esfingolípidos, colesterol y proteínas que

pueden ser estabilizadas para coalescer formando plataformas en la membrana que sirven como señales y medios de transporte al interior de la célula [8].

En el ámbito científico, la realización de modelos tiene varias aplicaciones y metodologías, todos con la finalidad de entender el mecanismo por el cual funciona la membrana celular. En este sentido, podemos mencionar el trabajo de varios autores tales como Tsutomu Hamada et al., [9] quienes trabajan con liposomas a escala *in vivo* como modelos de membrana, con la finalidad de entender cómo la conformación de la membrana influencia las funciones biológicas, así como entender los retos que se presentan en un modelo de membrana del tamaño de una membrana celular a escala real. Por otra parte, Von Heijne y colaboradores [10] trabajan modelos de membrana con el fin de entender el arreglo que llevan a cabo las membranas para el transporte de proteínas.

Como podemos ver de la selección de autores que se mencionaron, los modelos de membrana son utilizados para entender las funciones que lleva a cabo la célula. Garth Nicolson [11] comenta aun cuando se lleva más de 40 años entendiendo el proceso que lleva a cabo la célula, es un tema que se seguirá estudiando por medio de modelos.

NANOPARTICULAS

Las nanopartículas son más grandes que átomos individuales y moléculas pero son más pequeñas que el material por el cual es originalmente conformado. Es debido a su tamaño que no obedecen a las leyes de la física clásica y tienen propiedades que difieren marcadamente de aquellas que podrían esperarse del material que conforman en bulto. Existen dos fenómenos ampliamente marcados responsables de estas diferencias.

El primero es la alta capacidad de dispersión de los sistemas nanocristalinos en un material sólido. Esto significa que a medida que el tamaño del material se reduce, el número de átomos en la superficie se incrementa comparado contra el número de átomos que conforman el material originalmente. Tenemos como ejemplo una

nanopartícula de sulfuro de cadmio de 4 nm de diámetro, el cual tiene alrededor de 1500 átomos, una tercera parte de los cuales se localizan en la superficie, de esta manera propiedades que usualmente se determinan por la estructura molecular del bulto en el material original, ahora se ven ampliamente dominadas por el efecto estructural que se lleva a cabo en la superficie de la nanopartícula, incrementándose el número de átomos que se encuentran en la superficie a medida que el tamaño disminuye.

El segundo fenómeno ocurre notablemente solo en metales y semiconductores, se llama cuantización de tamaño y surge debido a que el tamaño de la nanopartícula es comparable a la longitud de onda de de Broglie y su concentración de portadores de carga (ejemplo: electrones y vacancias). Debido al confinamiento espacial de los portadores de carga y banda de conducción se divide en niveles electrónicos discretos y cuantizados. Estos niveles electrónicos son similares a aquellos en átomos y moléculas, resultando en que entre los niveles electrónicos así como la banda prohibida se reducen a medida que el tamaño de la partícula disminuye propiciando el salto de electrones de un nivel a otro con mayor facilidad.

ANTECEDENTES

La síntesis y metodología de las nanopartículas es un tema ampliamente estudiado, variando de un proceso de síntesis a otro, desde emulsiones por evaporación hasta síntesis por reducción química, en la elaboración de nanopartículas poliméricas. Como describiría Hans [12] y colaboradores, las aplicaciones son muy amplias desde la realización de nanopartículas biodegradables para ser compatibles con el cuerpo humano, hasta nanopartículas metálicas para realizar imagen mediante la aplicación de campos magnéticos como menciona Montagne [13] et al., quien prepara nanopartículas de magnetita, las cuales presentan propiedades súper paramagnéticas. Inclusive podemos mencionar la síntesis de sistemas de nanopartículas híbrido, esto es, un sistema que contiene material orgánico e inorgánico tal como Ronald Wassel [14], el cual realiza nanopartículas con núcleo

de óxido de hierro y un recubrimiento de PLGA, esto con el fin de realizar avances en el tratamiento de enfermedades y reducir costos, así como aumentar la efectividad y disminuir el riesgo en el tratamiento de enfermedades.

Sin embargo, para que las nanopartículas puedan emplearse en el campo de la medicina, es necesario analizar el efecto que causan las nanopartículas en el cuerpo humano y la medida cualitativa de ello es la realización de modelos que analicen la interacción y efecto de las nanopartículas a escala celular. Recientemente se han realizado estudios para con la finalidad de comprender dichas interacciones, tal como Thiers Uehara [15] quien analiza las interacciones entre las nanopartículas magnéticas y diferentes modelos de membrana con el objetivo de comprender el comportamiento de la membrana celular ante un agente externo como lo es una nanopartícula.

Como puede notarse, el estudio en el campo de la nanomedicina está dirigido hacia un entendimiento del efecto nano en los sistemas macro, con el fin de mejorar la administración de fármacos, mejorar la detección de enfermedades y aumentar el efecto del tratamiento en enfermedades.

JUSTIFICACION

El uso de nanopartículas poliméricas como medio de transporte de fármacos para aplicaciones terapéuticas es un tema ampliamente estudiado. La versatilidad que presenta un sistema de nanopartículas permite ofrecer una alternativa al diagnóstico y tratamiento de enfermedades degenerativas.

Debido a la complejidad que representan los sistemas biológicos, es de vital importancia conocer los mecanismos de interacción nanopartícula-célula. Mediante el uso de modelos de membrana se puede explicar el mecanismo de adsorción de nanopartículas en la célula y con esto destacar aquellas que presentan mayor afinidad, dependiendo de las características de las propias nanopartículas como: tamaño, forma y carga superficial.

HIPOTESIS

Sintetizar una nanoplataforma híbrida con carga de superficie modulable permitirá evaluar el efecto de la carga sobre un modelo de membrana celular y con esto elucidar los posibles mecanismos de interacción entre nanopartícula-célula.

OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar el efecto de la carga de nanopartículas de magnetita/PLGA/quitosano en un modelo de membrana constituido por fosfolípidos en una balanza de Langmuir.

PARTICULARES

Sintetizar un sistema de nanopartículas híbrido con diferente carga eléctrica.

Caracterizar el sistema en tamaño y forma así como concentración.

Demostrar la hidrofobicidad de las nanopartículas de magnetita debidas al recubrimiento de ácido oleico por medio de la técnica FTIR.

Estudiar el efecto de cambio de carga eléctrica en las nanopartículas debido al cambio de concentración en el recubrimiento de quitosano de las nanopartículas de magnetita/PLGA.

Estudiar la interacción de las nanopartículas cargadas en un modelo de membrana.

DESCRIPCION DE TECNICAS

DISPERSION DINAMICA DE LUZ

La dispersión dinámica de luz, también llamada espectroscopia de correlación de fotones, es una técnica que estudia la fluctuación de la luz dispersada por una muestra. Estas fluctuaciones pueden ser debidas a simple difusión traslacional de partículas en la muestra. En este caso, la técnica es utilizada para determinar el tamaño de la partícula. Pueden medirse escalas de tiempo que van desde 1 microsegundo hasta 10^{-1} segundos y tamaños desde 10^{-9} hasta 10^{-6} metros. La intensidad de las fluctuaciones puede también ser debido a las fluctuaciones de la forma de las partículas, movimiento rotacional, fluctuaciones de la concentración o inclusive movimiento interno de la muestra [16].

La Figura 3 muestra cómo una partícula pequeña al ser iluminada por una fuente de luz tal como un láser, la partícula dispersará la luz en todas direcciones, si se mantuviera una pantalla sobre la partícula esta se iluminaría mostrando un patrón de dispersión de la partícula mostrando áreas con luz y oscuridad, este patrón de dispersión es registrado para ser analizado por un correlacionador digital. En la práctica, las partículas suspendidas en un líquido nunca son estacionarias, estas se mueven debido al movimiento browniano el cual produce el movimiento de una manera aleatoria. Un importante fenómeno es que a medida que el tamaño de la partícula es pequeño, ésta se moverá con mayor rapidez en relación a una partícula de mayor tamaño debido al movimiento browniano, según se deduce de la ecuación:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

En el que q es la magnitud del vector de onda dispersada, n es el índice de refracción del medio, λ es la longitud de onda del láser, y θ el ángulo de dispersión, siendo así que si tomamos las partículas como esféricas que no interactúan entre ellas podemos obtener el radio promedio de la ecuación de Stokes-Einstein:

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}$$

Para el que k_B corresponde a la constante de Boltzmann, T es la temperatura y η la viscosidad del solvente. A medida que las partículas se encuentran en movimiento, el patrón de la dispersión aparentemente también se encontrará en movimiento. Conforme las partículas se muevan, la intensidad en cualquier punto aparentemente fluctuará, siendo posible medir el rango de fluctuación y utilizarlo para calcular el tamaño de partícula [17].

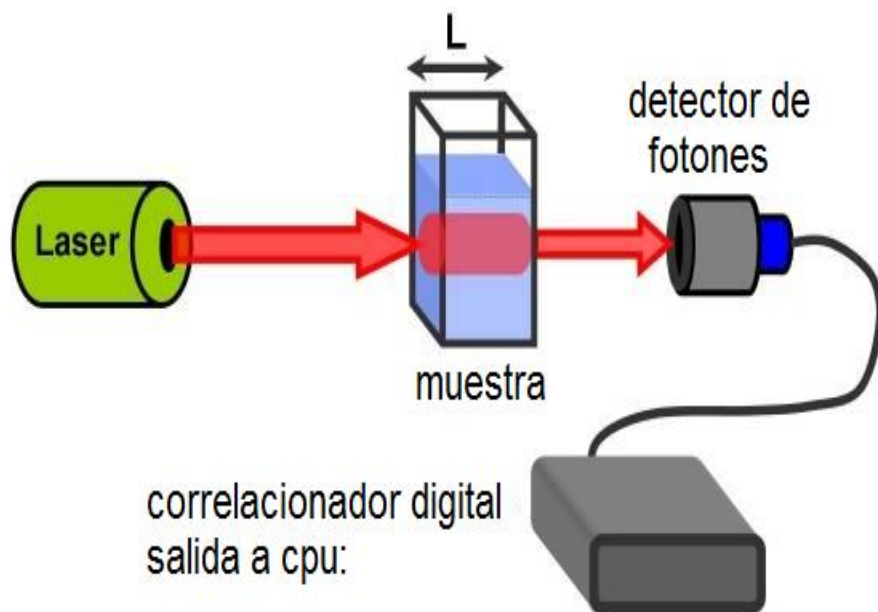


Figura 3. Representación esquemática de un experimento de dispersión de luz dinámica.

POTENCIAL ZETA

Todas las partículas en suspensión exhiben un potencial zeta, el cual es importante conocer dado que con los resultados obtenidos es posible predecir la estabilidad de las nanopartículas o las interacciones de las mismas en el medio, o como un control de calidad al determinar si el sistema precipitará o colapsará formando agregados. Esta técnica se basa en medir el movimiento electroforético. Consiste en aplicar un campo eléctrico sobre la muestra, el cual induce a las partículas cargadas a moverse dependiendo de la magnitud del campo eléctrico aplicado, haciendo posible calcular el potencial zeta utilizando la ecuación de Henry [17]:

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(ka)}{3\eta}$$

Donde U_E , ε , η , $f(ka)$ y ζ se refieren a movilidad electroforética, constante dieléctrica del medio, viscosidad del medio, función de Henry y potencial z respectivamente, la función de Henry generalmente utiliza la aproximación de Smoluchowski con un valor de 1.0 para medir el potencial zeta en soluciones acuosas de moderada concentración de electrolitos y la aproximación de Hückel con un valor de 1.5 para el caso de solventes no polares [18].

La carga neta en la superficie de una partícula suspendida en un sistema coloidal afecta la distribución de iones en la región interfacial circundante, resultando en un incremento en la concentración de contraiones (iones de carga opuesta a la de la partícula) cercanas a la superficie. La Figura 4 muestra la capa circundante de la partícula, la cual se puede dividir en dos partes, una región interna llamada la capa Stern donde los iones están unidos, y una capa exterior difusa en la cual no están ligados tan firmemente. Cuando la partícula se mueve (por gravedad por ejemplo) los iones dentro de la frontera se mueven con ella, esta frontera se llama cizallamiento hidrodinámico o plano de deslizamiento, el potencial eléctrico que se mide en esta frontera es conocido como potencial Zeta.

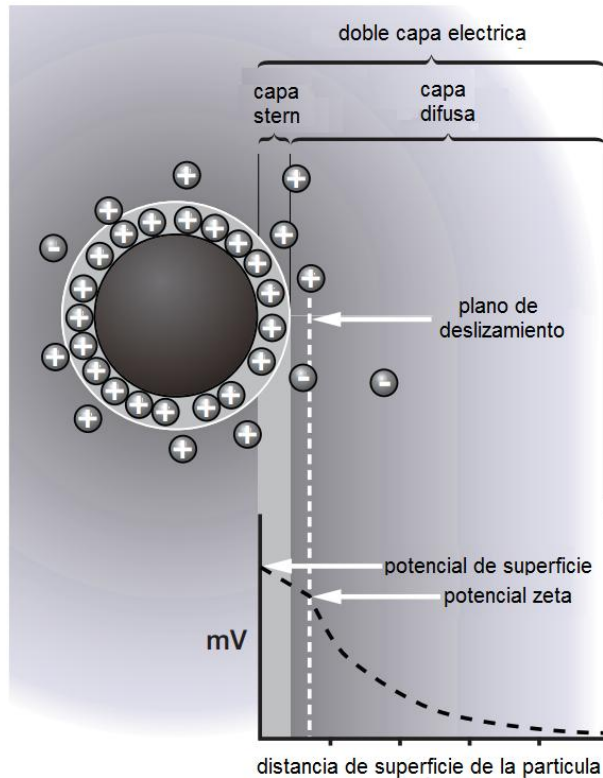


Figura 4. Carga superficial de una partícula.

ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER

La espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) se refiere a la espectrometría de absorción en la región infrarroja del espectro electromagnético. Esta técnica proporciona un espectro de las bandas de los grupos funcionales de las sustancias orgánicas e inorgánicas.

FTIR basa su funcionamiento en el hecho de que los enlaces químicos de las sustancias tienen frecuencias de vibración específicas, que corresponden a los niveles de energía de cada enlace químico presente en una molécula determinada. Estas frecuencias dependen de la forma de la superficie de energía potencial de la molécula, la geometría molecular, las masas atómicas, y posiblemente, el acoplamiento vibracional.

La Figura 5 representa el proceso que se lleva a cabo para realizar la medición. Comienza desde una fuente emisora de infrarrojo que pasa por una abertura que controla la cantidad de luz que recibirá la muestra, posteriormente, el haz entra en el interferómetro, el cual codifica la señal y pasa hacia donde está depositada la muestra. El haz es reflejado por la muestra o transmitido a través de la misma, dependiendo del tipo de análisis a ser realizado. Ciertas y específicas frecuencias de energía son absorbidas por la misma, el haz pasa el detector para la medición, el cual está diseñado especialmente para medir la señal del interferograma. Finalmente la señal medida es digitalizada y enviada a la computadora donde los datos colectados son analizados mediante transformadas de Fourier [19].

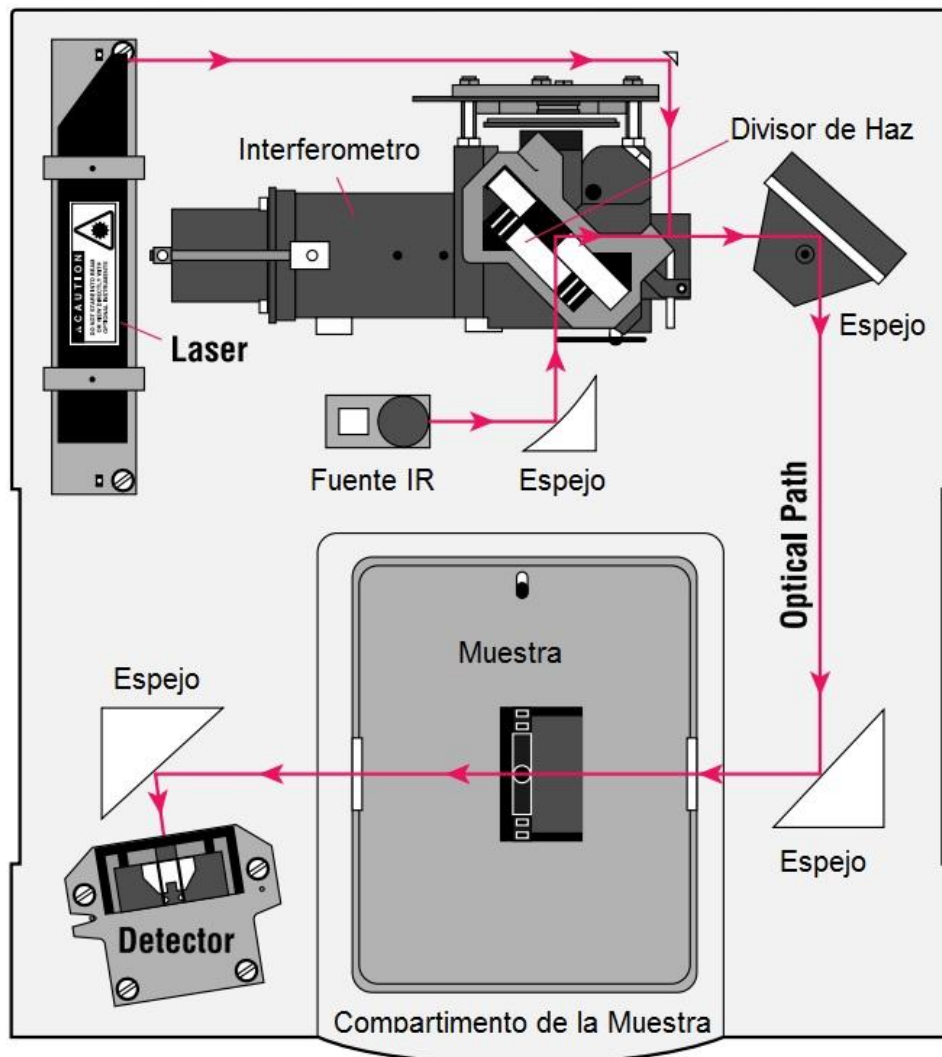


Figura 5. Operación de un infrarrojo con transformada de Fourier.

MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA

El Microscopio de Fuerza Atómica (AFM) es un equipo importante para la elucidación de la microestructura de materiales. La Figura 6 muestra los elementos fundamentales que tiene un AFM: la punta, el escáner, el detector, el sistema de control electrónico y el sistema de aislamiento de vibración. El AFM monitorea la superficie de la muestra con una punta de radio de curvatura en el rango de 20 a 60 nanómetros que se localiza al final del cantiléver, las fuerzas entre la punta y la muestra provocan la deflexión del cantiléver. Simultáneamente, el láser al ser calibrado para incidir sobre la punta que está sujeta en el cantiléver mide esta deflexión mediante el detector, a medida que la punta se desplaza sobre la superficie de la muestra generando una micrografía de la superficie [20].

Existen tres métodos básicos de operación para el AFM: contacto, no contacto y contacto intermitente. En el modo contacto, la punta está a una distancia a la cual las fuerzas repulsivas dominan la interacción de la punta con la muestra, y se mide las deflexiones del cantiléver originadas por las fuerzas de repulsión de corto alcance entre la punta y la muestra. Uno de los inconvenientes de este método es que existen grandes fuerzas laterales en la muestra a medida que se acerca la punta sobre el espécimen. En el método de no contacto, el cantiléver debe estar oscilando sobre la superficie de la muestra a una distancia en donde la deflexión del cantiléver se debe a las fuerzas de atracción de largo alcance entre la punta y la muestra. Estas fuerzas se encuentran en el régimen de la curva de fuerzas intermoleculares de Van der Waals. Para este método, la fuerza es medida comparando la frecuencia o la amplitud de oscilación del cantiléver relativo a la señal de operación [21]. En el método de contacto intermitente, la punta no está en contacto continuo con la superficie de la muestra sino en contacto intermitente o discreto. De esta manera se reduce la interacción entre la punta y la muestra obteniendo la topografía de la muestra.

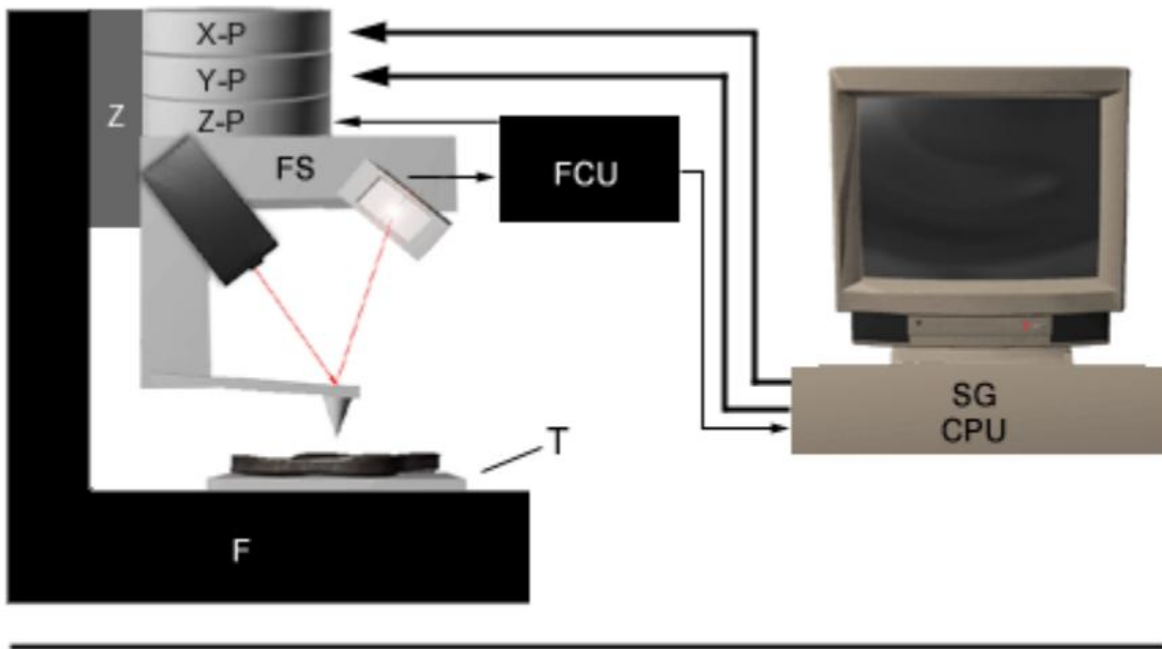


Figura 6. Muestra de los componentes de un microscopio de fuerza atómica.

VISCOSIMETRO DE UBBELOHDE

El viscosímetro de Ubbelohde es un dispositivo ampliamente utilizado para determinar viscosidades de fluidos newtonianos y no newtonianos. La fuerza impulsora es normalmente la presión hidrostática del líquido del que se va a medir la viscosidad, aunque en algunos casos (generalmente fluidos muy viscosos o cuando se pretenden utilizar fluidos no newtonianos) se suele aplicar una presión externa; en el caso de no aplicar una presión externa se consiguen esfuerzos de cizalla bastante bajos, del orden de 1 a 15 Pascales.

El diseño del viscosímetro de Ubbelohde es una modificación que parte del viscosímetro de Ostwald, en donde la modificación obedece a la necesidad de realizar mediciones a distintas concentraciones. La Figura 7 muestra cómo el instrumento consta de 3 tubos de vidrio (1 a 3), un recipiente de reserva (8), un capilar (6) con el recipiente de medida (5) y la bola de avance del líquido (4), entre estos dos últimos se encuentran las marcas (A y B) que sitúan la medida; el capilar

termina en la parte inferior (7) en un casquete esférico, por el que sale la muestra del capilar en forma de película delgada.

Las determinaciones con este viscosímetro se basan en comparar el tiempo que tarda en fluir un volumen de un líquido dado a través del capilar (entre dos señales del viscosímetro), contra el tiempo de flujo de un líquido de viscosidad conocida, como del agua contra el aceite.

Es posible determinar la concentración de nanopartículas utilizando un viscosímetro de Ubbelohde por medio de la ecuación de Stokes-Einstein descrita a continuación:

$$\eta_r = 1 + 2.5\phi$$

Correspondiendo η_r y ϕ a la viscosidad relativa y la fracción volumen de las nanopartículas en la suspensión respectivamente, donde la condición para determinar la concentración es que las nanopartículas se comportan como esferas duras o rígidas.

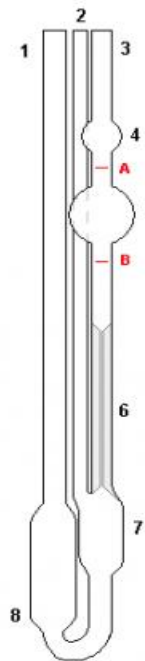


Figura 7. Imagen de un Viscosímetro de Ubbelohde

BALANZA DE LANGMUIR

Uno de los más demandantes retos en la ciencia de materiales es el desarrollo de nuevos materiales que se adapten a nuestras necesidades específicas. Uno de los principales objetivos es el de organizar moléculas mediante auto-ensamblaje para el desarrollo de sensores y dispositivos electrónicos. Esta ambiciosa tarea se logrará solo si se disponen de las técnicas experimentales adecuadas que permitan el auto-ensamblaje de moléculas que formen estructuras bidimensionales o tridimensionales. La balanza de Langmuir es una técnica prometedora dada su capacidad de producir películas ultra delgadas y altamente ordenadas. Utilizando la balanza de Langmuir es posible producir capas con un espesor de hasta una molécula.

La balanza de Langmuir consiste en un contenedor que mantiene la subfase de un líquido en donde la monocapa es dispersada. Consta de dos móviles barreras que delimitan el área superficial disponible. También consta de un sensor para medir la presión superficial y un detector de posición de las barreras adjunto a las mismas para medir el área superficial de la película. El contenedor debe estar fabricado de material inerte como teflón, el cual no contamina la subfase acuosa. El arreglo de la balanza y las barreras debe estar hecho de tal manera que permita la compresión de la monocapa. El material que se deposita en la superficie de la subfase por lo general es de naturaleza anfifílica y debe disolverse en un solvente apropiado volátil y orgánico (por ejemplo cloroformo) dispensado en la superficie de la subfase acuosa. La evaporación del solvente se realiza en corto tiempo y esto da pie a que las moléculas se dispersen sobre la superficie del agua, es entonces que se procede a cerrar las barreras para comprimir hasta que las moléculas del material se alinean en una estructura regular [22]. La Figura 8 muestra los componentes principales de una balanza de Langmuir tales como: depósito de agua, barreras de compresión y sensor de tensión superficial.

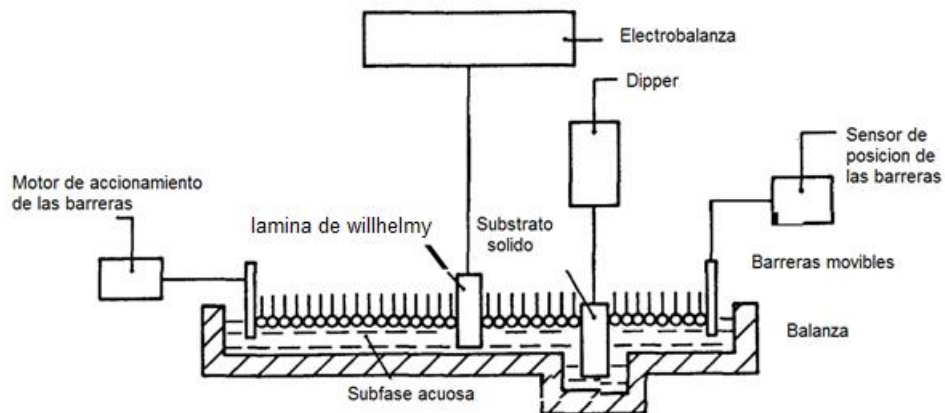


Figura 8. Componentes de una Balanza de Langmuir

Conforme se delimita el área superficial en la que se confinan las moléculas del material anfífilo mediante las barreras móviles, la presión superficial también llamada “presión lateral” se incrementa. La presión superficial (π) se puede definir como la diferencia entre la tensión superficial de la superficie pura γ_0 y la superficie cubierta por anfífilos γ , representándose de la siguiente manera:

$$\pi \equiv \gamma_0 - \gamma$$

El sensor de presión controla la medición de presión de la superficie y el área por molécula es obtenida mediante el área total dada por el sensor de posición de la barrera.

METODO DE WILLHELMY

Una método esencial en la medición y que forma parte de la balanza de Langmuir es el método de Willhelmy, es ampliamente utilizado y consiste en una fina lámina de vidrio, platino o filtro de papel depositada verticalmente en un líquido en una interfaz aire-agua, inclusive no es tan importante el material de la lámina siempre y cuando esta no se moje por el líquido.

Si tenemos una lámina con dimensiones $L \times A \times E$ (Largo, Ancho y Espesor) y una densidad ρ que está sumergida en agua a una profundidad H , entonces la fuerza neta hacia abajo es F , descrita por la siguiente ecuación:

$$F = (\rho_p LAE)g - (\rho_L LAE)g + 2(A + E)(Ts) \cos \theta$$

$$F = PESO - EMPUJE + TENSION SUPERFICIAL$$

Donde ρ_p es la densidad de la lamina, ρ_L es la densidad del liquido, Ts la tensión superficial del líquido, θ el ángulo de contacto de la lámina y g la aceleración debido a la gravedad. Antes de realizar cualquier medición, la presión se reconfigura a cero y de esta manera eliminamos el peso de la ecuación. El empuje también se elimina dado que la lámina siempre se mantiene a un nivel constante independientemente de la tensión superficial, y dado que debemos asegurarnos que la lámina tiene un ángulo de contacto de 0° , la ecuación anterior se reduce a:

$$F = 2(A + E)(Ts)$$

Por lo tanto, haciendo un despeje simple para la tensión superficial, la fórmula para el método de Willhelmy es:

$$Ts = \frac{F}{2(A + E)}$$

El método de Willhelmy es muy útil en la caracterización de polvos, aceites, agentes anfifílicos y cómo estos afectan la tensión superficial en el grado de mojabilidad que estos presentan.

ISOTERMA PRESIÓN-ÁREA

Las isotermas presión-área obtenidas con la balanza de Langmuir son un parámetro importante para estudiar las propiedades de una monocapa compuesta de material anfifílico. Esta curva está dada por la medición de la presión superficial como una función del área que ocupa cada molécula en la superficie del agua. Esto se lleva a cabo a temperatura constante y controlada también conocido como isoterma presión-área o simplemente "isoterma". Usualmente una isoterma es registrada al

momento de comprimir la monocapa (reduciendo el área mediante las barreras) a una velocidad constante mientras se monitorea la presión superficial.

La Figura 9 muestra una isoterma modelo que consta de un número de regiones distintas que se observan durante el proceso de compresión de la monocapa, la cual, es importante resaltar, debe mantenerse a una temperatura constante. Estas regiones son llamadas fases. Como puede observarse, la monocapa pasa a través de diversas fases a medida que la concentración de moléculas en la superficie se incrementa. Estas fases se pueden identificar debido a las discontinuidades de la propia isoterma una vez graficada. El comportamiento de la fase en la monocapa depende principalmente por las propiedades fisicoquímicas del material anfifílico depositado en la superficie, así como entre otros factores la temperatura y composición de la subfase. Harkins utilizó una terminología relativamente simple en 1952 para describir y clasificar las diferentes fases de una monocapa de ácidos grasos [23]. Si las moléculas anfifílicas se depositan en un área superficial extensa y no se comprime la monocapa, las moléculas se comportan como un gas (G). Una vez que se inicia la compresión de la monocapa se puede observar una transición de fase hacia un estado de líquido expandido (L_1). A medida que la monocapa continúe comprimiéndose, ésta tendrá nuevamente una transición hacia un estado de líquido condensado (L_2). E inclusive a presiones mucho más altas la monocapa finalmente alcanzará el estado sólido (S). Pasado este punto y si continúa comprimiéndose la monocapa, esta colapsará formando estructuras tridimensionales, este colapso puede observarse experimentalmente como un rápido decremento en la presión superficial de la isoterma.

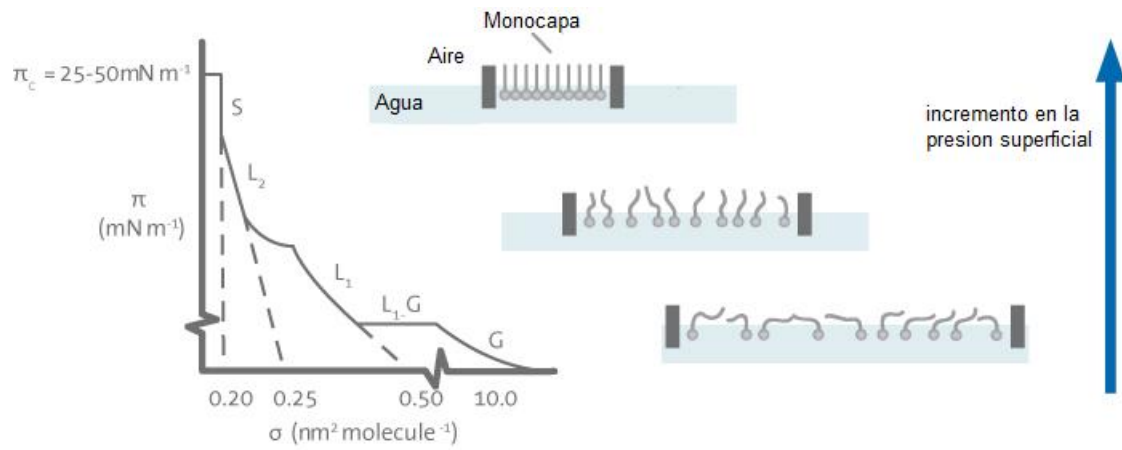


Figura 9. Transiciones de fase de una isoterma general y representación física de una monocapa a medida que se comprime.

MATERIALES Y METODOS

En la síntesis de la nanoplateforma se utilizó ácido poli-láctico co-glicólico (PLGA) 50:50 con un peso molecular de 30,000-60,000 Dalton, cloruro de hierro(II) (>98%), cloruro de hierro(III) (97%), ácido oleico ($\geq 99\%$), ácido acético (99%), hidróxido de amonio (28-30%), acetona (99%) y cloroformo ($\geq 99\%$), quitosano desacetilado con un peso molecular promedio de 150,000 Dalton.

Para la obtención del modelo de membrana se llevó a cabo una mezcla de fosfolípidos simulando la composición de una membrana endotelial con las proporciones referidas por Siakotos y colaboradores [1]. Los componentes utilizados se describen a continuación:

1,2-Dipalmitoil-sn-3-fosfocolina (semisintética, $\geq 99\%$, DPPC), L- α - fosfatidilserina (de cerebro porcino, >99%), esfingomielina (de cerebro porcino, >99%).

La proporción utilizada para cada uno de ellos se muestra en la Tabla 1:

Fosfolípido	Porcentaje %
DPPC	55.56
Fosfatidil Serina	17.11
Esfingo Mielina	27.33

Tabla 1. Proporción de fosfolípidos utilizada en el modelo de membrana.

SINTESIS DE NANOPARTICULAS DE MAGNETITA

La síntesis del sistema monodisperso de nanopartículas de magnetita hidrofobizadas con ácido oleico se preparó utilizando el método de co-precipitación en presencia de hidróxido de amonio (NH₄OH). Este método consiste en la precipitación de un compuesto simultáneamente con uno o más compuestos para formar cristales [24]. El método de co-precipitación se llevó a cabo utilizando sales de hierro y adicionando un exceso de hidróxido de amonio, bajo una atmósfera de nitrógeno.

Una mezcla que consiste de cloruro férrico (1.6 mM FeCl₃) y cloruro ferroso (0.8 mM FeCl₂) se depositó en 100 mL de agua previamente degasificada (18.3 MΩ·cm). La mezcla se mantuvo en agitación mecánica moderada y constante a una temperatura controlada de 80 °C, durante 10 minutos. Posteriormente, se agregaron 10 mL de hidróxido de amonio (28%), dejándose reaccionar durante 30 minutos. Posteriormente se agregó ácido oleico a la reacción en una proporción molar Fe³⁺: ácido oleico de 1:1.25 respectivamente. Esto con el objetivo de asegurar que el ácido oleico recubra la superficie de las nanopartículas y de esta manera obtener nanopartículas hidrofóbicas. Finalmente, las nanopartículas sintetizadas fueron separadas de la solución utilizando un imán y lavadas en etanol puro. Después se lavaron dos veces más con mezclas de etanol y agua en una proporción de 50%, obteniendo una pasta negra brillante como producto final.

SINTESIS DE NANOPARTICULAS DE MAGNETITA CON RECUBRIMIENTO PLGA

El proceso de preparación de nanopartículas de magnetita con recubrimiento de PLGA se realizó por el método de evaporación emulsión-solvente, la cual consiste en disolver el polímero de interés en un solvente orgánico. La fase orgánica se añade a una fase acuosa bajo agitación constante para formar una emulsión agua-aceite [12]. Para la obtención de nanopartículas de magnetita con recubrimiento de PLGA se preparó una solución (10 mg/mL, 0.22 mM) utilizando acetona como solvente orgánico. Posteriormente, se mezclaron 6 mg de PLGA con diferentes cantidades de nanopartículas de magnetita hidrofobizada para obtener diferentes proporciones de PLGA:magnetita (1:1, 1:3 y 1:5). Las diferentes mezclas fueron dispersadas en 10 mL de una solución acuosa bajo constante y moderada agitación por un periodo de 5 minutos. La evaporación de acetona se llevó a cabo en una campana de flujo laminar en un cuarto a temperatura ambiente (25 ± 1 °C). Más tarde, las nanopartículas en suspensión se recolectaron por centrifugación a 12 000 RPM por 30 min a 4 °C y finalmente liofilizadas.

SINTESIS DE NANOPARTICULAS CON UN NUCLEO DE MAGNETITA Y RECUBRIMIENTO PLGA CON QUITOSANO

Las nanopartículas de magnetita y PLGA recubiertas con quitosano fueron preparadas de la siguiente manera: primero, se preparó una solución disolviendo 0.04 g de quitosano en 10 mL de ácido acético. Se prepararon diferentes concentraciones de quitosano de la solución original con un volumen final de 10 mL, utilizando agua desionizada como diluyente. Subsecuentemente, las nanopartículas de magnetita y PLGA previamente obtenidas se adicionaron a las soluciones de quitosano de diferentes concentraciones gota por gota, y más tarde se homogenizaron con agitación a temperatura ambiente por un periodo de 60 minutos. Las nanopartículas de magnetita y PLGA cubiertas con quitosano fueron almacenadas durante 24 horas a temperatura ambiente para futuras caracterizaciones.

DISTRIBUCION DE TAMAÑO POR DISPERSIÓN DE LUZ

La distribución de tamaño de las nanopartículas de PLGA, magnetita-PLGA, así como de magnetita-PLGA con recubrimiento de quitosano se determinó utilizando la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) en un equipo Zetasizer-Nano ZS (Malvern Instruments, UK), el cual cuenta con un láser rojo con longitud de onda de $\lambda_0 = 633$ nm (Helio-Neón, 4.0 Mw). Este instrumento permite una confiable y precisa medición de los diámetros hidrodinámicos de partícula en el rango de 0.6 nm hasta 6 μ m. Las muestras se diluyeron en los casos pertinentes y se depositaron en una celda desechable de poliestireno DTS0012 de Malvern Instruments. Las mediciones iniciaron una vez que se alcanzaron los 25 °C de equilibrio térmico, en el cual para cada muestra se realizaron análisis por triplicado, esto con la finalidad de realizar un filtrado de datos en el cual las peores mediciones son descartadas para realizar un cálculo de medición óptimo.

DETERMINACION DE CONCENTRACION POR VISCOSIMETRIA

La concentración de nanopartículas de magnetita y PLGA se determinó con el método de viscosimetría utilizando un viscosímetro de tubo capilar Ubbelohde y la ecuación de Einstein para determinar la concentración de nanopartículas como ha sido descrito por otros autores [25]:

$$\eta_r = 1 + 2.5\phi$$

donde n_r es la viscosidad relativa y ϕ corresponde a

$$\phi = \frac{nV_i}{V}$$

donde n es el número de nanopartículas en disolución, V_i es el volumen la nanopartícula, considerando que ésta se comporta como una esfera dura. El volumen de una esfera se determina mediante la expresión $V_i = \frac{4\pi r^3}{3}$ siendo r el radio hidrodinámico de la nanopartícula determinado por DLS, y finalmente V el volumen total de nuestra solución de nanopartículas, sustituyendo los tiempos obtenidos de nuestro solvente puro contra nuestras nanopartículas en solvente y despejando para n , es posible determinar la concentración.

POTENCIAL ZETA DE NANOPARTICULAS

El potencial Zeta de las nanopartículas de PLGA, magnetita y PLGA, así como de magnetita y PLGA con recubrimiento de quitosano se determinó utilizando el equipo Zetasizer-Nano ZS (Malvern Instruments, UK), el cual determina la movilidad electroforética aplicando la ecuación de Henry. Las muestras fueron depositadas en una celda desechable DTS1070 de Malvern Instruments, el análisis de muestras se llevó a cabo por triplicado a una temperatura de 25 °C.

MORFOLOGIA POR MICROSCOPIA DE FUERZA ATOMICA

La morfología de las nanopartículas se observó a través de un equipo de Microscopia de Fuerza Atómica (AFM) modelo JSPM 4210 (JEOL, Japón). Se depositó una gota con la solución de nanopartículas en una mica y se dejó evaporar los restos de agua durante algunos minutos. Las imágenes fueron obtenidas mediante el modo de no contacto con un cantiléver (Mikromasch, Oregon, USA). El análisis de imágenes se llevó a cabo con el software WSxM [26].

ESPECTOMETRIA DE INFRARROJO

El espectro infrarrojo (IR) de las nanopartículas de magnetita fue obtenido utilizando la técnica de Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) utilizando un espectrómetro FTIR (Modelo Spectrum two, Perkin-Elmer) equipado con un accesorio Atenuador de Reflectancia Total (ATR). Se realizó la muestra con ácido oleico puro como blanco de comparación y las nanopartículas con magnetita recubiertas con ácido oleico. Las muestras se colocaron en el depósito de muestras y el espectro de transmitancia se dispuso en el rango de los 550 - 4000 cm^{-1} . El espectro IR se recopiló por triplicado con una resolución de 4 cm^{-1} y se analizó utilizando el software de análisis de espectros provisto por Spectrum.

ISOTERMAS DE FOSFOLIPIDOS

Las isotermas consistentes de una mezcla de fosfolípidos con nanopartículas en la subfase acuosa en una interfase aire-agua, fueron realizadas en una balanza Langmuir-Blodgett (modelo 611), en el cual la precisión de medida de la tensión superficial es de 0.1 mN/m. Los fosfolípidos constituyentes de la mezcla para obtener las isotermas fueron 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina, fosfatidil serina y esfingomielina (DPPC, PS, SM) con la proporción descrita anteriormente en la sección de metodología. Los fosfolípidos se disolvieron en cloroformo a una concentración final de 1 mg/mL. Los cambios en la presión superficial debidos a la

superficie cubierta por fosfolípidos comparado contra una superficie de agua limpia fueron registrados utilizando el método de Willhelmy. La presión superficial y el área molecular fueron variadas utilizando una barrera a una velocidad de 20 cm²/min. Se depositaron 50 µL de muestra de fosfolípidos con una jeringa Hamilton en una superficie de agua desionizada (18.3 MΩ·cm) o con una mezcla de diferentes nanopartículas en suspensión acuosa con una concentración de 9.3x10¹⁰ NP/mL. Todos los experimentos se llevaron a cabo en un ambiente libre de polvo por medio de una vitrina que cubría a la balanza del exterior. Una vez que la superficie estuviera limpia y las soluciones suspendidas en cloroformo se disolvieron en la superficie de 480 mL de agua, se dejó reposar durante 15 minutos para permitir la evaporación del cloroformo (1 hora en el caso de que se encontraran nanopartículas en la subfase) y entonces se corrieron las isotermas. En la subfase acuosa que contenía nanopartículas se utilizaron diferentes concentraciones de nanopartículas tomando en cuenta los siguientes valores de potencial Zeta: -27 mV, 0.7 mV, 24 mV, 34 mV, respectivamente. Todos los experimentos se realizaron a 25 °C de temperatura ambiente.

ADSORCION DE LAS NANOPARTICULAS EN UN MODELO DE MEMBRANA

Los experimentos de adsorción de una monocapa consistente de una mezcla de fosfolípidos en una interfase aire-agua fueron realizados depositando 50 µL de fosfolípidos disueltos en cloroformo a una concentración de 1 mg/mL y dejando evaporar durante una hora. Una vez cumplido el tiempo, se realizó compresión de la monocapa por medio de las barreras hasta alcanzar una presión controlada de 30 mN/m. Una vez alcanzada la presión, se dejó estabilizar durante 15 minutos y una vez transcurrido el tiempo se inyectaron 5 mL (aprox. 4.5x10¹³) de nanopartículas en suspensión acuosa por debajo de las barreras y se dejó estabilizar durante cinco minutos para proceder a retirar el control de presión y pasar a control de área. El cambio en la presión fue registrado durante 3 horas aproximadamente en un ambiente a 25 °C de temperatura para todos los experimentos.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

ESPECTROMETRIA DE INFRARROJO

La Figura 10 muestra el espectro de ácido oleico puro y el espectro de nanopartículas de magnetita recubiertas con ácido oleico. Puede observarse que el ácido oleico puro muestra dos bandas en 2854 y 2923 cm^{-1} correspondientes al estiramiento simétrico y asimétrico de los grupos CH_2 . La banda intensa que se muestra en la región de los 1708 cm^{-1} se atribuye al estiramiento asimétrico del grupo $\text{C}=\text{O}$ así como la banda de 1285 cm^{-1} corresponde al estiramiento del enlace $\text{C}-\text{O}$. Las bandas que se exhiben a 1464 y 936 cm^{-1} representan el estiramiento del $\text{O}-\text{H}$ dentro y fuera del plano, respectivamente [27]. En cuanto al segundo espectro correspondiente al de nanopartículas de magnetita cubiertas con ácido oleico, el espectro muestra cambios en la posición de las bandas correspondientes al estiramiento simétrico y asimétrico del grupo CH_2 cambiando hacia 2918 y 2849 cm^{-1} , respectivamente. Este desplazamiento hacia un número de onda más bajo indica que las moléculas de ácido oleico fueron adsorbidas en la superficie sólida de la magnetita y las moléculas de hidrocarburos circundante presentan un empaquetamiento ordenado. Podemos observar también cómo la banda intensa de los 1708 cm^{-1} característica en el ácido oleico puro se muestra ampliamente reducida en el espectro de nanopartículas de magnetita cubiertas con ácido oleico. Es posible observar la aparición de dos nuevas bandas en 1595 y 1541 cm^{-1} las cuales se atribuyen a estiramiento simétrico y asimétrico del grupo COO^- , la presencia de estas bandas indica el acomplejamiento entre los átomos de hierro y los grupos carboxilo de ácido oleico [13] lo cual confirma la fijación del ácido oleico en la superficie de las nanopartículas compuestas de magnetita, y por lo tanto la formación de una capa, la cual recubre la superficie de las nanopartículas.

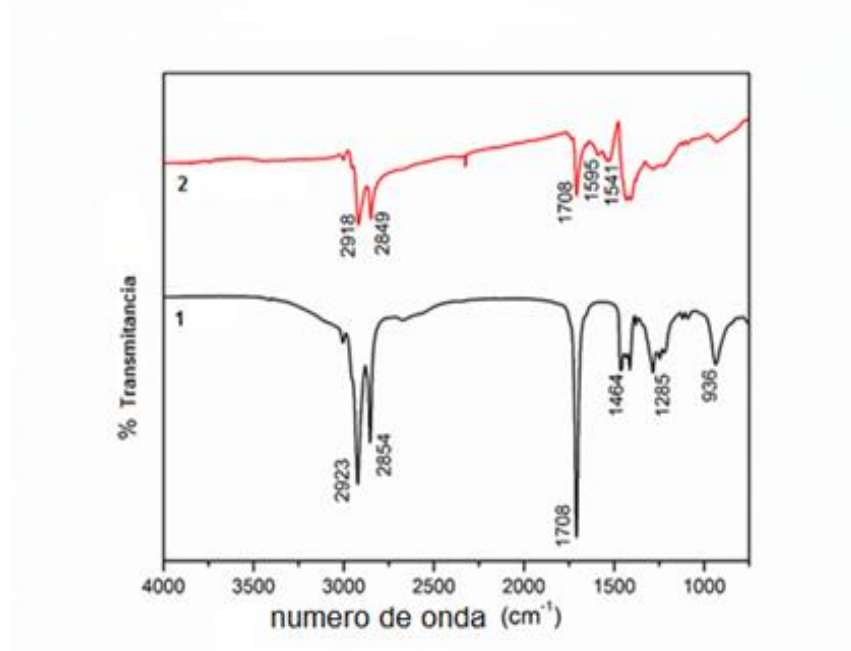


Figura 10. Espectros Infrarrojo de 1) Ácido Oleico puro y 2) Nanopartículas de Magnetita cubiertas con ácido oleico.

MORFOLOGIA DE LAS NANOPARTICULAS

La morfología y tamaño en las diferentes etapas de formación nanopartículas de magnetita, magnetita/PLGA y magnetita/PLGA/quitosano se determinó utilizando microscopia de fuerza atómica (AFM) y dispersión dinámica de luz (DLS).

Las nanopartículas de magnetita con tamaño menor a 10 nm presentan una mayor superficie en comparación a su rango de volumen, de esta forma tienen una mayor energía de superficie [28]. Es por esto que tienen una tendencia a aglomerarse para reducir su energía de superficie, es aquí donde toma importancia repulsión estérica con el fin de evitar la aglomeración de nanopartículas [29]. La Figura 11 muestra la formación de agregados esféricos que presentan las nanopartículas,

Muchos factores relacionados con el proceso de emulsificación en la formación de nanopartículas de magnetita recubierta con PLGA pueden influenciar en el tamaño de las mismas, tal como el tamaño de los viales utilizados, el tiempo y fuerza de

sonificación, así como la posición en la que se deposita el vial al momento de realizar la sonificación [14]. Con el fin de determinar la cantidad óptima de magnetita en la elaboración de nanopartículas de magnetita recubiertas con PLGA se probaron tres diferentes relaciones molares, tales como 1:0, 1:1, 1:3 y 1:5.

Se puede observar que a medida que la relación molar aumenta, las nanopartículas presentan cierta deformación y cierto grado de coalescencia debido al exceso en la adición de las nanopartículas de magnetita. Sin embargo, las nanopartículas mantienen su forma esferoidal con un diámetro aproximado de 85 nanómetros.

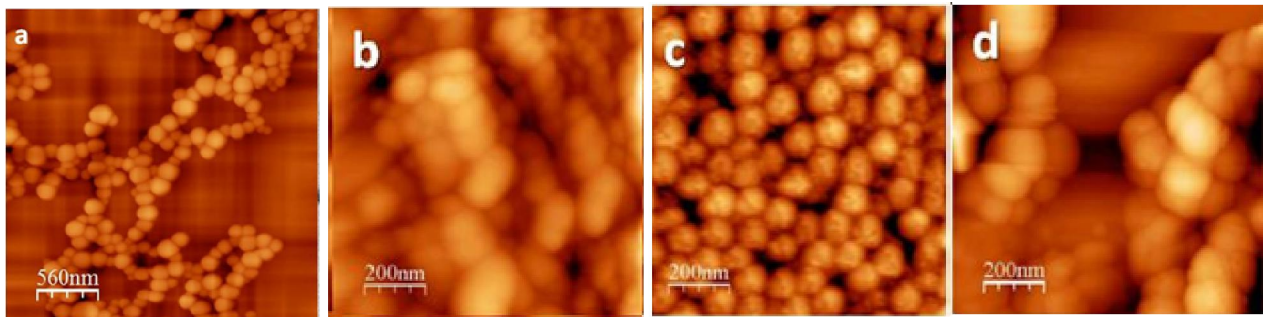


Figura 11. Imágenes AFM de a) matriz polimérica, b) relación molar 1:1, c) relación molar 1:3 y d) relación molar 1:5.

DLS Y POTENCIAL ZETA

El diámetro hidrodinámico, el índice de polidispersidad y el potencial zeta de las nanopartículas de magnetita recubiertas con PLGA en función de las relaciones molares de PLGA:magnetita se muestran en la Tabla 2. El diámetro hidrodinámico promedio se obtuvo utilizando la técnica de DLS en el rango de los 130-140 nanómetros para todas las relaciones molares utilizadas. El índice de polidispersidad (en el rango de 0.07-0.09) y el potencial zeta (-26 mV) no mostraron cambios significativos en las diferentes síntesis de nanopartículas realizadas. Esto sugiere que la cantidad de nanopartículas en las tres diferentes relaciones molares

utilizadas no afectó el tamaño ni la superficie de carga de las nanopartículas de magnetita recubiertas con PLGA.

El quitosano y PLGA han sido extensivamente estudiados, tanto por instituciones públicas como privadas, debido a su biocompatibilidad con el cuerpo humano y a su alta biodegradabilidad. Se puede citar recientemente la utilización de nanopartículas de quitosano recubierto con PLGA, las cuales se utilizaron en la encapsulación de un fármaco anti cáncer como Doxorrubicina [30]. Nuestro trabajo es el primer intento en desarrollar una nanoplataforma híbrida compuesta de un núcleo de magnetita atrapada en una matriz polimérica de PLGA recubierta con quitosano. Las nanopartículas de magnetita con superficie de PLGA y recubiertas de quitosano fueron realizadas exitosamente. Sin embargo, con el fin de estudiar los efectos que podría causar el variar la concentración de quitosano, se obtuvieron los resultados que describimos a continuación. La Figura 12 muestra los resultados de DLS y AFM para las nanopartículas con relación molar 1:3 con diferentes concentraciones de quitosano. Podemos observar que el diámetro hidrodinámico de la partícula incrementa a medida que se añade una mayor concentración de quitosano.

La tabla muestra las diferentes relaciones molares obtenidas, así como su correspondiente tamaño hidrodinámico, índice de polidispersidad y potencial Zeta.

Relación Molar PLGA:Fe₃O₄	Diámetro de NPs Medición DLS (nm)	Potencial Zeta (mV)	Polidispersidad
1:0	133	-26	0.07
1:1	137	-26	0.09
1:3	140	-27	0.08
1:5	135	-25	0.09

Tabla 2. Diferentes relaciones molares con su correspondiente diámetro, potencial Zeta, polidispersidad.

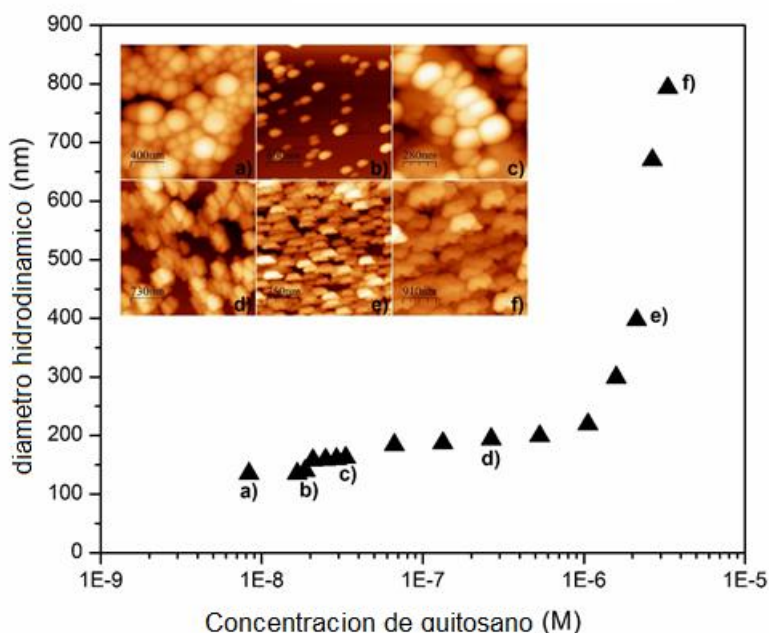


Figura 12. Diámetro hidrodinámico de la partícula (DLS) e imágenes AFM de las nanopartículas de magnetita/PLGA modificadas con diferentes concentraciones de Quitosano: a) nanopartículas de magnetita/PLGA sin Quitosano, b) nanopartículas con 1.66×10^{-8} M de Quitosano, c) 3.33×10^{-8} M, d) 2.66×10^{-7} M, e) 2.13×10^{-6} M y f) 3.33×10^{-6} M.

Las nanopartículas de magnetita/PLGA recubiertas con quitosano fueron preparadas en un rango de concentración de 8.33×10^{-9} a 3.33×10^{-6} M, el diámetro de la partícula aumentó desde 10 hasta 60 nanómetros, en comparación con el diámetro promedio de una nanopartícula de magnetita/PLGA (135 nm). Mientras que para las nanopartículas con concentraciones de quitosano mayores 1.59×10^{-6} M el crecimiento es mucho más significativo, alcanzando un tamaño de 793 nanómetros, ese tamaño se obtuvo preparando una concentración de 3.33×10^{-6} M. El incremento en el tamaño de partícula es debido a la adsorción de quitosano en la superficie de las nanopartículas de magnetita/PLGA, formando un recubrimiento (monocapa) debido a la interacción entre los grupos carboxilo de la superficie de la

matriz polimérica y los grupos amino del quitosano. El quitosano adopta una conformación de polímero tipo linear semi flexible facilitando su adsorción en la superficie de la nanopartícula de magnetita/PLGA con segmentos de quitosano [31]. A bajas concentraciones, las moléculas de quitosano están mayormente unidas a la superficie de las nanopartículas de magnetita/PLGA en forma linear y bucle, resultando en la monocapa antes mencionada. En el caso de las nanopartículas con concentraciones de quitosano mayores de 1.59×10^{-6} M, la adsorción de quitosano continuó aun después de la formación de la primera capa de recubrimiento. De esta manera, es lógico pensar que el diámetro de la partícula incremente significativamente, debido a la formación de multicapas ancladas a la primer monocapa. La formación de multicapas puede deberse a la adsorción de quitosano en forma linear, bucles y la formación de ovillos [31].

Los resultados de AFM mostrados en la Figura 12 corresponden a diferentes concentraciones de quitosano utilizado en el proceso de recubrimiento de las nanopartículas de magnetita/PLGA. En la Figura 13, sección a), se puede observar que las nanopartículas sin quitosano presentan una forma esferoidal bien definida y el tamaño de partícula ronda los 130 nanómetros. En el rango de concentraciones de quitosano entre 8.33×10^{-9} y 1.06×10^{-6} M observamos tamaños de partículas de 130 a 220 nanómetros, manteniendo la tendencia de forma esferoidal, a pesar de que exhibe cierta deformación tales como irregularidades en la superficie (Figura 13, b y d). La imagen en la Figura 13 c), muestra cómo las nanopartículas de magnetita/PLGA/quitosano presentan una forma esferoidal, tal como las nanopartículas de magnetita/PLGA sin quitosano.

La Figura 12 en la sección e) y f), corresponden a las nanopartículas preparadas con concentraciones de quitosano mayores a 1.59×10^{-6} M, en la que se puede observar una elongación en la forma de las nanopartículas y deformaciones en la superficie de la partícula con rangos de tamaño de 300 a 793 nanómetros.

Desde nuestro punto de vista, las nanopartículas de magnetita/PLGA/quitosano con concentración 3.33×10^{-8} M y un tamaño promedio de 160 nanómetros (Figura 12 sección c), son consideradas como las más viables en el desarrollo de

encapsulación y liberación de fármacos, así como el tratamiento y diagnóstico de enfermedades como el cáncer. Es tan amplio el abanico de posibilidades con esta nanoplataforma que inclusive permite la posibilidad de utilizarse en terapia dirigida utilizando campos magnéticos externos tales como resonancia magnética [28].

POTENCIAL ZETA DE LAS NANOPARTICULAS

En la Figura 13 podemos observar el comportamiento de las mediciones de potencial zeta para las distintas concentraciones de quitosano y los resultados obtenidos son similares a los obtenidos por Chunqiang Guo [31] con sus nanopartículas de PLGA-quitosano. Ellos obtuvieron el tamaño más grande de partícula de 972 nanómetros con una concentración de 2.72×10^{-5} M. Un mayor diámetro si lo comparamos con nuestro tamaño máximo obtenido (793 nm). Obtenido con una concentración menor de quitosano (3.33×10^{-6} M). Esta diferencia puede deberse al efecto de la interacción entre la magnetita/PLGA, lo cual produce nanopartículas más compactas. Estos autores obtuvieron también una tendencia de potencial Zeta y tamaño en concentraciones de quitosano entre 4.5×10^{-6} y 6.8×10^{-6} mol/L. En nuestro caso, la tendencia de potencial Zeta y tamaño se encontró entre 2.8×10^{-8} y 1.38×10^{-7} M.

Como podemos observar en la Figura 13, la superficie de las nanopartículas de magnetita/PLGA muestran un valor de potencial Zeta negativo (-27 mV), similar a la reportada por Botdee [27] (-26 mV) y con un valor de -20 mV con nanopartículas de PLGA solas reportada por Chunqiang Guo. Esta diferencia probablemente se debe al hecho de que en nuestro caso y el de Botdee, las cadenas del polímero de PLGA circundante a las nanopartículas de magnetita exponen una mayor proporción de grupos carboxílicos.

A medida que la concentración de quitosano se incrementa hasta 3×10^{-8} M, el potencial Zeta incrementa y alcanza zona plana, los valores de potencial Zeta permanecen constantes, aproximadamente 25 mV. Este efecto también se observó con nanopartículas sin núcleo de magnetita [31]. Sin embargo el valor máximo de

potencial Zeta obtenido por Chunqiang Guo (55 mV) fue a valores de concentración de quitosano mayores, como mencionamos más arriba. En esta etapa, cuando la concentración de quitosano incrementa, el diámetro (ver Figura 12) y la carga superficial de las nanopartículas no presentan un cambio apreciable, esto en parte se debe a la adsorción de las moléculas de quitosano en la superficie de las nanopartículas de magnetita/PLGA.

Más allá de esta concentración, el diámetro promedio incrementa a 300 nanómetros y los valores de potencial Zeta alcanzan 52 mV. Después de este valor, aun cuando se incremente la cantidad de quitosano y el diámetro de las nanopartículas incrementen, el potencial Zeta no presenta un cambio apreciable, lo que puede ser entendido por el modelo de Chunqiang Guo, donde probablemente las últimas capas de quitosano no forman capas ordenadas alrededor de las nanopartículas, en vez de eso, las cadenas de quitosano se repelen debido a interacciones electrostáticas, pero al mismo tiempo se atraen por medio de interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals, formando agregados aislados de quitosano evitando el incremento en la carga pero aumentando el tamaño de la nanopartícula.

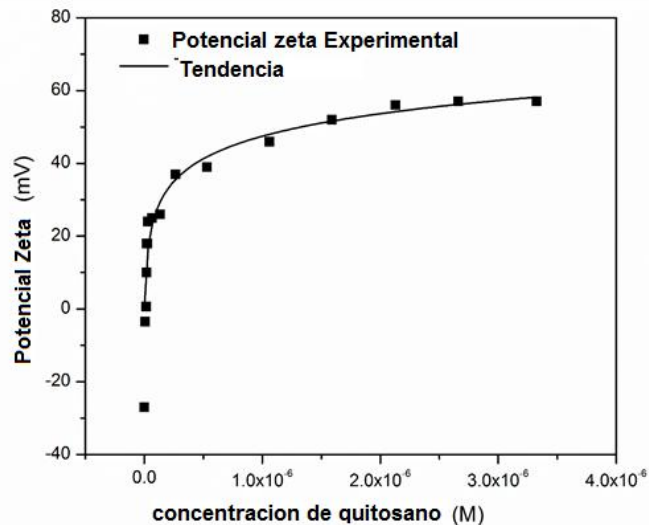


Figura 13. Comportamiento experimental de las mediciones de las mediciones de potencial zeta en las nanopartículas de magnetita/PLGA a diferentes concentraciones de quitosano.

INTERACCION DE NANOPARTICULAS EN LOS MODELOS DE MEMBRANA

En la Figura 14 podemos ver cómo el comportamiento de las isothermas consistentes en una mezcla de fosfolípidos en una interfase aire-agua, con diferentes proporciones de quitosano en nanopartículas de magnetita/PLGA en la subfase. Podemos observar que la isoterma de la mezcla de fosfolípidos mantiene una pequeña meseta en el rango de los 15-20 mN/m similar a la encontrada para el DPPC descrita por Valencia Rivera [32]. El área molecular promedio de la mezcla (en su fase condensada extrapolada a una presión de cero) es de 64 Å²/molécula, un valor más alto en comparación al encontrado por nosotros para DPPC puro (55 Å²/molécula) [33]. Esto debido probablemente al efecto de la mezcla y la presencia de los fosfolípidos cargados negativamente.

Para grandes áreas, correspondientes a las fases gaseosas o las fases de líquido expandido, podemos observar que antes de empezar a comprimir la monocapa, las nanopartículas están presentes en la interfase aire-agua, así como la adsorción de las nanopartículas incrementa cuando estas presentan un potencial Zeta mayor.

Podemos observar que el área incrementa a medida que la carga incrementa: 85, 92, 95 Å²/molécula para nanopartículas con potencial Zeta de -27, 0.7 and 24 mV de nanopartículas en la subfase, respectivamente. Este comportamiento demuestra que las nanopartículas se mantienen en la monocapa aun a grandes presiones y la interacción de las nanopartículas con el modelo de membrana incrementa con las nanopartículas cargadas positivamente. Podemos encontrar resultados similares en el trabajo de Matthias Schulz [34], el cual concluye que las nanopartículas cargadas positivamente interactúan con el grupo fosfato de los lípidos, incrementando la interacción nanopartícula-fosfolípido y de esta manera aumentando el área superficial por fosfolípido.

Otro efecto que se observa por la presencia de las nanopartículas en la monocapa de fosfolípidos es la desaparición de esa pequeña meseta que se observa en la isoterma de fosfolípidos sin nanopartículas en la subfase. Este fenómeno se observó de igual manera en monocapas de DPPC, utilizando nanopartículas hidrofóbicas por Almada et. al. [35], péptidos catiónicos [33] y quitosano

hidrofobizado [36] en la subfase. Esto también concuerda con los resultados de Matthias Schulz, el cual observa el cambio en el equilibrio de la fase de líquido condensado y líquido expandido, así como la eliminación de la fase de líquido condensado a medida que se incrementaba la concentración de polímero interactuando con el modelo de membrana.

El módulo de compresión, definido como $C_s^{-1} = -A d\pi/dA$, para cada presión, π , y área, A , de la isoterma, ha sido utilizado por varios autores [37], [38], [36] para caracterizar las propiedades mecánicas de las monocapas en una interfase aire-agua. La presencia de la mezcla de fosfolípidos y monocapas de lípidos resulta en una mayor compresibilidad para la monocapa [39], [36]. Nuestros resultados pueden observarse en la Figura 14, en la que se muestra el efecto de las nanopartículas cargadas en la flexibilidad de la membrana. Podemos notar que para las nanopartículas con un potencial Zeta mayor adsorbidas en la monocapa, disminuyen la compresibilidad de la monocapa. Particularmente, en la presión superficial de 30 mN/m, el módulo de compresión disminuye de 77 mN/m, para la mezcla de fosfolípidos hasta 64, 56 y 24 mN/m cuando las nanopartículas de potencial Zeta de -27, 0.7 y 24 mV están en la subfase acuosa, respectivamente. Esto confirma que la adsorción de nanopartículas con superficies cargadas positivamente aumentan la fluidez de la membrana, demostrado también por Bo Wang [40] y Camara [41] con un modelo de membrana.

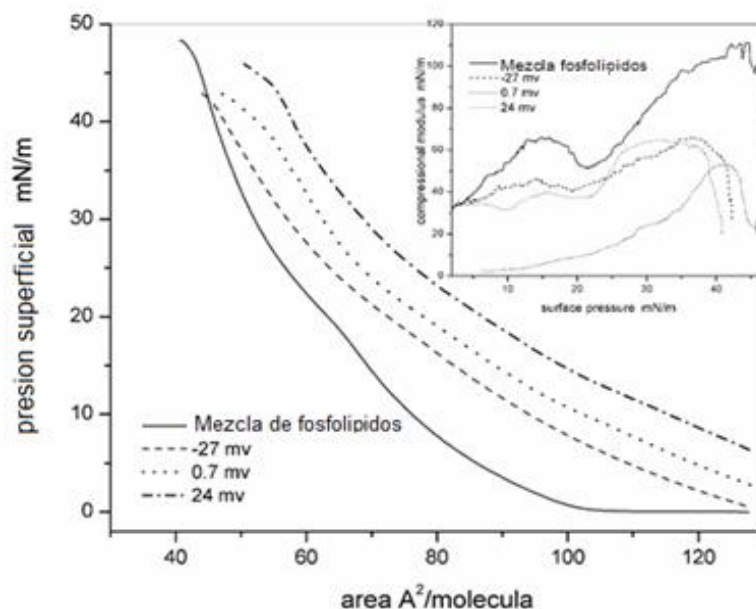


Figura 14. Isotermas de presión-área y valores de módulos de compresibilidad contra presión superficial para nanopartículas de magnetita/PLGA/quitosano con diferente carga en la subfase (9.3×10^{10} Nps/ml) en un modelo de membrana consistente de una mezcla de tres fosfolípidos en una interfase aire-agua.

Finalmente, mostramos el comportamiento de la absorción de nanopartículas en la mezcla de fosfolípidos en una interfase aire-agua.

El efecto de la adsorción de nanopartículas con diferente superficie de carga en la mezcla de fosfolípidos se muestra en la Figura 15. Puede notarse cómo la mezcla de fosfolípidos sin nanopartículas en la subfase presenta una estabilidad muy débil y cómo a medida que se retira el control de presión de 30 Mn/m, se estabiliza pasada una hora a 10 ± 1 mN/m, esto también se observó con dos mezclas de fosfolípidos por Almada y colaboradores [35] y para monocapas compuestas por un fosfolípido en la interfase aire-agua por Wanda Barzyk [42]. Es interesante notar que el decremento fue más bajo cuando las nanopartículas se depositaron en la subfase, por ejemplo: los incrementos se obtuvieron (medidos al final una vez que la presión de la mezcla de fosfolípidos se estabilizó), con diferentes nanopartículas en la monocapa. Los correspondientes incrementos de presión (respecto a la monocapa

de fosfolípidos) para las nanopartículas con potencial Zeta de -27, 0.7, 24 y 34 mV fue: 10, 13, 20, y 21 mN/m, respectivamente. Estos resultados muestran que ambos tipos de nanopartículas, las cargadas positiva y negativamente, son capaces de interactuar con el modelo.

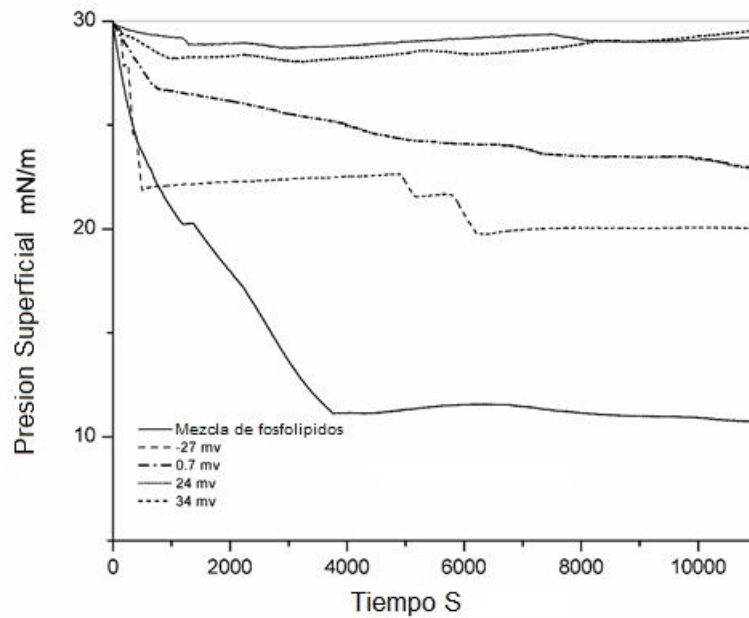


Figura 15. Datos experimentales de adsorción para nanopartículas de magnetita/PLGA/quitosano con diferente carga en un modelo de membrana consistente de una mezcla de tres fosfolípidos en una interfase aire agua.

CONCLUSIONES

Se preparó un sistema novedoso de nanopartículas híbridas consistente de un núcleo de magnetita cubiertas en PLGA con un segundo recubrimiento con quitosano. Se determinaron los tamaños de la plataforma en las diferentes etapas de síntesis. Primero, las nanopartículas de magnetita se hidrofobizaron con ácido oleico, las cuales fueron incorporadas al recubrimiento de nanopartículas de PLGA por el método de solvente por evaporación. Las imágenes de AFM y resultados de DLS sugieren que el incremento de tamaño debido a la adición del núcleo de magnetita no afectó significativamente en las nanopartículas de magnetita/PLGA.

Con base en los resultados de DLS, comparando tamaño y AFM para observar la morfología, establecimos que la síntesis de nanopartículas de magnetita/PLGA con relación molar 1:3 fueron las ideales (por tamaño, forma y adición de núcleo de magnetita) para continuar con la segunda etapa de desarrollo del sistema de nanopartículas híbrido. Finalmente encontramos cómo las nanopartículas realizan importantes modificaciones mecánico-estructurales en un modelo de membrana resultado de las interacciones entre la carga neta negativa de los componentes fosfolípidos del modelo de membrana y las nanopartículas de magnetita/PLGA/quitosano cargadas positivamente.

De esta manera, este trabajo provee un sistema novedoso de nanopartículas con carga ajustable a las diferentes necesidades de síntesis, el cual aporta información importante en la interacción entre nanopartículas y modelos de membrana, información valiosa en el desarrollo de sistemas de nanopartículas cargadas con fármaco para la cura de enfermedades.

PERSPECTIVAS

El presente trabajo presenta un amplio abanico de posibilidades para futuras investigaciones. En primer lugar, ofrece un panorama amplio en el tema de nanopartículas cargadas con fármaco y materiales inorgánicos con diferentes propósitos. Por otra parte, es posible analizar el efecto de la interacción de las nanopartículas en cultivos celulares sin y con fármaco para determinar la citotoxicidad de las nanopartículas con diferente valor de carga eléctrica.

Es posible aumentar el grado de complejidad del modelo de membrana aumentando el número de fosfolípidos, con la posibilidad de acercarse más a un símil *in vivo*, así como caracterizar utilizando diferentes técnicas como microscopia de ángulo Brewster para observar las regiones y dominios que se forman en la monocapa al depositar los fosfolípidos en la balanza de Langmuir.

El modelo de membrana actual está listo para ser comprobado en sistemas de nanopartículas con diferente composición y morfología, por lo cual el presente trabajo puede ser contrastado con futuros trabajos.

REFERENCIAS

1. Siakotos, A.N., G. Rouser, and S. Fleischer, *Isolation of highly purified human and bovine brain endothelial cells and nuclei and their phospholipid composition*. *Lipids*, 1969. **4**(3): p. 234-239.
2. NSTC/CoT/NSET, *National Nanotechnology Initiative (NNI): Supplement to the President's FY 2015 Budget*. 2015.
3. Alberts, B., *Biología Molecular de la Celula*. 3era ed. 1996: Omega.
4. BERG, J., *Biochemistry*, in *There Are Three Common Types of Membrane Lipids* W.H. Freeman, Editor. 2002: New York
5. Alberts, B., *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. 2002: Garland Science
6. Yeagle, P.L., *Membrane of Cells*. 2nd ed. 1993: Academic Press.
7. Singer, S.J., *The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes*. *Science*, 1972. **175**(4023): p. 720-731.
8. Lingwood, D., *Lipid Rafts As a Membrane-organizing Principle*. *Science*, 2010. **327**(5961): p. 46-50.
9. Hamada, T. and K. Yoshikawa, *Cell-Sized Liposomes and Droplets: Real-World Modeling of Living Cells*. *Materials*, 2012. **5**(11): p. 2292.
10. von Heijne, G. and C. Blomberg, *Trans-membrane translocation of proteins. The direct transfer model*. *European journal of biochemistry / FEBS*, 1979. **97**(1): p. 175-181.
11. Nicolson, G.L., *The Fluid—Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2014. **1838**(6): p. 1451-1466.
12. Hans, M.L. and A.M. Lowman, *Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting*. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 2002. **6**(4): p. 319-327.
13. Montagne, F., et al., *Preparation and characterization of narrow sized (o/w) magnetic emulsion*. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2002. **250**(0): p. 302-312.
14. Wassel, R.A., et al., *Dispersion of super paramagnetic iron oxide nanoparticles in poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2007. **292**(2–3): p. 125-130.
15. Uehara, T.M., et al., *A Detailed Investigation on the Interactions between Magnetic Nanoparticles and Cell Membrane Models*. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2013. **5**(24): p. 13063-13068.
16. Frisken, B., *Dynamic light scattering, theory and practice*. 2001.
17. manual, M.u., *Zetasizer Nano* 2013.
18. COLLOID SCIENCE, in *Zeta Potential in Colloid Science*, R.J. Hunter, Editor. 1981, Academic Press. p. ii.
19. Nicolet, T., *Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry*. 2001.
20. González, M.C.R., *Microscopía de Fuerza Atómica*, U.a.d.E.d. Morelos, Editor. 2005: Cuernavaca Morelos, Mexico.
21. Misran, M. *Atomic Force Microscopy*. 2015; Available from: <http://www.geocities.ws/misnimisran/AFM07lec.pdf>.
22. Jr., O.N.O., *Langmuir-Blodgett Films - Properties and Possible Applications*. *Brazilian Journal of Physics*, 1992. **22**(2).
23. ZISMAN, W.A., *The Physical Chemistry of Surface Films*. William D. Harkins. New York: Reinhold Pub., 1952. 413 pp. \$10.00. *Science*, 1952. **116**(3020): p. 548-549.

24. berg, 1963.
25. Reynolds, F., et al., *Method of Determining Nanoparticle Core Weight*. Analytical Chemistry, 2005. **77**(3): p. 814-817.
26. Horcas, I., et al., *WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology*. Review of Scientific Instruments, 2007. **78**(1): p. 013705.
27. Bootdee, K., M. Nithitanakul, and B. Grady, *Synthesis and encapsulation of magnetite nanoparticles in PLGA: effect of amount of PLGA on characteristics of encapsulated nanoparticles*. Polymer Bulletin, 2012. **69**(7): p. 795-806.
28. Zhao, H., K. Saatchi, and U.O. Häfeli, *Preparation of biodegradable magnetic microspheres with poly(lactic acid)-coated magnetite*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2009. **321**(10): p. 1356-1363.
29. Tansik, G., A. Yakar, and U. Gündüz, *Tailoring magnetic PLGA nanoparticles suitable for doxorubicin delivery*. Journal of Nanoparticle Research, 2013. **16**(1): p. 1-13.
30. Chronopoulou, L., et al., *Chitosan-coated PLGA nanoparticles: A sustained drug release strategy for cell cultures*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013. **103**(0): p. 310-317.
31. Guo, C. and R.A. Gemeinhart, *Understanding the adsorption mechanism of chitosan onto poly(lactide-co-glycolide) particles*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2008. **70**(2): p. 597-604.
32. Valencia-Rivera, D.E., et al., *Interaction of N-nitrosodiethylamine/bovine serum albumin complexes with 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine monolayers at the air-water interface*. Journal of Colloid and Interface Science, 2007. **316**(2): p. 238-249.
33. López-Oyama, A.B., et al., *Interaction of the cationic peptide bactenecin with mixed phospholipid monolayers at the air-water interface*. Journal of Colloid and Interface Science, 2011. **359**(1): p. 279-288.
34. Schulz, M., A. Olubummo, and W.H. Binder, *Beyond the lipid-bilayer: interaction of polymers and nanoparticles with membranes*. Soft Matter, 2012. **8**(18): p. 4849-4864.
35. Almada, M., et al., *Interaction and Cytotoxic Effects of Hydrophobized Chitosan Nanoparticles on MDA-MB-231, HeLa and Arpe-19 Cell Lines*. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2014. **14**(6): p. 692-701.
36. Parra-Barraza, H., et al., *Chitosan-Cholesterol and Chitosan-Stearic Acid Interactions at the Air-Water Interface†*. Biomacromolecules, 2005. **6**(5): p. 2416-2426.
37. Dynarowicz-Łątka, P., A. Dhanabalan, and O.N. Oliveira, *A Study on Two-Dimensional Phase Transitions in Langmuir Monolayers of a Carboxylic Acid with a Symmetrical Triphenylbenzene Ring System*. The Journal of Physical Chemistry B, 1999. **103**(29): p. 5992-6000.
38. Broniatowski, M., et al., *Langmuir Monolayers Characteristic of (Perfluorodecyl)-Alkanes*. The Journal of Physical Chemistry B, 2004. **108**(35): p. 13403-13411.
39. Ihalainen, P. and J. Peltonen, *Miscibility of Lipids in Monolayers Investigated through Adsorption Studies of Antibodies*. Langmuir, 2003. **19**(6): p. 2226-2230.
40. Wang, B., et al., *Nanoparticle-induced surface reconstruction of phospholipid membranes*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(47): p. 18171-18175.
41. Camara, C.I., et al., *Interaction of magnetic nanoparticles with phospholipid films adsorbed at a liquid/liquid interface*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2015. **17**(1): p. 414-421.
42. Barzyk, W., et al., *Penetration of Milk-Derived Antimicrobial Peptides into Phospholipid Monolayers as Model Biomembranes*. Biochemistry Research International, 2013. **2013**: p. 16.