

011902



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERIA DE MATERIALES

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

**“MEDICION DE LAS FUERZAS DE INTERACCION EN
PROTEINAS ADSORBIDAS EN SUPERFICIES”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS (CIENCIA DE MATERIALES)

P R E S E N T A :

JOSE /CAMPOS TERAN

DIRIGIDA POR EL DR. ROLANDO CASTILLO CABALLERO

MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

OCTUBRE 2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES EDIFICIO "E", UNAM
CIRCUITO EXTERIOR, CIUDAD UNIVERSITARIA
04510 MÉXICO, D.F.
TEL: 5622-4730 Y 5622-4731
pceim@www.posgrado.unam.mx

OF.PceIM/682/02

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIÉRREZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMÓN. ESCOLAR.
P R E S E N T E

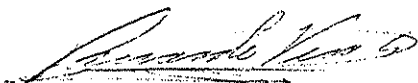
At'n. Biól. Francisco Javier Incera Ugalde

Me permito informarle que después de analizar la situación académica del alumno **CAMPOS TERAN JOSE**, con número de cuenta 8958974-4 y número de expediente 3942002, para obtener el grado de Doctor en Ciencias (Ciencia de Materiales) y la defensa de su tesis titulada "Medición de las Fuerzas de Interacción en Proteínas Adsorbidas en Superficies", le informo que el Comité Académico en su sesión del 22 de mayo, acordó nombrar al siguiente jurado:

CARGO	NOMBRE	ADSCRIPCIÓN
Presidente	Dr. Rolando Castillo Caballero	Instituto de Física
Primer Vocal	Dr. Jaime Mas Oliva	Instituto de Fisiología Celular
Segundo Vocal	Dr. Abel Moreno Cárcamo	Instituto de Química
Tercer Vocal	Dr. Miguel Costas Basín	Facultad de Química
Secretario	Dr. Ricardo Vera Graziano	Instituto de Investigaciones en Materiales
Suplente	Dra. Carmen Várea Gilabert	Instituto de Física
Suplente	Dra. Margarita Rivera Hernández	Instituto de Química

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un saludo cordial.

Atentamente
Cd. Universitaria, D.F., a 28 de mayo de 2002.



DR. RICARDO VERA GRAZIANO
COORDINADOR



COORDINACIÓN DE POSGRADO EN CIENCIA
E INGENIERÍA DE MATERIALES

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

A Viviana,

A mimor,

Mi esposa, mi amiga, mi compañera.

No hay palabras para agradecerte todo tu amor, cariño, afecto y apoyo, sin ellos no se me ocurre como es que hubiera logrado finalizar esta tesis.

Sin ti no soy nada, contigo lo soy todo.

Te amo inmensamente.

A mis Padres,

A ustedes les debo todo.

Los amo.

A mis hermanos,

Gracias por su amor y cariño en toda circunstancia.

Los amo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Agradecimientos.

A la UNAM y al Fyskem I.

A la Dra. Carmen Varea, por todo su apoyo y por guiar mi formación académica durante casi 10 años, pero sobretodo por mostrarme que si uno esta convencido de que lo que uno hace vale la pena, no hay nada ni nadie que nos impida hacerlo.

A Rolando, por todo lo que aprendí contigo, por tu apoyo, y por enseñarme que sí vale la pena dedicarse a la ciencia.

A Salvador, por su amistad y compañerismo. Mi trabajo en el laboratorio no hubiera sido tan exitoso sin tu apoyo y ayuda.

A Tommy Nylander, por su amistad, por su salmón y por toda la confianza que me tiene.

A Krister Eskilsson, porque no pude tener mejor compañero de proyecto en Suecia y porque nuestra amistad nos une en muchos niveles. ¿Crees que existan otras dos personas a las que les guste tanto el fútbol, la comida, la bebida y la ciencia?.

A Bjorn Lindman, por su apoyo para lograr finalizar esta tesis, y por aceptarme por mi trabajo y no por mis títulos.

A los Drs., Jaime Mas, Abel Moreno y Stephen Muhl

A Toño, Pablo y Erik, por ser mis "hermanos" y porque sé que siempre cuento con ustedes.

A todos mis amigos. En especial a: Ligia y Juanjo, Paty y Richi, Julieta y Polo, Delia y Alfredo, Leo y Lala, Erich, Elena, Cathy, Cecilia E., Simona y Andrea, Cecilia y Rolf, Pedro, Paula, Ana, Yoshi, Joakim, Tania y Paolo, Paty y Alvaro, Irma.

A Viviana, mimor, por que sin ella no habría ni una figura en esta tesisy quizás no habría tesis.

A mi hermano Jorge, por dejarme utilizar todas sus computadoras y aun más, por ayudarme a usarlas.

Agradezco a todas mis diferentes familias, los Campos, los Terán, los Romeo, los Morales, los Botella, los García, los Namur, los Campesino, los Strassburger y los Sáyago por su invaluable apoyo y amor.

``La imaginación es mas importante que el conocimiento''.
Albert Einstein.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Indice.

	Página.
Resumen	i
Abstract	iii
Introducción	1
Capítulo 1. Adsorción de proteínas en superficies sólidas.	4
1.1 Estructura de las proteínas.	5
1.2 Estabilidad estructural de una proteína.	8
1.3 Factores que afectan la adsorción de una proteína en una superficie.	10
1.4 Interacciones de proteínas en una superficie sólida.	11
1.5 Medición de fuerzas en superficies con proteínas adsorbidas.	14
1.5.1 Orientación de las proteínas en las superficies.	14
1.5.2 Cambios en las capas adsorbidas provocados por la presión.	15
1.5.3 Cinéticas de adsorción.	15
Capítulo 2. Fuerzas Superficiales.	17
2.1 Fuerzas de van der Waals.	18
2.1.1 Fuerzas de van der Waals entre superficies.	19
2.1.2 Fuerzas de van der Waals en superficies cubiertas con proteínas.	22
2.2 Fuerza electrostática de doble capa.	23
2.2.1 Fuerza electrostática de doble capa entre dos superficies.	25
2.2.2 Fuerza electrostática de doble capa en soluciones de proteínas.	28
2.2.3 Teoría de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO).	30
2.3 Fuerzas de solvatación y estéricas (corto alcance).	31
2.4 Fuerzas hidrofóbicas.	34
2.5 Fuerzas estéricas (tipo cepillo polimérico).	34
Capítulo 3. Técnicas experimentales.	37
3.1 El aparato de fuerzas de superficie (AFS).	37
3.1.1 AFS Mk IV.	38
3.1.2 Cálculo de la separación entre las superficies.	42
3.1.3 Medición de fuerzas.	46

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

	Página
3.1.4 Preparación de las superficies de mica.	51
3.1.5 Pegado de las superficies en los discos de sílice.	56
3.2 Películas de Langmuir y Películas de Langmuir-Blodgett.	58
3.2.1 Películas de Langmuir.	58
3.2.2. Preparación de una película de Langmuir-Blodgett.	62
3.3 Visualización de películas de Langmuir y Langmuir-Blodgett.	63
3.3.1 El microscopio de ángulo de Brewster.	64
3.3.2 El microscopio de fuerza atómica.	67
3.4 Elipsometría.	69
Capítulo 4. Superficie e interacciones hidrofóbicas.	72
4.1 Efecto hidrofóbico e interacción hidrofóbica.	72
4.2 Interacción "hidrofóbica" de largo alcance.	73
4.3 Estudios en el AFS con mica hidrofóbica.	76
4.4 Procedimiento para realizar superficies hidrofóbicas de OTE.	78
4.4.1 Comentarios sobre el procedimiento de Wood y Sharma.	78
4.5 Resultados y discusión.	81
4.5.1 Monocapas de Langmuir de OTE.	81
4.5.2 Imágenes de microscopía de ángulo de Brewster.	81
4.5.3 Imágenes de microscopía de fuerza atómica de OTE en mica.	84
4.5.4 Fuerzas entre superficies hidrofóbicas.	92
4.5.4.1 Preparación de las superficies hidrofóbicas de OTE para el AFS.	92
4.5.4.2 Procedimiento experimental.	92
4.5.4.3 Interacción entre superficies entre superficies hidrofóbicas de OTE en agua.	93
4.6 Conclusiones.	99
Capítulo 5. Interacción entre capas adsorbidas de monooleína y la acción de una proteína lipasa en las capas formadas.	100
5.1 Lipasa Thermomyces Lanuginosa (TLL).	103
5.2 Monooleína.	105
5.3 Procedimiento experimental.	108

	Página
5.3.1 Materiales.	108
5.3.2 Métodos.	109
5.3.2.1 Preparación de las superficies hidrofóbicas.	109
5.3.2.2 Medición de las fuerzas superficiales.	109
5.3.2.3 Elipsometría.	109
5.4 Resultados y discusión.	111
5.4.1 Adsorción e interacción de capas de monooleína en superficies hidrofóbicas.	111
5.4.2 Interacción de TLL en capas de MO adsorbidas en superficies hidrofóbicas.	117
5.5 Conclusiones.	123
Capítulo 6. Interacciones entre apolipoproteínas humanas CI adsorbidas en superficies hidrofílicas e hidrofóbicas.	124
6.1 Lipoproteínas de alta densidad (HDL).	126
6.2 Apolipoproteína CI (Apo CI).	126
6.2.1 Estabilidad de la Apo CI.	128
6.2.2 Películas de Langmuir de Apo CI.	130
6.2.3 Películas de Langmuir-Blodgett de Apo CI.	132
6.3 Procedimiento experimental.	138
6.3.1 Materiales.	138
6.3.2 Método de medición de fuerzas con el AFS.	138
6.4 Resultados y discusión.	139
6.4.1 Interacciones entre Apo CI adsorbida en superficies hidrofílicas.	139
6.4.2 Interacciones entre Apo CI depositadas directamente en superficies hidrofílicas.	143
6.4.3 Interacciones entre Apo CI adsorbida en superficies hidrofóbicas.	151
6.5 Conclusiones.	155
Conclusiones Generales.	157
Apéndice 1.	159

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Resumen.

El aparato de fuerzas de superficie (AFS) fue usado para estudiar dos diferentes aspectos de las interacciones entre proteínas y superficies. En uno de los estudios, el principal interés era la actividad enzimática de la lipasa *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* (TLL). En otro, la motivación estaba basada en poder dar información de la relación estructura-función de la apolipoproteína humana CI (Apo CI). Dos diferentes sustratos se utilizaron en el AFS, mica se usó como una superficie hidrofílica, y como superficie hidrofóbica utilizamos mica cubierta, a través de un depósito de Langmuir-Blodgett, con una película polimerizada de octadeciltriétoxosilano (OTE). La monocapa hidrofóbica de OTE fue caracterizada con microscopía de ángulo de Brewster antes de ser transferida a la mica, y después de esta transferencia, fue estudiada con el microscopio de fuerza atómica. También, se realizó un estudio de la interacción "hidrofóbica" de largo alcance. La presencia de material en exceso y de nano burbujas parecen ser el origen de esta interacción. El AFS y una técnica elipsométrica se utilizaron para estudiar las fuerzas de interacción y el comportamiento de adsorción de monooleína (MO), respectivamente. Una superficie de mica, o de silica, vuelta hidrofóbica con OTE se utilizaron para adsorber MO a partir de agua. También, se estudio el efecto en las capas formadas de MO al adicionar la lipasa TLL. Las curvas de fuerza contra distancia medidas entre dos superficies de MO muestra una fuerte interacción repulsiva debajo de los 400 Å. El intervalo de esta fuerza repulsiva disminuye con el número de acercamientos. No se observó ninguna adhesión, siempre y cuando las superficies no fueran llevadas a contacto hidrofóbico. La distancia de separación medida en el punto de contacto MO-MO fue de 55 Å. Esto significa un grosor de la capa de MO de aproximadamente 27 Å, el cual concuerda con el grosor de 25 Å determinado por elipsometría. La fuerza repulsiva puede surgir de la compresión de una fase cúbica de MO. Suponemos que esta fase se forma entre las superficies cuando las superficies son acercadas a contacto, debido a una separación de fase inducida capilarmente desde la solución saturada de MO. La fuerza repulsiva cambia significativamente con la adición de TLL (concentración de 1×10^{-8} M). En contraste con las curvas medidas antes de añadir TLL, las superficies no parecen estar completamente cubiertas de MO, dado que siempre observamos una fuerza atractiva (brinco de las superficies hacia contacto) de un

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

intervalo similar a los que observamos en superficies puras de OTE. Los resultados elipsométricos de la acción de TLL en las capas de MO formadas en una superficie hidrofóbica, muestran una significativa y pronunciada disminución de la cantidad adsorbida. Además, la razón de disminución y la reducción de la cantidad adsorbida aumentan con la concentración de TLL.

Las fuerzas de interacción entre capas adsorbidas de Apo CI fueron medidas utilizando el AFS. Superficies hidrofílicas (mica) e hidrofóbicas (mica-OTE) se utilizaron para adsorber Apo CI y estudiar el carácter anfílico de la proteína. También, se realizó un experimento en donde se depositó directamente la proteína sobre mica. Las curvas de fuerza contra distancia muestran que la fuerza de interacción entre las capas adsorbidas de Apo CI, en mica y mica-OTE, están compuestas de una fuerza de doble capa electrostática a grandes distancias y de una fuerza repulsiva estérica a distancias pequeñas. En algunos casos, no se midió ninguna fuerza antes de que se encontrara un pared estérica (usualmente a 40 Å). Esto parece indicar que una completa neutralización de la carga superficial se logra a través de la adsorción de la proteína. La adsorción fue mayor en superficies hidrofóbicas dado que se obtuvieron valores de grosor de capa mayores, y en un tiempo menor, comparados con el caso de superficies hidrofílicas. La adhesión entre las capas adsorbidas en superficies hidrofóbicas fue mucho menor comparada con las que se formaron en superficies hidrofílicas. En el caso de capas adsorbidas en mica a partir de una solución, las moléculas de Apo CI parecen adsorberse con su eje largo sobre las superficies formando una capa de aproximadamente 7 Å. Esta capa siempre fue perturbada en el primer acercamiento de medición de la fuerza de interacción. En un segundo acercamiento consecutivo, se midió una fuerza repulsiva hasta que una fuerza atractiva, debajo de los 180 Å, hace brincar a las superficies hacia contacto. Este brinco puede tener su origen en los “puentes” que se pueden formar entre las superficies y las proteínas. En el experimento en donde se depositó la proteína en exceso, estos brincos son más claros y la distancia final de separación sugiere que una parte de la proteína esta adsorbida con su eje largo sobre la superficie y la otra parte esta orientada hacia la solución. En las superficies de mica-OTE se observó la formación de varias capas de Apo CI. Estas capas pueden removerse con cada acercamiento de medición de fuerzas. La capa que permanece en la superficie tiene a las moléculas de Apo CI con su eje largo sobre la superficie hidrofóbica.

Abstract.

The surface force apparatus (SFA) technique was used to study two different aspects of protein interactions with a surface. In one of the studies, the principal interest was on the enzymatic activity of *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* lipase (TLL). In the other, the aim was to give information of the structure-function relationship of human apolipoprotein CI (Apo CI).

Two main substrates were used in the SFA, mica was used as a hydrophilic surface and as hydrophobic surface we used covered mica through Langmuir-Blodgett deposition of polymerized octadecyltriethoxysilane (OTE). The hydrophobic monolayer of OTE was characterized with Brewster angle microscopy prior to its transference on mica, and after the transference, the hydrophobic film was studied with atomic force microscopy. A study of the long range "hydrophobic" interaction was done with this surface. The presence of material excess and nano bubbles seems to be the origin of this interaction.

SFA and ellipsometry techniques were used to study the interaction forces and the adsorption behaviour of monoolein (MO), respectively. MO was adsorbed from water to a hydrophobised mica or silica surface. In addition the effect of added lipase TLL to an adsorbed layer of MO was investigated. The force versus distance curves between two MO covered surfaces feature a strong repulsive interaction beneath 400 Å. The range of the repulsive force decreases, however, with the number of approaches. No adhesion was observed, provided that the surfaces were not taken to hydrophobic contact. The surface separation at MO-MO contact was determined to about 55 Å. This means a layer thickness of about 27 Å, which is comparable to the thickness (25 Å) determined by ellipsometry. The repulsive force may arise from compression of a cubic phase of MO. This phase is suggested to form between the surfaces when they approach close contact due to capillary induced phase separation from the saturated MO solution. The repulsive force changes significantly with time after addition of TLL (concentration of about 1×10^{-8} M). In contrast to the force curves recorded before adding TLL, the surfaces do not seem to be completely covered with MO as we always observed an attractive force (inward jump) of similar range as was observed between pure OTE surfaces. Ellipsometry measurement of TLL action on MO covered hydrophobic surface reveals a significant and sharp decrease of the amounts

adsorbed. Furthermore, the rate of decrease and reduction in adsorbed amount increased with TLL concentration.

Interactions forces of Apo C-I were measured using the SFA. Apo C-I was adsorbed from water to hydrophilic and hydrophobic surfaces to study the amphiphilic character of the protein. As a hydrophilic substrate we used mica and as hydrophobic substrate we used mica-OTE surfaces. Also, an experiment where a direct deposit of the protein on hydrophilic mica was done. The force versus distance curves showed that the interaction force between layers of Apo CI, at mica and mica-OTE, is composed of electrostatic double-layers forces at large distances and steric repulsive forces at small distances. In some cases, no forces could be measured before a steric wall, usually at 40 Å, was reached. This indicates that a complete neutralization of the surface charge could be achieved through the adsorption of the protein. Hydrophobic adsorption was higher at hydrophobic surfaces since shorter time for adsorption and higher thickness values were obtained compare with the hydrophilic case. The adhesion between hydrophobic layers was much lower compare to the layers formed at hydrophilic surfaces. In the case of layers adsorbed from solution, the molecules of Apo CI are adsorbed side-on forming a monolayer of approximately 7 Å. This layer was always perturbed when the force interaction was measured on a first approach, in a second consecutive approach a repulsive forces is measured until an attractive force, below 180 Å, makes the surfaces jump to contact. This jump could be related to a bridging process of the protein and the surfaces. In the experiment were an excess of protein was deposit in mica surfaces, this jump was clearer and the final distance separation suggests that part of the protein is adsorbed side-on and the other part is oriented to the solution. Several layers were adsorbed at mica-OTE surfaces but they are removed with each force measuring approach. The layer that remains adsorbed to the surface has the molecules of Apo CI adsorbed side-on.

Introducción.

Esta tesis esta dedicada al estudio de las fuerzas que actúan entre superficies a las que se les adsorbe una proteína. Este estudio es de singular importancia tanto desde un punto de vista fundamental como práctico. Desde el punto de vista fundamental, las proteínas son moléculas complejas que ponen a prueba las teorías actuales que intentan explicar las interacciones que ocurren intra e inter molecularmente en las proteínas, así como las que existen entre las proteínas y una superficie (la cual puede ser una superficie sólida, una capa de un lípido, un tensoactivo, o una membrana celular). Por otro lado, el conocimiento de las interacciones moleculares entre proteínas puede ayudar a resolver una de las principales preocupaciones en las investigaciones biológicas: correlacionar la estructura (o arquitectura molecular) de las proteínas con su función. Considerando las grandes diferencias en el tamaño, forma y flexibilidad de los diferentes tipos de proteínas no es posible, por supuesto, tratar a las proteínas como un grupo homogéneo de moléculas y generalizar el comportamiento de estas en las interfases. Sin embargo, existe la necesidad de poder predecir el comportamiento de los sistemas que aun no ha sido estudiados.

Desde el punto de vista práctico, estas fuerzas determinan la adsorción de las proteínas sobre las superficies, la adhesión entre cuerpos macroscópicos, y son de gran importancia para la estabilidad de dispersiones y emulsiones. El uso de enzimas (proteínas) en múltiples procesos industriales que involucran superficies ha aumentado enormemente en los últimos años y estas son usadas frecuentemente en la industria farmacéutica, de cosméticos y de alimentos. Por otro lado, es importante conocer el proceso de adsorción de las proteínas en ciertas aplicaciones médicas, como es en la entrega de fármacos y en materiales biocompatibles. También, es importante en la comprensión de ciertos procesos biológicos, en especial en la participación de ciertas proteínas en algunas enfermedades como son la arterosclerosis o el SIDA.

Dado lo anterior, es claro que el trabajo dirigido hacia un mejor entendimiento del comportamiento de las proteínas en interfases es de gran importancia. Dos diferentes aspectos de la interacción de una proteína con una superficie se estudiaron en esta tesis, en uno el principal interés se encontraba en la actividad enzimática de la proteína

Thermomyces lanuginosa lipasa (TLL) sobre una estructura auto ensamblada del lípido monoleína (MO). En este caso, la estructura formada por MO es de gran importancia pues la actividad lipolítica de la TLL es extremadamente dependiente de ella. Esto es particularmente relevante para el uso industrial de estas enzimas lipolíticas, donde un mayor entendimiento de la interacción de estas con el sustrato es de crucial importancia para optimizar los procesos enzimáticos.

En el segundo caso, se estudio la interacción entre superficies a las que se les adsorbió la apolipoproteína humana CI (Apo CI). Esta proteína es de singular importancia pues es parte estructural (juntos con fosfolípidos) de las lipoproteínas, las cuales están involucradas en el transporte de colesterol en el flujo sanguíneo. La Apo CI es conocida por ser una *proteína intercambiable*, debido a su capacidad para moverse y cambiarse entre lipoproteínas. Aunque este fenómeno esta bien documentado, los mecanismos específicos que gobiernan este comportamiento aun no están bien comprendidos. Aquí, el interés esta basado en poder dar mayor información sobre la relación estructura-función de la Apo CI, a través de las diferentes interacciones y conformaciones encontradas en los experimentos de mediciones de fuerzas entre superficies, hidrofílicas e hidrofóbicas, cubiertas con esta proteína. Esta información es importante para lograr un mayor entendimiento sobre la manera en que las diferentes conformaciones de la proteína están relacionadas con la actividad de esta en la unión con los lípidos de las lipoproteínas.

Esta tesis esta dividida en seis capítulos. En el capítulo 1, se presenta una introducción a los aspectos más importantes en la adsorción de proteínas en superficies. En el capítulo 2, se describen los diferentes tipos de fuerzas que se pueden encontrar entre dos superficies y con las cuales se dio una interpretación a los resultados obtenidos. En el capítulo 3, se describen todas las técnicas experimentales utilizadas en esta tesis, en especial el aparato de fuerzas de superficie (AFS), con el cual se llevó a cabo la medición de las fuerzas de interacción entre las superficies y las proteínas. En el capítulo 4, se presenta el procedimiento realizado para volver a la mica (sustrato base en los estudios realizados en esta tesis) hidrofóbica por medio de una película de octadeciltrióxisilano (OTE) y el aporte que se logro en el entendimiento de lo que se conoce como la *interacción "hidrofóbica" de largo alcance* entre superficies. En el capítulo 5, se da una mayor introducción a la estructura de MO y de la proteína TLL, y se presentan los

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

resultados de interacción y actividad lipolítica obtenidos utilizando el AFS y una técnica elipsométrica. En el capítulo 6, también se da una mayor información sobre la estructura y función de la Apo CI y se discuten los resultados de interacción y adsorción obtenidos con el AFS tanto en una superficie hidrofílica, mica, y una hidrofóbica (mica-OTE). Los resultados obtenidos en los capítulos 4-6 se han publicado o están en proceso de publicarse en revistas de circulación internacional. Es pertinente aclarar aquí que la bibliografía que se encuentra en esta tesis esta dividida por capítulos y puede ocurrir que alguna referencia se repita pero con un diferente número asignado en cada capítulo.

1. - Adsorción de Proteínas en Superficies Sólidas.

En el estudio de las fuerzas entre superficies cubiertas con proteínas es importante conocer el proceso de adsorción de las mismas en las superficies, ya que éste determinará la conformación y orientación de las proteínas en la superficie, lo que a su vez determina el tipo de interacción que existe entre ellas.

Es bien sabido que las proteínas se adsorben espontáneamente en la mayoría de las interfases y esta propiedad es importante tanto para su función en sistemas biológicos, como en varias aplicaciones técnicas. La adsorción de proteínas puede ser deseada en algunos casos mientras que en otros no. En la industria farmacéutica, de cosméticos, y de alimentos, las proteínas son comúnmente utilizadas en reacciones enzimáticas, y también como emulsificantes y/o estabilizantes en las dispersiones coloidales.¹ Así mismo, la reducción de adsorción de proteínas es de gran importancia en ciertas aplicaciones médicas, como son los productos dentales o los biomateriales.² En estos casos, las proteínas adsorbidas pueden inducir reacciones no deseadas, como la formación de gruesos depósitos, precipitación de proteínas a partir de la solución, o respuestas inmunológicas.²

En este capítulo se da una introducción muy general sobre la estructura y estabilidad de las proteínas (para una mayor descripción se puede consultar el libro de Bioquímica de Voet y Voet³), así como los conceptos más importantes sobre la adsorción de proteínas en una superficie a partir de una solución acuosa y las interacciones que pueden existir entre proteínas adsorbidas en superficies. De igual manera se da una introducción a la medición de fuerzas en superficies con proteínas adsorbidas y a los factores que pueden afectar

¹ Godfrey, T.; West, S. (eds.): *Industrial Enzymology*, 2ª ed., Stockton Press, New York, 1996.

² Andrade, J. D. *Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers*, vol. 2, Plenum Press, New York, 1985.

³ Voet, D.; Voet, J. G. *Biochemistry*, 2ª ed., John Wiley & Sons, New York, 1995.

estas mediciones. Una mayor descripción de las fuerzas que se encuentran entre superficies cubiertas con proteínas se da en el capítulo dos de esta tesis.

1.1 Estructura de las proteínas.

Las proteínas son macromoléculas biológicas que consisten de hasta 20 diferentes aminoácidos, los cuales están unidos entre sí por policondensación, formando una cadena polipeptídica, cuya composición de aminoácidos es específica para cada proteína. A los aminoácidos unidos se les denominan *residuos de aminoácidos* para enfatizar que, con la unión, se perdió una molécula de agua.

A esta secuencia de residuos de aminoácidos se le conoce como la *estructura primaria* y es de gran importancia, pues determina la conformación y la función de las proteínas por medio de las propiedades de las cadenas laterales de cada aminoácido. Por ejemplo, la flexibilidad de la cadena se incrementa si el residuo de aminoácido Glicina (Gly) (el cual solo tiene un hidrógeno como cadena lateral) se encuentra presente; mientras residuos con cadenas laterales ramificadas (*e.g.* Valina (Val), Leucina (Leu) o Prolina (Pro)) tiene el efecto opuesto. Los residuos de aminoácidos varían en su polaridad, lo cual da como resultado que la molécula sea anfifílica. Los residuos cargados usualmente se encuentran en la superficie de la proteína, o tomando parte en puentes salinos internos; mientras que los residuos con cadenas laterales hidrofóbicas se encuentran predominantemente en la parte interna de la proteína. Los residuos con cadenas laterales polares que se encuentren en la parte interna de la proteína pueden formar puentes de hidrógeno entre sí mismos o con el cuerpo de la cadena polipeptídica.

La *estructura secundaria* de una proteína es la repetición regular de la conformación del cuerpo polipeptídico. Estas estructuras, como son las α hélices, láminas β y vueltas β (ver figura 1.1), se forman a partir de los enlaces de hidrógeno entre los grupos polares de la cadena principal. En el caso de las estructuras α hélices, los enlaces de hidrógeno se encuentran alineados en la misma dirección a lo largo de un eje helicoidal. Aquí cada oxígeno carbonilo de la cadena principal está unido por un enlace de hidrógeno a un hidrógeno amino que se encuentra tres residuos más lejos en la cadena principal. Cada residuo de aminoácido avanza 0.15 nm en el eje helicoidal, y 3.6 residuos se requieren

para completar una vuelta. Posiciones equivalentes ocurren cada 0.54 nm y a esta distancia se le conoce como el avance por vuelta (o pitch).

Las láminas β se forman a partir de los enlaces de hidrógeno entre dos o más cadenas polipeptídicas extendidas que se encuentren adyacentes. Esta estructura no es estrictamente plana, sino más bien ligeramente plegada debido a los ángulos de los enlaces que forman la cadena peptídica. Las cadenas adyacentes en una lámina β plegada pueden estar tanto de manera paralela como antiparalela, dependiendo si la unión peptídica entre los grupos amino y carboxilo de las cadenas corren en la misma dirección o en dirección opuesta. En ambos casos, las cadenas laterales de los residuos se extienden alternadamente hacia arriba o abajo del plano de la lámina de tal manera que las cadenas laterales de residuos adyacentes se encuentran en los lados opuestos de la lámina.

Las vueltas β , o vueltas invertidas, se encuentran usualmente en la superficie de las proteínas donde existen pequeñas barreras estéricas que puedan evitar un cambio en la dirección de la cadena polipeptídica. Estas estructuras abarcan cuatro aminoácidos y en ellas el oxígeno carbonilo del primer residuo está unido por un enlace de hidrógeno al hidrógeno amino del cuarto residuo, lo cual estabiliza una vuelta de 10 átomos.

La *estructura terciaria* de una proteína, la cual es única para cada una de ellas, se da a partir de las interacciones intramoleculares entre los residuos de aminoácidos. Estas interacciones pueden ser iónicas, hidrofóbicas, puentes salinos, enlaces de hidrógeno o puentes de bisulfuro. Una característica importante de la estructura terciaria es el doblamiento distante, es decir, el doblamiento en el que residuos de aminoácidos que se encuentran alejados en la estructura primaria son acercados entre ellos. La estructura terciaria de las proteínas, en especial de aquellas que tienen más de 200 residuos, frecuentemente consisten de varios dominios, *i.e.*, unidades compactas conectadas por la estructura de la cadena polipeptídica.

La *estructura cuaternaria* de una proteína se refiere al ensamble de dos o más cadenas polipeptídicas individuales las cuales se mantienen juntas por medio de interacciones no covalentes o por enlaces cruzados covalentes. Este ensamble es comúnmente referido como un oligómero y a las cadenas polipeptídicas que lo forman, se les denomina monómeros o subunidades. Los monómeros de una proteína oligomérica pueden ser

idénticos o bastante diferentes en su estructura primaria, secundaria y terciaria. No todas las proteínas tienen estructura cuaternaria.⁴

La estructura tridimensional de una variedad de proteínas es ya conocida en estos momentos y puede encontrarse en la literatura. La estructura y característica de cada una de las proteínas que se estudiaron en esta tesis, se presenta como parte introductoria a los resultados obtenidos en la medición de las fuerzas entre superficies cubiertas con ellas en los capítulos 5 y 6.

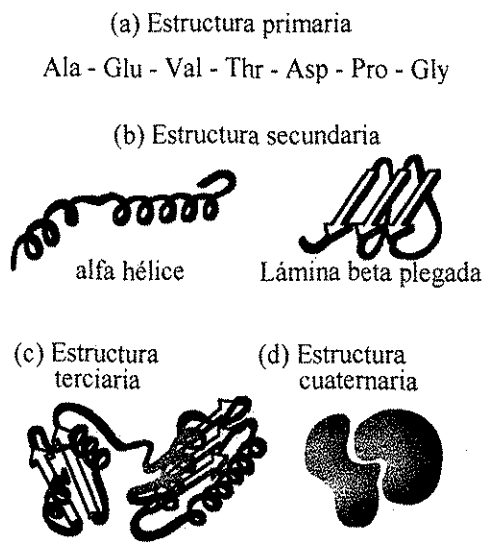


Figura 1.1. Clasificación estructural de las proteínas.

⁴ Rawn, J. D. *Biochemistry*, Patterson Publishers, North Carolina, 1989.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.2 Estabilidad estructural de una proteína.

Las proteínas se pliegan de manera espontánea en su estructura nativa tridimensional para minimizar la energía libre del sistema. Las proteínas globulares son extremadamente compactas, sus volúmenes libres, compresibilidades, y grados de libertad conformacional son comparables a los de los vidrios y polímeros cristalinos.⁵ Esto significa que existe una substancial pérdida de entropía conformacional durante el plegamiento de una proteína, la cual tiene que ser compensada por interacciones intra e inter moleculares. La estructura nativa de una proteína es marginalmente estable ($\sim 20-100 \text{ kJ/mol}$), aun bajo condiciones óptimas. La estabilidad de la estructura de una proteína ha sido revisada extensamente en otras partes,^{5,6,7} por lo que aquí solo se discutirán los aspectos más importantes.

La estabilidad de una proteína en solución es relevante tanto para su comportamiento interfacial, como para las interacciones entre las capas adsorbidas de proteínas. Aquí uno debe de hacer la distinción entre la estabilidad conformacional de la proteína y los procesos de agregación / precipitación, debidos a la reducción de la solubilidad cerca del punto isoelectrónico, a una fuerza iónica alta (salting out), o a la unión específica de iones (e.g. la formación de puentes de calcio). Aunque los dos fenómenos en muchos casos están interrelacionados, la agregación / precipitación puede ocurrir sin cambios conformacionales de la proteína.⁸

Las proteínas son marginalmente estables a temperatura ambiente debido a que existe un delicado balance entre las fuerzas electroestáticas, las fuerzas de van der Waals, los enlaces de hidrógeno, las interacciones hidrofóbicas y la entropía conformacional. Dado que las proteínas están densamente empacadas (0.74 de densidad de empaquetamiento promedio) las fuerzas de van der Waals y los enlaces de hidrógeno tienen un papel importante en la estabilización de una proteína. Como se mencionó en la sección anterior, los enlaces de hidrógeno están especialmente involucrados en la conformación y estabilidad de la estructura secundaria de una proteína.

⁵ Dill, K. A. *Biochemistry* **1990**, *29*, 7133-7155.

⁶ Privalov, P. L.; Gill, S. J. *Adv. Protein Chem.* **1988**, *39*, 191.

⁷ Ponnuswamy, P. K. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **1993**, *59*, 57.

⁸ Tanford, C. *Physical Chemistry of Macromolecules*, J. Wiley & Sons, New York, **1967**.

También, es claro que el llamado efecto hidrofóbico⁹, el cual lleva a una acumulación de residuos hidrofóbicos en el interior de una molécula de proteína, tiene un papel importante en la estabilidad de la estructura de una proteína. Sin embargo, la naturaleza de las interacciones hidrofóbicas en este contexto no está completamente entendida pues es difícil de analizarla de manera separada de las otras fuerzas que contribuyen a la estabilización de una proteína.^{5,6,7}

Las interacciones electrostáticas entre aminoácidos cargados y entre iones y/o dipolos, cuádrupolos, etc. son, debidas a la alta constante dieléctrica del agua, mas bien de corto alcance en una solución acuosa. Sin embargo, a distancias cortas, las interacciones entre los dipolos y los multipolos de mayor orden que se encuentren en el interior de la proteína, donde la constante dieléctrica puede ser significativamente menor, pueden contribuir a la estabilidad total de la estructura de la proteína. Los residuos de aminoácidos cargados generalmente se encuentran en la superficie de la proteína o cercanos a ella, y si se encuentran en la parte interior apolar usualmente forman pares iónicos. En la región isoeléctrica, donde la carga neta de la proteína es cero, atracciones entre los grupos cargados opuestos en la superficie de la proteína favorecen la formación de una estructura más compacta. Lejos de esta región, un exceso de cargas superficiales positivas o negativas provoca una repulsión electrostática entre las cadenas laterales con cargas similares, que resulta en una expansión de la estructura de la proteína. Este fenómeno de expansión se observa a ambos lados del punto isoeléctrico. A valores de *pH* extremos, la ionización de los residuos que originalmente se encontraban en el interior promueve un desdoblamiento de la estructura de la proteína.⁸

Además de estas fuerzas no covalentes, la posible existencia de enlaces por puentes de bisulfuro favorece la estabilidad de la estructura nativa de la proteína. En esta tesis, la estabilidad conformacional de las proteínas se determinó a partir de los cambios en las estructuras α hélices y las láminas β utilizando la técnica de dicroísmo circular.¹⁰

⁹ Kauzmann, W. *Adv. Protein Chem.* **1959**, 14, 1.

¹⁰ Fasman, G. D.; *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, Plenum Press, New York, **1996**.

1.3 Factores que afectan la adsorción de una proteína en una superficie.

En las últimas décadas, se han realizado un gran número de estudios sobre las interacciones entre proteínas y superficies (ver las revisiones de Claesson *et al.*,¹¹ Luckham *et al.*¹² y Leckband *et al.*¹³) y aunque se han logrado entender algunos de los principios que gobiernan la adsorción de una proteína, todavía en estos momentos no es posible predecir los procesos de adsorción aun cuando se conozcan las propiedades de la superficie y de la proteína.

Existen muchos factores que afectan la adsorción de proteínas, como son el tipo de superficie, la naturaleza de la proteína y su estabilidad conformacional, y la naturaleza del medio. Las características de una superficie sólida son, por supuesto, importantes y juegan un papel primordial, pero no necesariamente dominante, en muchas de las situaciones. En cuanto a la naturaleza de la proteína, es importante considerar que la parte exterior de una proteína tendrá, en cuanto se acerque a la interfase, las mayores interacciones con la superficie, por lo tanto, factores importantes a considerar son el área superficial (*i.e.* el tamaño de la proteína), la hidrofobicidad y distribución de carga superficiales, así como la posibilidad de que existan grupos con interacciones específicas con la superficie. Las condiciones de la solución pueden afectar de una manera importante las propiedades de una proteína, lo cual a su vez afecta su adsorción en una superficie.¹¹ Ejemplos de esto son la dependencia del punto isoeléctrico de una proteína con respecto al *pH* de la solución, y cambios en la carga neta y la distribución de la carga en una proteína debido a la influencia de las especies iónicas y el tipo de buffer presente en la solución. También, si la solución contiene especies de bajo peso molecular, *e.g.* aminoácidos o ácidos grasos, la estructura tridimensional de la proteína puede verse afectada.² Otros factores, como son la temperatura y procesos hidrodinámicos, también pueden ser de importancia en el proceso de adsorción.¹¹

¹¹ Claesson, P. M.; Blomberg, E.; Fröberg, J. C.; Nylander, T.; Arnebrant, T. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1995**, *57*, 161-227.

¹² Luckham, P. F.; Hartley, P. G. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1994**, *49*, 341-386.

¹³ Leckband, D.; Israelachvili, J. N. *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 450.

1.4 Interacciones de proteínas en una superficie sólida.

A partir de una solución acuosa las proteínas pueden adsorberse sobre diferentes tipos de superficies, y las interacciones que existen entre las proteínas y las superficies dirigen este proceso. El origen de estas interacciones depende de las propiedades de las superficies y de las proteínas.

Es posible dividir a las interacciones que intervienen en el proceso de adsorción de una proteína en una superficie, en tres diferentes clases (ver figura 1.2). La primera, son las interacciones intramoleculares en las proteínas (ver sección 1.2), que son de gran importancia para la estabilidad conformacional de estas cuando se adsorben en una superficie. La segunda, son las interacciones entre la superficie y la proteína, que controlan la cantidad adsorbida de proteína, las cinéticas de adsorción, la movilidad de la proteína en la superficie y los cambios conformacionales que puedan ocurrir con la adsorción de la proteína en la superficie. Se ha observado, de una manera general, que tanto la cantidad de proteína adsorbida como su fuerza de adhesión son mayores en una superficie hidrofóbica que en una hidrofílica.¹¹ La tercera clase, son las interacciones intermoleculares entre las proteínas, que determinan la posibilidad de formar multicapas en la superficie, la densidad de empaquetamiento y la distribución de las proteínas en la superficie.

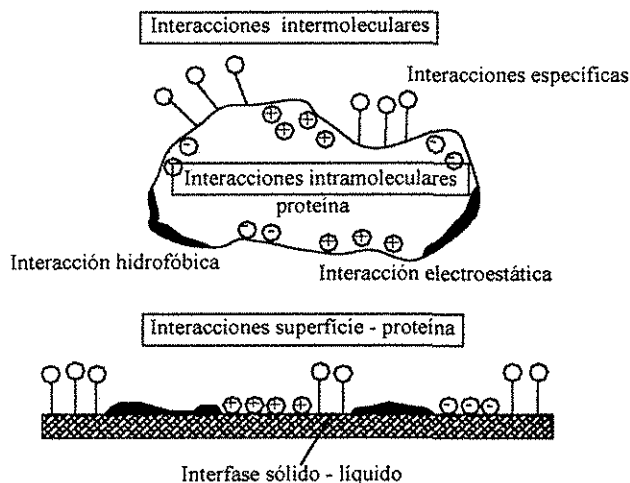


Figura 1.2. Interacciones proteína - superficie.

En general, se ha observado que las proteínas globulares se adsorben en una superficie en una cantidad que corresponde a un empaquetamiento compacto, aunque adsorciones en bicapas y multicapas también se han observado.¹¹ La superficie de las proteínas es de una naturaleza heterogénea y normalmente expone residuos de aminoácidos con cargas positivas y negativas, grupos con posibilidades de formar enlaces de hidrógeno, así como regiones no polares. Una consecuencia de esta complejidad en la superficie de una proteína es que cada proteína puede interactuar de muchas diferentes maneras con otras moléculas y superficies. Existen posibilidades de interacciones iónicas (repulsivas y atractivas), enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, fuerzas de hidratación, y, por supuesto, las siempre presentes fuerza de van der Waals. Se considera que las más importantes fuerzas que dirigen la adsorción de una proteína son las interacciones iónicas y las hidrofóbicas, combinadas con un aumento en la entropía debido a los cambios conformacionales durante la adsorción.^{14,15}

También, se ha encontrado que, en proteínas con una conformación estable, la fuerza que dirige su adsorción en una superficie hidrofílica es de origen electrostático. Por lo tanto, una proteína que tenga una carga neta del mismo signo que la de la superficie será repelida electrostáticamente. Sin embargo, se debe recordar que aunque la carga neta de la proteína sea de un signo, la proteína aun contiene cargas del signo opuesto y que, con una orientación apropiada de la molécula en la interfase, la repulsión electrostática puede ser minimizada o hasta cambiada por una atracción.¹⁶

La adsorción de proteínas en superficies hidrofóbicas esta dirigida por las interacciones que existen entre estas superficies y las áreas hidrofóbicas de las proteínas. En el caso de proteínas con una alta estabilidad conformacional se ha encontrado que estas se adsorben en superficies hidrofóbicas bajo cualquier condición de interacción electrostática. También, se ha sugerido que el hecho de que haya una mayor adsorción de

¹⁴ Norde, W. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1986**, *25*, 267-340.

¹⁵ Haynes, C. A.; Norde, W. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **1994**, *2*, 517-566.

¹⁶ Dr. Marcelo Losada.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

proteínas en superficies hidrofóbicas que en hidrofílicas se debe al hecho de que se logra remover al agua de las áreas hidrofóbicas que tiene la proteína en su superficie.¹⁷

En el caso de proteínas suaves, *i.e.*, proteínas caracterizadas por una baja estabilidad estructural, se ha encontrado que estas se adsorben tanto en superficies hidrofóbicas como hidrofílicas, bajo condiciones electrostáticas tanto repulsivas como atractivas y que durante la adsorción se producen cambios estructurales en las proteínas. Norde,^{14,15} ha discutido este tema extensamente, y sugiere que el delicado balance de fuerzas que mantiene a una proteína estable puede verse alterado en la proximidad de una interfase, lo cual provoca un desdoblamiento (reducción de la estructura terciaria y secundaria) de la proteína durante la adsorción. La mayor fuerza que desestabiliza a una proteína es la pérdida de entropía durante el plegamiento de la proteína.⁵ Esto significa que el desdoblamiento durante la adsorción es un proceso favorecido entropicamente.

Además, la exposición no favorable de los dominios hidrofóbicos a la solución acuosa, durante el desdoblamiento, puede verse reducida mediante una orientación apropiada en la interfase. De hecho, Norde plantea que la entropía ganada durante el desdoblamiento de la proteína durante la adsorción puede ser una fuerza importante que dirija la adsorción y que sobrepase las contribuciones no favorables de la deshidratación hidrofílica y la repulsión electrostática.

Por otro lado, es de interés la orientación y conformación tridimensional de las proteínas en la superficie. Dependiendo de la organización parcial de las proteínas se pueden esperar diferentes orientaciones en la superficie. En el caso de moléculas flexibles y altamente solvatadas, las cuales en solución adquieren una estructura aleatoria (random coil), en realidad solo una fracción de la molécula esta adsorbida en la superficie y la mayor parte de la molécula se extiende hacia la solución. Para el caso de proteínas que en solución adoptan una estructura regular (con α hélices y láminas β) y proteínas compactas (globulares) estas pueden adsorberse en la superficie tanto en una orientación específica como en una aleatoria.¹⁴

¹⁷ Arai, T.; Norde, W. *Colloids and Surfaces* 1990, 51, 1-15.



1.5 Medición de fuerzas en superficies con proteínas adsorbidas.

Las interacciones mencionadas en la sección anterior pueden medirse experimentalmente por medio del aparato de fuerzas de superficie (AFS)^{18,19}, el cual es en estos momentos un instrumento poderoso y ampliamente utilizado en el estudio de las interacciones entre superficies con proteínas adsorbidas o depositadas.^{11,13} En el AFS se mide la fuerza total que actúa entre dos superficies macroscópicas ($\sim 1 \text{ cm}^2$) como función de la distancia de separación entre las superficies. Además, también es posible medir el grosor de la capa adsorbida y obtener información sobre la orientación y conformación de las proteínas en las superficies. El AFS ha sido capaz de determinar las propiedades moleculares y las fuerzas ejercidas por la estructura de las proteínas.^{11,12,13}

La técnica experimental y los principios en los que se basa el funcionamiento del AFS se encuentran descritos en el capítulo tres de esta tesis. A continuación se dan algunas consideraciones experimentales en el estudio de las interacciones entre superficies con proteínas adsorbidas.

1.5.1 Orientación de las proteínas en las superficies.

En el AFS la fuerza no se mide entre moléculas individuales sino mas bien entre todas las moléculas que se encuentren en un área de decenas a cientos de μm^2 que contribuyen a la fuerza total. Por lo tanto, la fuerza total medida es una fuerza promedio y esta depende de la orientación de las moléculas. Cuando las proteínas contienen secciones con estructuras y composiciones diferentes, la fuerza que dirige la adsorción de una parte de la molécula puede ser muy diferente a la de otra parte, y entonces una orientación de la molécula dominará en la superficie. Sin embargo, para muchas proteínas lo que en realidad se espera es una distribución de orientaciones,²⁰ y la fuerza medida dependerá de esta distribución. Puede ocurrir que unas pocas moléculas tengan una orientación atípica,

¹⁸ Israelachvili, J. N.; Adams, G. E. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*, **1978**, *74*, 975-1001.

¹⁹ Parker, J. L.; Christenson, H. K.; Ninham, B. W. *Rev. Sci. Instrum.* **1989**, *60*, 3135-3138.

²⁰ Horbett, T. A.; Brash, J. L. *Proteins at Interfaces-Physicochemical and Biochemical Studies*, American Chemical Society, Washington, D. C., **1987**, *343*, 1.



extendiéndose más allá de la superficie, y entonces estas dominarán la interacción a corto alcance.

1.5.2 Cambios en las capas adsorbidas provocados por la presión.

Un problema que se ha venido observando cuando se utiliza el AFS en el estudio de proteínas en superficies es que pueden existir cambios irreversibles en las capas adsorbidas cuando se aplica una fuerte fuerza compresiva a las superficies. En estos casos, las proteínas no están ni fuerte ni débilmente unidas a las superficies y empiezan a ser empujadas hacia fuera del espacio de entre estas, a fuerzas tan grandes que las superficies empiezan a aplanarse. En estas condiciones, las moléculas que se encuentren en el extremo de la región plana pueden salir de la zona de contacto, mientras que las que se encuentran en el centro están atrapadas.²¹ Cuando las superficies son separadas de nuevo, la "masa" de proteínas que se quedó en medio de la región de contacto usualmente permanecerá ahí por largos tiempos lo que da origen a una fuerza repulsiva de largo alcance.²¹ Por lo tanto, cuando se estudian sistemas con proteínas es importante determinar que tan factible es que estos cambios puedan ocurrir en las capas adsorbidas.

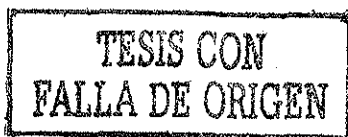
1.5.3 Cinéticas de adsorción

Desafortunadamente dado el diseño del AFS no es posible agitar continuamente la solución durante un experimento de medición de las fuerzas superficiales. Esto, mas el hecho de que las superficies se encuentran en un arreglo que deja un pequeño espacio entre ellas, da como resultado que sean necesarios largos tiempos para alcanzar el equilibrio si se considera solo la difusión de las proteínas.^{22,23} Para reducir el tiempo necesario para lograr el equilibrio es importante agitar completamente la solución cada vez que se cambian las condiciones de esta, y también es importante dejar las superficies

²¹ Blomberg, E.; Claesson, P. M.; Christenson, H. K. *J. Colloid Interface Sci.* **1990**, *138*, 291.

²² Kélicheff, P.; Ninham, B. W. *Europhys. Lett.* **1990**, *12*, 471-477.

²³ Blomberg, E.; Claesson, P. M.; Fröberg, J. C.; Tilton, R. D. *Langmuir* **1994**, *10*, 2325-2334.



alejadas durante un periodo de tiempo antes de empezar las mediciones. El tiempo que se tarde en llegar al equilibrio dependerá del procedimiento de agitación.²³ Es importante que los tiempos en los que ocurre un evento en el AFS sean siempre reportados con todos los detalles experimentales y el procedimiento con el que se obtuvieron las mediciones. También, es importante comprender que los tiempos en los que ocurre un evento en un experimento en el AFS no necesariamente serán los mismos para el caso de otro sistema en estudio, ni tampoco serán los mismos al compararlos con los obtenidos con otras técnicas diferentes.

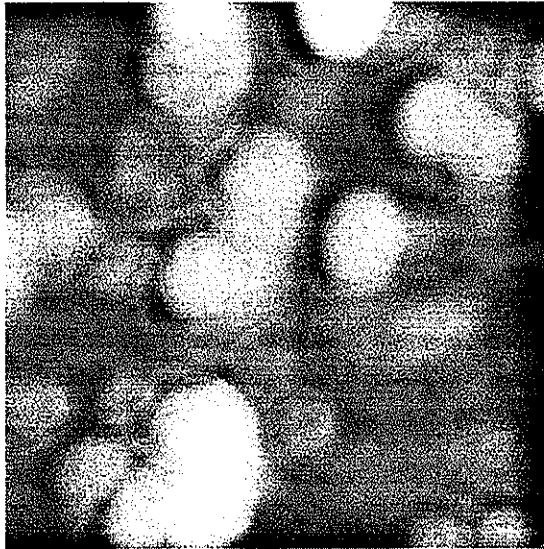


Imagen de microscopía de fuerza atómica, modo contacto intermitente, de la lipasa *Thermomyces Lanuginosa*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.- Fuerzas Superficiales.

En este capítulo se describen los diferentes tipos de fuerzas no-específicas que se pueden encontrar entre dos superficies cubiertas con proteínas, y con las cuales es posible dar una interpretación a los resultados obtenidos experimentalmente con el aparato de fuerzas de superficie. Usualmente, la fuerza que actúa entre dos superficies cubiertas con proteínas es el resultado de la combinación de dos o más diferentes tipos de interacción y, estrictamente, estas no pueden ser tratadas independientemente. Sin embargo, se puede realizar una clasificación de las fuerzas a partir de su origen para de esa manera poder utilizar ciertas aproximaciones teóricas.

Las fuerzas entre cuerpos macroscópicos a través de vacío o un medio se originan de las interacciones que existen entre las moléculas constituyentes de cada cuerpo a través de la distancia que los separa. Estas interacciones intermoleculares son, debidas a las mismas fuerzas electromagnéticas que operan entre las moléculas de un gas, un líquido o un sólido, y que determinan algunas propiedades de bulto como son el comportamiento no ideal de los gases, los puntos de ebullición y de sublimación, y la fuerza cohesiva de un sólido.

Las interacciones intermoleculares entre cuerpos macroscópicos son en gran medida determinadas por las propiedades superficiales de los cuerpos, y las fuerzas que existen entre estos cuerpos se les denomina *fuerzas superficiales*. Las fuerzas superficiales dependen de la composición superficial y de las propiedades del medio que separa a las superficies.

A continuación se describen brevemente los tipos de interacción intermolecular, así como la suma de estas interacciones que dan lugar a las fuerzas que actúan entre cuerpos macroscópicos de diferentes geometrías. Una mayor y más completa discusión de las

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

fuerzas superficiales puede encontrarse en los libros de Israelachvili¹ y de Maitland, *et. al.*²

2.1 Fuerzas de van der Waals.

Las fuerzas de van der Waals es un término genérico con el cual se describen las interacciones debidas a la presencia de dipolos permanentes que rotan libremente o dipolos inducidos y momentos multipolares de mayor orden. El origen molecular de esta fuerza se puede considerar a partir de tres diferentes tipos de interacciones:

- 1) Fuerzas orientacionales. Fuerzas de Keesom. Las cuales se deben a la interacción entre dos dipolos permanentes que rotan libremente.
- 2) Fuerzas inductivas. Fuerzas de Debye. Las cuales se deben a la interacción entre un dipolo permanente que rota libremente y un dipolo inducido.
- 3) Fuerzas de dispersión. Fuerzas de London. Las cuales se deben a la interacción entre dos dipolos inducidos.

Todas estas interacciones decaen de la misma forma (r^{-6}) en el régimen no-retardado (este régimen se explica más adelante), pero de las tres, la fuerza de dispersión es la contribución más importante a las fuerzas de van der Waals, debido a que siempre se encuentra presente y generalmente domina sobre las otras fuerzas, excepto en el caso de moléculas fuertemente polares, como el agua.

Las fuerzas de dispersión se originan a partir de correlaciones en las fluctuaciones electrónicas debidas al movimiento de los electrones cargados negativamente alrededor del núcleo atómico cargado positivamente. En un átomo o una molécula, el momento dipolar promedio en el tiempo es cero, sin embargo, en un instante dado existe un momento dipolar finito. Este momento dipolar genera un campo eléctrico que polariza a una molécula cercana y le induce un momento dipolar. La interacción resultante entre los dos dipolos da lugar a una fuerza atractiva entre las dos moléculas, cuyo promedio

¹ Israelachvili, J. N., *Intermolecular and Surface Forces*, 2ª. ed., Academic Press: London, 1991.

² Maitland, G. C., Rigby, M., Smith, E. B., Wakehaus, W. A. *Intermolecular Forces*, Claredon Press, Oxford, 1981.



temporal es finito. Un aspecto a considerar aquí es que si dos moléculas se encuentran separadas una distancia apreciable (>5 nm), la propagación del campo eléctrico entre las moléculas tomará un tiempo finito, debido a que este se propaga con la velocidad de la luz, y en este caso, ocurre que el momento dipolar de la primera molécula ya no se encontrará en fase con el momento dipolar de la segunda molécula y por lo tanto la interacción atractiva se ve reducida. A este fenómeno se le conoce como *efecto de retardación*.

La energía de interacción por dispersión, $w(r)$, entre dos diferentes moléculas o átomos, suponiendo una sola frecuencia de vibración característica de los electrones de cada molécula, fue derivada por London³ usando el modelo del oscilador y la teoría cuántica de perturbación:

$$w(r) = -\frac{3}{2} \frac{\alpha_1 \alpha_2}{(4\pi\epsilon_0)^2 r^6} \frac{h\nu_1\nu_2}{(\nu_1 + \nu_2)}, \quad (2.1)$$

donde α_i es la polarizabilidad electrónica, ϵ_0 es la constante dieléctrica del vacío, h es la constante de Planck, y ν_i es la frecuencia de la menor transición electrónica, usualmente aproximada por la frecuencia de la energía de ionización de un electrón en los orbitales exteriores.

En un medio, las interacciones por dispersión se ven significativamente disminuidas, debido a que la interacción atractiva entre dos moléculas del soluto involucra el desplazamiento y reorientación de las moléculas del disolvente más cercanas, las cuales interactúan con el soluto y con otras moléculas del disolvente. En 1965, McLachlan⁴ presentó una teoría generalizada de las interacciones de van der Waals, en donde se incluye el efecto de un disolvente y se considera el hecho de que exista más de una frecuencia de absorción en un átomo o molécula.

2.1.1 Fuerzas de van der Waals entre superficies.

Las fuerzas de van der Waals son las únicas fuerzas que siempre se encuentran entre dos tipos cualquiera de superficies, independientemente del medio a través del cual

³ London, F. *Trans. Faraday Soc.* **1937**, 33, 8-26.

⁴ McLachlan, A. D. *Discuss. Faraday Soc.* **1965**, 40, 239-245.



interactúan.¹ Las fuerzas de dispersión son en una primera aproximación aditivas, y su contribución a la energía de interacción entre dos cuerpos macroscópicos (como una partícula coloidal) pueden encontrarse mediante la suma de las interacciones por pares de todas las moléculas de un cuerpo con las moléculas del otro cuerpo.

Las fuerzas que actúan a una separación en particular dependerán de la geometría de los cuerpos que interactúan. El potencial de interacción entre dos cuerpos macroscópicos fue derivado por Hamaker⁵ para diversas geometrías de estos cuerpos. El potencial de interacción y la fuerza para el caso de dos cilindros cruzados (la geometría del Aparato de Fuerzas de Superficie) son:

$$W_c(D) = -\frac{A\sqrt{R_1R_2}}{6D} \quad \text{y} \quad (2.2)$$

$$F_c(D) = -\frac{A\sqrt{R_1R_2}}{6D^2} \quad , \quad (2.3)$$

donde A es la constante de Hamaker, R_1 y R_2 son los radios de cada cilindro y D es la distancia de separación entre las superficies. La constante de Hamaker depende de las propiedades dieléctricas de los dos cuerpos que interactúan y del medio en el que intervienen. Existen dos procedimientos para calcular esta constante, el "microscópico", derivado por Hamaker, y el "macroscópico" derivado por Lifshitz. En el acercamiento "microscópico" se suponen interacciones por pares y se suman todas las interacciones posibles entre los átomos individuales de cada cuerpo. También, se supone que la fuerza de dispersión es no retardada. Sin embargo, no se toman en cuenta las interacciones entre muchos cuerpos ni tampoco el efecto del medio entre estos.

Estos problemas pueden ser evitados utilizando el procedimiento "macroscópico", la teoría de Lifshitz,⁶ en donde la estructura atómica se desprecia y tanto los cuerpos como el medio en el que interactúan son considerados como fases continuas con ciertos índices de refracción y constantes dieléctricas. De esta manera, los efectos de la interacción entre muchos cuerpos y el efecto de retardación son automáticamente incluidos. Esta teoría es más adecuada para el estudio de las fuerzas entre cuerpos macroscópicos a través de un

⁵ Hamaker, H. C. *Physica* 1937, 4, 1058-1072.

⁶ Lifshitz, E. M. *Sov. Phys. JETP* 1956, 2, 73-83. Dzyaloshinskii, I. E.; Lifshitz, E. M.; Pitaevskii, L. P. *Adv. Phys.* 1961, 10, 165-209.

medio, sin embargo, debido a que es una teoría continua (de campo medio), no es adecuada a distancias pequeñas donde la estructura del medio se vuelve importante. La teoría original de Lifshitz requiere un amplio conocimiento de teoría de mecánica cuántica para su entendimiento, sin embargo, los resultados más importantes pueden ser obtenidos por medio de varios métodos más simples descritos por van Kampen⁷ y Ninham,⁸ entre otros.

Una ecuación aproximada para la constante de Hamaker para dos fases macroscópicas 1 y 2 que interactúan a través de un medio 3, sin considerar el efecto de retardación, es:¹

$$A \approx \frac{3}{4} kT \left(\frac{\epsilon_1 - \epsilon_3}{\epsilon_1 + \epsilon_3} \right) \left(\frac{\epsilon_2 - \epsilon_3}{\epsilon_2 + \epsilon_3} \right) + \frac{3h\nu_e}{8\sqrt{2}} \frac{(n_1^2 - n_3^2)(n_2^2 - n_3^2)}{(n_1^2 + n_3^2)^{1/2} (n_2^2 + n_3^2)^{1/2} [(n_1^2 + n_3^2)^{1/2} + (n_2^2 + n_3^2)^{1/2}]} \quad (2.4)$$

donde k es la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta, ϵ_i la constante dieléctrica estática, h es la constante de Planck, ν_e es la frecuencia principal de absorción en la región UV (usualmente alrededor de 3×10^{15} Hz y que se considera igual para los tres medios) y n_i son los índices de refracción en la región visible. Para líquidos y sólidos no conductores que interactúan en aire o vacío el valor de la constante de Hamaker se encuentra típicamente en el intervalo de $3-10 \times 10^{-20}$ J, mientras que si el medio es un líquido el valor de la constante usualmente se ve disminuida en un orden de magnitud, i.e., valores entre $0.3-1 \times 10^{-20}$ J.

De la ecuación 2.4 se puede observar que la fuerza de van der Waals entre dos cuerpos idénticos en un medio es siempre atractiva (la constante de Hamaker es positiva y la energía de interacción es negativa), mientras que la fuerza entre dos cuerpos diferentes en un medio puede ser atractiva o repulsiva (la constante de Hamaker es negativa). Además, la fuerza de van der Waals (que es siempre atractiva en aire o vacío) incrementa su magnitud con la diferencia en las propiedades dieléctricas del medio y de los cuerpos. Cuando un electrolito se encuentra en el medio, el primer término de la ecuación 2.4 se

⁷ Van Kampen, N. G.; Nijboer, B. R. A.; Schram, K. *Phys. Lett. A.* **1968**, *26*, 307.

⁸ Ninham, B. W.; Parsegian, V. A.; Weiss, G. H. *J. Stat. Phys.* **1970**, *2*, 323-328.

ve reducido debido al apantallamiento del campo electroestático, *i.e.*, debido a la polarización (desplazamiento) de las cargas libres en la solución electrolítica, mientras que el segundo término no se ve afectado.¹

2.1.2 Fuerzas de van der Waals en superficies cubierta de proteínas.

Cuando dos superficies están cubiertas por una delgada capa que tiene propiedades dieléctricas diferentes a las de la superficie, la interacción no retardada de van der Waals entre las superficies será menor a cuando no existía la capa adsorbida. En estas superficies cubiertas, la interacción de van der Waals estará dominada por las interacciones de la superficie a través del medio a distancias de separación grandes y por las interacciones de la capa adsorbida a través del medio a separaciones menores al grosor de la capa adsorbida. Esto significa que las energías de adhesión están ampliamente determinadas por las propiedades de las películas adsorbidas en la superficie aún cuando estas sean de una monocapa de espesor. Una expresión para calcular la energía de interacción de un sistema con tres capas planas fue derivada por Ninham *et al.*⁹ y es:

$$W_p(D) = -\frac{1}{12\pi} \left(\frac{A_{232}}{D^2} - \frac{2A_{123}}{(D+T)^2} + \frac{A_{121}}{2(D+2T)^2} \right) = -\frac{A_{eff}(D)}{12\pi D^2} \quad (2.5)$$

donde A_{232} es la constante de Hamaker de la capa adsorbida-solución-capa adsorbida, A_{123} es la constante de Hamaker para el sólido-capa adsorbida-solución, A_{121} es la constante de Hamaker para el sólido-capa adsorbida-sólido, A_{eff} es la constante efectiva de Hamaker, D es la distancia entre las capas adsorbidas y T es el grosor de la capa adsorbida.

En el caso de superficies cubiertas con proteínas existen dos dificultades importantes en la evaluación de las fuerzas de van der Waals. La primera, es que las propiedades dieléctricas de las proteínas dependen de la cantidad de agua que se encuentre en ellas y esto es difícil de conocer exactamente. Por lo tanto, no es posible conocer con precisión el valor de la constante de Hamaker. Además, para el caso de dos superficies cubiertas con proteínas interactuando a través de agua, la fuerza de van der Waals será más débil

⁹ Ninham, B. W.; Parsegian, V. A. *J. Chem. Phys.* 1970, 52, 4578-4587.

entre mayor agua este incorporada a la capa de proteínas. La segunda, es que la interfase capa de proteína-agua no esta bien definida en una escala molecular. Esto es debido a la forma de las proteínas y al hecho de que pueden adoptar múltiples conformaciones y orientaciones en la superficie. La indefinición de la interfase provoca que no sea posible localizar con precisión el plano para la fuerza de van der Waals, *i.e.*, $D=0$ en la ecuación 2.2. Usualmente, cuando se evalúan los datos obtenidos experimentalmente se escoge el plano de la fuerza de van der Waals como aquel localizado en la dura pared repulsiva que se observa a grandes fuerzas, *i.e.*, en la posición en donde la capa de proteína esta altamente comprimida,¹⁰ ver figura 2.1. Utilizando esta posición, Blomberg *et al.*,¹¹ encontraron para el caso de lizosima sobre mica (*i.e.* una capa con una baja compresibilidad) un valor de la constante de Hamaker proteína-agua-proteína de 0.33×10^{-20} . Este valor es menor al valor de la constante de Hamaker hidrocarburo-agua-hidrocarburo (0.5×10^{-20}), lo que sugiere que la capa de lizosima adsorbida contiene una cantidad considerable de agua.

2.2 Fuerza electrostática de doble capa.

La fuerza electrostática de doble capa se encuentran siempre presente entre superficies cargadas en soluciones electrolíticas. En una solución con una constante dieléctrica alta, como el agua, una superficie generalmente adquiere una carga superficial. Esta carga puede ser originada por la ionización o disociación de grupos superficiales, como son grupos carboxílicos o silanol, o por la adsorción en la superficie (no cargada o opuestamente cargada) de iones, debido a una mayor afinidad de los iones por la interfase que por la fase acuosa. Esta carga superficial final es balanceada por un incremento en el número de iones opuestamente cargados, los *contraiones*, en la solución vecina a la superficie. La región que contiene a las cargas superficiales y a los contraiones que se unen transitoriamente a la superficie tiene un grosor de unos cuantos angstroms, que corresponde al tamaño de los grupos cargados y los iones adsorbidos. Esta región es

¹⁰ Blomberg, E.; Claesson, P. M.; Fröberg, J. C. *Biomaterials* **1998**, *19*, 371-386.

¹¹ Blomberg, E.; Claesson, P. M.; Fröberg, J. C.; Tilton, R. D. *Langmuir* **1994**, *10*, 2325-2334.



usualmente llamada la *capa compacta o de Stern*, mientras que los iones en la solución que forman una atmósfera que compensa la carga superficial forman la *capa difusa*. Estas dos regiones forman lo que se conoce como la difusa *doble capa eléctrica*, y la frontera entre las capa compacta y la capa difusa se conoce como el *plano externo de Helmholtz*, en donde las relaciones que se dan a continuación efectivamente actúan. Para hacer predicciones sobre la interacción entre dos superficies cargadas es necesario primero determinar la distribución de cargas en la doble capa a lo largo de la normal a la superficie, y también determinar el potencial de superficie. Para un ion (en equilibrio) que se encuentra en la solución afuera de la superficie, el potencial químico μ es constante, independientemente de su localización, y este puede ser escrito como:

$$\mu = ze\psi + kT \log \rho_i \quad , \quad (2.5)$$

donde e es la magnitud de la carga eléctrica, ψ es el potencial electrostático, k es la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta y ρ_i es la densidad de iones de valencia z . A partir del requisito de equilibrio de que el potencial químico sea uniforme, la ecuación 2.5 nos da la distribución de Boltzmann de contraiones:

$$\rho_{ix} = \rho_{i\infty} \exp\left(-\frac{z_i e \Psi(x)}{kT}\right) \quad , \quad (2.6)$$

donde ρ_{ix} es la densidad del ion i en el punto x , $\rho_{i\infty}$ es la densidad del ion i en el bulto de la solución, z_i es la valencia del ion i , y $\Psi(x)$ es el potencial eléctrico promedio a la distancia x de la superficie. De la ecuación anterior es aparente que los iones de carga opuesta a la superficie se encuentran concentrados cerca de esta, mientras que los iones de la misma carga son repelidos. Además, se observa también que la distribución es fuertemente dependiente de la valencia de los iones.

Por otro lado, el potencial electrostático y la densidad de cargas libres ρ están relacionados a través de la ecuación de Poisson (que es una consecuencia inmediata de las ecuaciones de Maxwell):

$$\frac{d^2\Psi(x)}{d^2x} = -\frac{e}{\epsilon_0\epsilon_r} \sum_i z_i \rho_{ix} \quad , \quad (2.7)$$

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

donde ϵ_0 es la permitividad del vacío y ϵ_r es la permitividad relativa del medio a la frecuencia cero. Combinando la ecuación 2.6 y 2.7 nos da como resultado la ecuación de Poisson-Boltzmann para el caso de una dimensión en campo medio:

$$\frac{d^2\Psi(x)}{d^2x} = -\frac{e}{\epsilon_0\epsilon_r} \sum_i z_i \rho_{i\infty} \exp\left(-\frac{z_i e \Psi(x)}{kT}\right). \quad (2.8)$$

Si se integra dos veces la ecuación de Poisson-Boltzmann da como resultado una expresión para la variación del potencial afuera de una superficie aislada. La expresión resultante para el caso de un electrolito simétrico $z:z$, de cargas puntuales y sin correlación es:

$$\tanh\left(\frac{z_i e \Psi(x)}{kT}\right) = \tanh\left(\frac{z_i e \Psi(0)}{kT}\right) \exp(-\kappa x), \quad (2.9)$$

donde κ^{-1} es la longitud de Debye definida por:

$$\kappa^{-1} = \left(\frac{e^2}{\epsilon_0 \epsilon_r kT} \sum_i \rho_{i\infty} z_i^2 \right)^{-1/2}. \quad (2.10)$$

El grosor de la doble capa depende del fuerza iónica del electrolito, y la longitud de Debye es una medida adecuada de este grosor. De la ecuación 2.10 es claro que la longitud de Debye disminuye con el aumento de la concentración electrolítica y de la valencia de los iones, lo cual da como consecuencia un mejor apantallamiento de la carga superficial y del potencial de superficie.

2.2.1 Fuerza electrostática de doble capa entre dos superficies.

Cuando dos superficies con cargas similares se acercan una a la otra en una solución electrolítica, sus dobles capas difusas empiezan a traslaparse, lo que, en el modelo de Poisson-Boltzmann, da origen a una *fuerza repulsiva de doble capa*. Contrario a la intuición, el origen de esta fuerza repulsiva es de carácter entrópico (osmótico) no electrostático.¹ La contribución electrostática a la fuerza en la doble capa es atractiva, pero hay que tomar en cuenta que los contraiones no se encuentran en la superficie (de acuerdo a la fuerza atractiva Coulombica) sino alejados de ella, y de si mismos, debido a la presión osmótica repulsiva con la cual incrementan su entropía configuracional. Esta presión osmótica repulsiva es la que mantiene la doble capa difusa. Entonces, cuando dos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

superficies cargadas se acercan, uno obliga a los contraiones a regresar a la superficie, en contra de su estado de equilibrio, *i.e.*, en contra de la repulsión osmótica pero favoreciendo la interacción electrostática. Sin embargo, dado que la primera domina esto da como resultado que la fuerza neta sea repulsiva.

En el plano medio entre dos superficies el potencial electrostático tiene un mínimo y el campo eléctrico es cero, lo que significa que los iones en este plano no están sujetos a ninguna fuerza eléctrica. En este plano la fuerza de doble capa puede calcularse a partir de la presión osmótica, la cual es el resultado de la diferencia entre la concentración de iones entre las superficies comparada con la concentración de los iones en el bulbo de la solución:¹

$$P(D)_x = kT \left[\sum_i \rho_{pm}(D) - \sum_i \rho_{pm}(\infty) \right] \quad (2.11)$$

A bajos potenciales superficiales (menores a 25 mV) y para el caso de dos superficies planas, es posible obtener la siguiente aproximación¹ a partir de la ecuación anterior:

$$P = \frac{2\sigma_1\sigma_2}{\epsilon_r\epsilon_0} \exp^{-\kappa D} \quad (\text{por unidad de área}), \quad (2.12)$$

donde σ_i es la carga superficial de cada superficie. Integrando la ecuación anterior con respecto a la distancia, D , obtenemos la energía de interacción entre dos superficies planas, W_{dc} :

$$W_{dc} = \frac{2\sigma_1\sigma_2}{\epsilon_r\epsilon_0\kappa} \exp^{-\kappa D} \quad (\text{por unidad de área}). \quad (2.13)$$

De las ecuaciones anteriores y si se considera que la carga superficial es independiente de la distancia, se puede observar que a grandes distancias la fuerza de doble capa decae exponencialmente con respecto a la distancia que separa a las superficies que interactúan y la longitud de decaimiento es igual a la longitud de Debye. La longitud de Debye es una medida del intervalo de acción de la fuerza de doble capa. También, se puede observar que la fuerza de doble capa es siempre repulsiva entre superficies igualmente cargadas a grandes distancias, mientras que es atractiva entre superficies cargadas opuestamente. Sin embargo, si las superficies tienen signo opuesto en su carga y la magnitud de esta carga superficial no es la misma, entonces la fuerza será repulsiva a distancias cortas.

Para poder calcular la fuerza de doble capa como función de la distancia entre las superficies es necesario conocer primero el potencial en la frontera de la capa difusa. Este potencial puede calcularse resolviendo la ecuación de Poisson-Boltzmann por medio de un procedimiento numérico desarrollado por Chan *et al.*¹² En este método se utilizan dos condiciones de frontera, de carga constante, donde ningún ion se puede adsorber o desorber, y de potencial constante, donde se permiten adsorciones y desorciones en un número infinito de lugares. En la práctica, lo más seguro es que tanto el potencial como las cargas superficiales varíen conforme las superficies se acercan. Entonces, la fuerza de doble capa, en realidad, se encuentra entre estos dos límites debido a la regulación de carga (interacciones a potencial químico constante), ver figura 2.1.

La ecuación de Poisson-Boltzmann modela de una manera muy simple la doble capa electrostática, sin embargo, es una aproximación en el sentido de que no toma en cuenta las correlaciones entre iones y trata a estos como cargas puntuales. También, se considera la carga superficial distribuida (esparcida) uniformemente y se trata al medio como un continuo. Por lo tanto, no es adecuada a distancias pequeñas, donde la fuerza de doble capa puede ser más atractiva, debido a que las fuerzas de correlación entre los iones son más importantes, o más repulsiva, debido a que se vuelve importante el efecto del tamaño de los iones. Existen nuevos modelos en donde se toman en cuenta estas limitaciones y en donde al parecer los efectos de correlación de iones y el efecto de tamaño de iones tienden a cancelarse en caso de soluciones electrolíticas monovalentes.¹³ Sin embargo, para el caso de sistemas con iones con alta fuerza iónica o superficies altamente cargadas ambos efectos se vuelven importantes y vuelven al modelo de Poisson-Boltzmann inapropiado.^{14,15}

¹² Chan, D. Y. C.; Pashley, R. M.; White, L. R. *J. Colloid Interface Sci.* **1980**, *77*, 283-285.

¹³ Kjellander, R.; Marcelja, S. *J. Phys. Chem.* **1986**, *90*, 1230-1232.

¹⁴ Guldbbrand, L.; Jönsson, B.; Wennerström, H.; Linse, P. *J. Chem. Phys.* **1984**, *80*, 2221-2228.

¹⁵ Kjellander, R.; Marcelja, S. *Chem. Phys. Lett.* **1984**, *112*, 49-53.



2.2.2 Fuerza electrostática de doble capa en soluciones de proteínas.

A grandes distancias, las interacciones entre proteínas adsorbidas en superficies son generalmente dominadas por la repulsión electrostática de doble capa. La extensión de esta interacción esta dominada tanto por la magnitud del potencial en la frontera de la capa difusa, Ψ_d^∞ , como por la longitud de apantallamiento y decaimiento, κ^{-1} . La determinación de Ψ_d^∞ en soluciones de proteínas es difícil. Las principales dificultades son las siguientes. Primero, al igual que en el caso de las fuerza de van der Waals, la presencia de capas de proteínas hace imposible determinar con precisión la localización del plano de origen de la fuerza de doble capa debido a la rugosidad molecular que existe en la superficie. En la práctica, se supone que el plano de carga se encuentra a la distancia donde las fuerzas de corto alcance, debidas a la compresión de la capa de proteínas, son dominantes y en donde no es posible aplicar la ecuación de Poisson-Boltzmann (ver figura 2.1). Segundo, cuando proteínas, que son iones multivalentes de gran tamaño, se encuentran presentes en una solución electrolítica, la utilización de la ecuación de Poisson-Boltzmann no es apropiada debido a que no se toman en cuenta los efectos estericos, de imagen y de correlación de los iones, por lo que las ecuaciones anteriores deben modificarse. Sin embargo, cálculos hechos utilizando modelos teóricos más avanzados muestran que aunque estos efectos tienen una profunda influencia a separaciones de las superficies pequeñas, el decaimiento de la fuerza de doble capa aun tiene una forma exponencial a grandes separaciones.¹⁶

Los factores que afectan la fuerza ionica de las soluciones con proteínas son la concentración y la valencia de las proteínas, así como las del electrolito que se le haya añadido a la solución. La cantidad de electrolito añadido determinará la magnitud de la longitud de decaimiento si las concentraciones de este son lo suficientemente altas. En otros casos, las proteínas contribuirán significativamente a la longitud de decaimiento medida.^{17,18} Es importante mencionar que todas las preparaciones de proteínas, excepto las isoónicas, contienen iones adicionales aparte de los $-\text{OH}$ y H^+ para balancear los grupos cargados que se encuentran en estas. De ahí la importancia de llevar un control de todos los iones que vienen con una proteína, especialmente en las muestras comerciales

¹⁶ Kjellander, R.; Åkesson, T.; Jönsson, B.; Marcelja, S. *J. Chem. Phys.* **1992**, *97*, 1424.

las cuales pueden contener significativas cantidades de sales. Otro factor a considerar es el hecho de que las proteínas también pueden incorporar iones, los cuales alteran la carga total de la proteína y su influencia sobre la fuerza de doble capa. Por otro lado, las proteínas pueden asociarse en diferentes formas oligoméricas las cuales afectan el número de especies cargadas y su valencia, y por lo tanto afectan la longitud de decaimiento.

Ninham y Mitchell^{17,18} desarrollaron un modelo teórico para derivar la longitud de decaimiento, κ^{-1} , en mezclas de electrolitos simétricos y asimétricos. En este modelo se considera que la longitud de decaimiento tiene siempre una forma exponencial a grandes distancias de separación. Además, no se considera el tamaño, la forma física y la distribución de cargas en las superficies de las proteínas, sino que se les considera como cargas puntuales y la carga corresponde a la carga neta de la molécula. Estas aproximaciones se consideran adecuadas debido a que, para proteínas altamente cargadas, la distribución de la carga superficial es de poca importancia cuando el campo eléctrico se mide lejos de la superficie cubierta de proteínas y a que la introducción del tamaño finito de un ion dará lugar a un término extra de repulsión (debido a efectos estéricos), pero solo a distancias pequeñas de separación.

La expresión general para κ^{-1} en este modelo es:¹⁸

$$\kappa^{-1} = \kappa_0^{-1} \left[1 + \frac{(1000N_A)^{1/2} \ln 3}{32\pi} \left(\frac{q^2}{kT\epsilon_0\epsilon_1} \right)^{3/2} \frac{\sum_i^n c_i z_i^4 \sum_i^n c_i z_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n c_i c_j z_i^2 z_j^2 (z_j - z_i)^2}{\left(\sum_{i=1}^n c_i z_i^2 \right)^{3/2}} \right]^{-1} \quad (2.14)$$

$$\kappa_0^{-1} = \left[\frac{1000N_A q^2}{kT\epsilon_0\epsilon_1} \sum_i^n c_i z_i^2 \right]^{-1/2} \quad (2.15)$$

¹⁷ Mitchell, D. J.; Ninham, B. W. *Chem. Phys. Lett.* **1978**, *53*, 397-399.

¹⁸ Nylander, T.; Kékicheff, P.; Ninham, B. W. *J. Colloid Interface Sci.* **1994**, *164*, 136-150.

donde κ_0^{-1} es la longitud de decaimiento clásica de Debye, dada por la ecuación 2.15 en unidades del SI, N_A es el número de Avogadro, q es la carga elemental, k es la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta (K), ϵ_0 es la permitividad del vacío, ϵ_1 es la constante dieléctrica del bulto de la solución, n es el número de especies iónica, c_i es la concentración de la especie i (mol/l) y z_i es la valencia de la especie i .

Esta ecuación da valores de la longitud de decaimiento que concuerdan adecuadamente con los valores encontrados experimentalmente^{18,19} y que son substancialmente menores a los obtenidos con la fórmula para la longitud de Debye clásica, en donde se menosprecia el efecto de la presencia de iones multivalentes. Sin embargo, de las expresiones anteriores se puede observar que la influencia del segundo término en la expresión para κ^{-1} disminuye con la disminución de la asimetría de los electrolitos y entonces esta expresión se aproxima a la de la longitud clásica de Debye. Con la ecuación 2.14 y a partir del valor medido experimentalmente de la longitud de decaimiento es posible medir la carga efectiva neta de las proteínas en solución¹⁸. La cual es de gran importancia cuando se quieren estimar los efectos de las fuerzas electrostáticas, la estabilidad coloidal de dispersiones y / o la formación de geles de proteínas.

2.2.3 Teoría de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO).

La teoría de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek^{20,21} (DLVO) es la teoría clásica en el estudio de sistemas coloidales. En esta se utiliza la aproximación de Poisson-Boltzmann para calcular la fuerza repulsiva de doble capa y a la cual se le añade la fuerza atractiva de van der Waals. Los resultados obtenidos en mediciones de fuerza superficiales en soluciones electrolíticas diluidas se describen bien por esta teoría para un cierto intervalo de concentraciones y de valencias iónicas. Sin embargo, en algunos casos la teoría DLVO resulta demasiado simple y sus predicciones pueden estar sumamente

¹⁹ Kékicheff, P.; Ninham, B. W. *Europhys. Lett.* **1990**, *12*, 471-477.

²⁰ Derjaguin, B. V.; Landau, L. *Acta Physicochim. URSS* **1941**, *14*, 633-662.

²¹ Verwey, E. J. W.; Overbeek, J. Th. G. *Theory of Stability of Lyophobic Colloids*, Elsevier Ámsterdam, **1948**.

alejadas de la realidad. Además, la teoría no toma en cuenta los efectos de algunas fuerzas adicionales que ocurren entre superficies, *e.g.*, las fuerzas de solvatación, las fuerzas hidrofóbicas y las fuerzas estéricas.

En esta tesis, las curvas de fuerza obtenidas experimentalmente fueron analizadas utilizando la teoría de DLVO usando contribuciones aditivas de las fuerzas no retardadas de van der Waals y la fuerza de doble capa electrostática. Para calcular la fuerza de doble capa se utilizó el método numérico de Chan *et al.*¹² (ver apéndice 1), utilizando tanto las suposiciones de carga constante como de potencial constante.

2.3 Fuerzas de Solvatación y Estéricas (corto alcance).

Experimentos en una variedad de diferentes sistemas sugieren que existen dos tipos de fuerzas de solvatación. La primera, es bastante general y surge simplemente del tamaño finito o "geometría" de las moléculas. En la teoría de DLVO se considera al medio o disolvente líquido como un sistema continuo sin estructura y a intervalos menores a 2 nm la teoría predice una fuerza atractiva hasta el punto de contacto ($D=0$), pero si se utiliza un tratamiento más realista que tome en cuenta específicamente el tamaño finito de la moléculas del disolvente, entonces se encontrará que la fuerza que existe entre dos superficies, partículas o moléculas del soluto deberá ser oscilatoria en un intervalo de separaciones de unos cuantos diámetros moleculares.¹ Esta fuerza oscilatoria (que decae al aumentar la distancia de separación) tiene una periodicidad igual al diámetro de las moléculas del líquido y refleja su tendencia a empacarse en discretas, pero difusas, capas sobre las superficies. Este ordenamiento de corto alcance ocurre para todos los líquidos simples entre superficies planas rígidas, y no es un caso excepcional del agua o de una superficie como mica.¹ Esta fuerza oscilatoria se espera que siempre sea atractiva en contacto ($D=0$).²² Si las superficies presentan rugosidad o fluidez, *e. g.* superficies biológicas, la magnitud e intervalo de las oscilaciones se vera reducido y esta fuerza puede volverse una fuerza monotónica creciente.

El segundo tipo de fuerza es más difícil de comprender y hasta el momento no hay un entendimiento adecuado sobre su origen. Esta fuerza se caracteriza por una repulsión de

²² Christenson, H. K.; Yaminsky, V. V. *Langmuir* **1993**, *9*, 2448-2454.

corto alcance que decae monotónicamente (usualmente de manera exponencial) y que ha sido encontrada a muy pequeñas distancias de separación (~2 nm) entre superficies hidrofílicas, e.g., en mica sumergidas en soluciones con altas concentraciones de electrolito,²³ en sílica,²⁴ y en bicapas de tensoactivos y de lípidos.^{25,26} En el caso de agua o soluciones acuosas a esta fuerza se le refiere como “fuerza de hidratación”.

Para el caso de soluciones electrolíticas en mica, se ha propuesto que la fuerza repulsiva de “hidratación” no es debida al ordenamiento o estructuración de capas de agua que se propagan de la superficie, sino a que si se considera el tamaño finito de los contraiones hidratados que están adsorbidos en la superficie esto provoca un desplazamiento hacia fuera del plano de la carga superficial de unos cuantos angstroms, lo cual es suficiente para remover la adhesión de van der Waals en contacto y sustituirla por una fuerza repulsiva de corto alcance (1 o 2 nm).²⁷ Además, el tamaño finito de los iones hidratados, cuando dos superficies se acercan, provoca un aumento en el componente osmótico repulsivo de la fuerza de doble capa debido a los efectos de volumen excluido.²⁸

El caso de sílica es similar al de la mica pero las causas moleculares son diferentes, aquí se tiene que considerar que las superficies de sílica son generalmente amorfas, no son planas, y se ha encontrado que tienen una baja densidad de “filamentos” de sílica molecularmente delgados que sobresalen de la superficie.²⁹ Estos filamentos, al igual que en el caso de mica, empujan la repulsión de doble capa hacia fuera con respecto a la fuerza atractiva de van der Waals y al mismo tiempo generan una repulsión estérica de

²³ Pashley, R. M. *J. Colloid Interface Sci.* **1981**, *80*, 153-162. *J. Colloid Interface Sci.* **1981**, *83*, 531-545.

²⁴ Horn, R. G.; Smith, D. T.; Haller, W. *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *162*, 404-408.

²⁵ Parsegian, V. A.; Fuller, N.; Rand, R. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 2750-2754.

²⁶ Marra, J.; Israelachvili, J. N. *Biochemistry* **1985**, *24*, 4608-4618.

²⁷ Claesson, P. M.; Horn, R. G.; Pashley, R. M. *J. Colloid Interface Sci.* **1984**, *100*, 250-263.

²⁸ Shubin, V. E.; Kekicheff, P. *J. Colloid Interface Sci.* **1993**, *155*, 108-123.

²⁹ Iler, R. K. *The Chemistry of Silica*, Wiley, New York, **1979**.

corto alcance. Este mecanismo, propuesto por Frens y Overbeek,³⁰ explica cuantitativamente la repulsión monotónica de corto alcance y la ausencia de adhesión que se observa en sílica.

Para el caso de superficies cubiertas con moléculas anfífilas, se sabe que debido a su naturaleza fluida (dinámica) estas tienen una significativa flexibilidad y movilidad térmica. Además, también se sabe que en la interfase las moléculas se proyectan hacia fuera de esta y que las cabezas polares de estas pueden cambiar su conformación. Debido a lo anterior, Israelachvili y Wennerström³¹ han propuesto que cuando dos superficies anfífilas se aproximan una a la otra estos movimientos se ven restringidos, lo que provoca una disminución de la entropía en el sistema que da como resultado una fuerza monotónicamente repulsiva.

Todos los ejemplos anteriores muestran que estas interacciones de corto alcance son difíciles de separar en sus componentes puros de solvatación (hidratación) y estéricos, los cuales actúan juntos para dar el potencial de interacción final. Empíricamente se ha encontrado que la repulsión de solvatación/estérica entre los grupos polares de tensoactivos y lípidos decae aproximadamente de una manera exponencial con respecto a la distancia:

$$F_{\text{solv}} = C \exp^{-r/\lambda} \quad , \quad (2.16)$$

donde λ es la longitud de decaimiento de la fuerza, típicamente $0.2-0.3 \text{ nm}$ y su intervalo de acción es de $2-3 \text{ nm}$.

La superficie de las proteínas es muy heterogénea y tanto grupos polares como no polares están expuestos a la fase acuosa, por lo que uno no espera que la repulsión debida a las fuerzas de solvatación sea de largo alcance. Esto ha sido confirmado cuando se han estudiado proteínas pequeñas y compactas,^{11,32} en donde se ha observado que el intervalo de la fuerza repulsiva de corto alcance es de aproximadamente 1 nm y en donde existen

³⁰ Frens, G.; Overbeek, J. Th. G. *J. Colloid Interface Sci.* **1972**, *38*, 376-387.

³¹ Israelachvili, J. N.; Wennerström, H. *J. Phys. Chem.* **1992**, 520-531. *Nature*, **1996**, *379*, 219-225.

³² Claesson, P. M.; Blomberg, E.; Fröberg, J. C.; Nylander, T.; Arnebrant, T. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1995**, *57*, 161-227

contribuciones tanto por deshidratación como por compactación de las proteínas adsorbidas.

2.4 Fuerzas Hidrofóbicas.

Experimentalmente se ha observado la existencia de una fuerza atractiva de largo alcance entre diferentes tipos de superficies hidrofóbicas y se ha encontrado que tanto la forma, magnitud e intervalo de acción de esta fuerza cambia con las diferentes formas de preparación de las superficies y de medición de la fuerza. El origen de esta fuerza es en estos momentos un tema de gran debate y se han postulado diferentes explicaciones sobre esta.

Una buena parte del trabajo que se desarrolló en esta tesis fue dedicado a la preparación y caracterización de una superficie hidrofóbica adecuada para ser utilizada en el aparato de fuerzas de superficie y a la cual se le pudieran adsorber diferentes tipos de proteínas. En el capítulo 4 de esta tesis se da una mayor introducción al tema y se presentan los resultados obtenidos con la superficie hidrofóbica que se preparó. Estos resultados son un avance en la comprensión del problema, sin embargo, dada la complejidad de este, aun queda mucho trabajo e investigación por hacer para lograr dar una conclusión definitiva sobre las superficies hidrofóbicas y las fuerzas que existen entre ellas.

Cuando se considera la interacción entre superficies cubiertas con proteínas, y dado que estas no suelen exponer grandes regiones hidrofóbicas, no se espera que estas presenten una fuerza atractiva de largo alcance similar a la que se observa entre superficies homogéneamente hidrofóbicas. Esto ha sido confirmado experimentalmente en otras investigaciones³² como en el trabajo desarrollado en esta tesis. Sin embargo, a separaciones pequeñas entre las superficies la fuerza hidrofóbica pueden ser importante para la magnitud de la fuerza de adhesión de las proteínas a la superficie.

2.5 Fuerzas Estéricas (Tipo cepillo polimérico).

La presencia de polímeros en una superficie da lugar a nuevas fuerzas que pueden ser atractivas o repulsivas. Si se tienen dos superficies cubiertas con un polímero de larga cadena las interacciones entre las superficies no se dan directamente sino a través de los

segmentos poliméricos flexibles y móviles que se proyectan desde la superficie. Si el polímero esta firmemente unido a la superficie y el cubrimiento superficial es grande lo que se espera, cuando estas superficies se aproximen, es una repulsión estérica de largo alcance. Al acercar las superficies la densidad de segmentos del polímero entre ellas aumentará lo que resulta en un mayor número de contactos entre segmentos y una pérdida de la entropía conformacional de las cadenas poliméricas. Esta pérdida de entropía conformacional siempre resulta en una contribución repulsiva a la fuerza la cual domina a pequeñas separaciones. Sin embargo, el aumento en el número de contactos entre segmentos puede dar origen a una contribución a la fuerza tanto atractiva como repulsiva. Esta situación es usualmente discutida en términos de la "calidad" del disolvente. Si las condiciones del disolvente son suficientemente pobres, *i.e.*, cuando las interacciones de los segmentos son más favorables comparadas con las de los segmentos y el disolvente, entonces la interacción de largo alcance puede ser atractiva, mientras que de otra manera es repulsiva.

Cuando las superficies no están completamente cubiertas de polímero puede ocurrir una fuerza atractiva debida a un "puente" (bridging) entre las superficies. Esto ocurre cuando los polímeros adsorbidos en una superficie tienen segmentos que sienten una fuerza atractiva por la otra superficie. Para polímeros no cargados esto usualmente significa que el polímero debe estar unido a las dos superficies. Sin embargo, en el caso de polieléctrolitos que experimentan una fuerza atractiva electroestática de largo alcance por la superficie, es suficiente con estar cerca, pero no necesariamente unido, a ambas superficies para provocar una atracción.³³ Un caso extremo de una atracción por puente es cuando una superficie cubierta con un polímero se acerca hacia una superficie que no se encuentra cubierta de un polímero. En este caso la fuerza de largo alcance será atractiva siempre y cuando los segmentos tengan una suficiente afinidad por la superficie. Esta afinidad puede surgir de las interacciones hidrofóbicas entre los segmentos de los polímeros y la superficie, de las interacciones electroestáticas o de interacciones específicas.

³³ Åkesson, T.; Woodward, C. E.; Jönsson, B. *J. Chem. Phys.* **1989**, *91*, 2461.

Proteínas con una estructura flexible no globular y que se encuentran adsorbidas en una superficie suelen interactuar entre ellas a través de fuerzas de tipo poliméricas. Ejemplos, de ello son proteínas como la mucina,³⁴ la sulfato de proteoheparina³⁵ y la β -caseína.³⁶

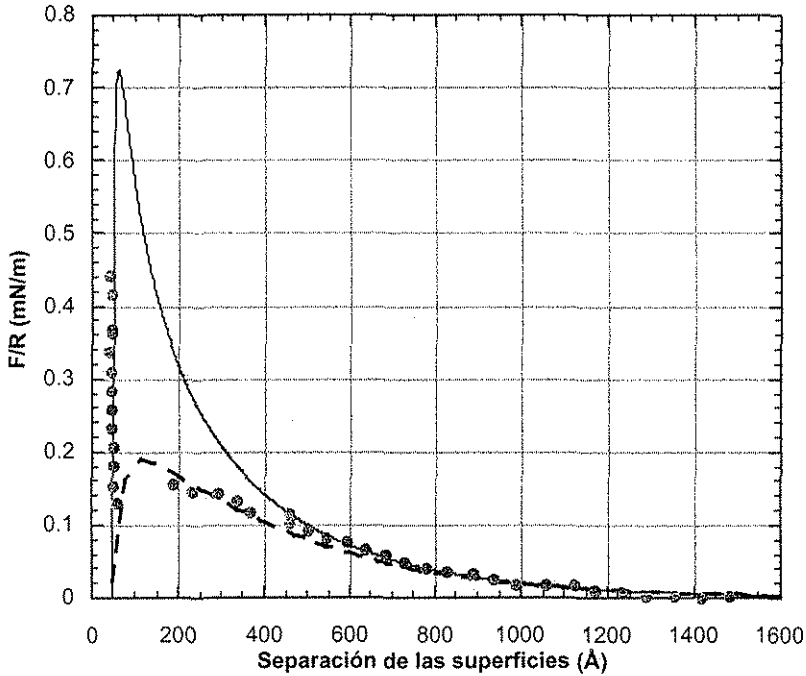


Figura 2.1. Ajuste de una curva de fuerza de acuerdo a la teoría DLVO. El origen de la fuerza se tomó a 40 Å, en donde se encuentra la capa de proteínas que da lugar a una pared repulsiva. La curva de línea continua es el ajuste de DLVO a condiciones de carga constante y la de línea punteada es el ajuste a condiciones de potencial constante.

³⁴ Malmsten, M.; Blomberg, E.; Claesson, P. M.; Carlstedt, I, Ljusegren, I. *J. Colloid Interface Sci.* **1992**, *151*, 579.

³⁵ Malmsten, M.; Claesson, P. M.; Siegel, G. *Langmuir*, **1994**, *10*, 1274-1280.

³⁶ Wahlgren, M.; Nylander, T. *Langmuir* **1997**, *13*, 6219-6225.

3.- Técnicas Experimentales.

En este capítulo se describen brevemente las diferentes técnicas experimentales que se utilizaron para realizar esta tesis. El aparato de fuerzas de superficie se utilizó para estudiar y cuantificar la fuerza existente entre dos superficies (mica) cubiertas con una monocapa hidrofóbica, proteínas o un lípido. Películas de Langmuir- Blodgett de octadeciltriétoxilano (OTE) se utilizaron para modificar a la mica y volverla hidrofóbica. El microscopio de ángulo de Brewster fue utilizado para visualizar y caracterizar a la monocapa de OTE en la interfase aire-agua. El microscopio de fuerza atómica fue utilizado para caracterizar la monocapa de OTE al depositarla en mica, así como también para visualizar la adsorción de proteínas tanto en mica como en mica hidrofóbica. Finalmente, una técnica elipsométrica fue utilizada para cuantificar la cantidad adsorbida de proteína, o de un lípido, sobre mica o mica-hidrofóbica.

3.1 El Aparato de Fuerzas de Superficie (AFS).

La medición de las fuerzas de interacción se realizaron utilizando un aparato de fuerzas de superficie (AFS), el cual es un instrumento capaz de medir de una manera precisa tanto la separación entre las superficies como su interacción. Con el AFS es posible medir la fuerza como función de la distancia, desde varios micrómetros hasta contacto molecular, tanto en medios líquidos como en vapores. También es posible medir el índice de refracción del medio, así como estudiar fenómenos en películas delgadas como son adsorción en las superficies a partir del medio, condensación capilar, fricción, viscosidad, adhesión y deformaciones superficiales debidas a las fuerzas de interacción. Por películas delgadas se entiende cualquier medio transparente como puede ser una película de un líquido, una monocapa, una membrana delgada, etc.

Las primeras versiones de un AFS fueron realizadas por Tabor y Winterton¹ y por Israelachvili y Tabor^{2,3} para medir las fuerzas de van der Waals entre superficies en aire o

¹ Tabor, D.; Winterton, R. H. S. *Proc. R. Soc. Lond. A* **1969**, *312*, 435-450.

² Israelachvili, J. N.; Tabor, D. *Proc. R. Soc. Lond. A* **1972**, *331*, 19-38.

³ Israelachvili, J. N.; Tabor, D. *Prog. Surf. Membr. Sci.* **1973**, *7*, 1-55.

vacío. Posteriormente Israelachvili y Adams⁴ construyeron el AFS Mk II, cuyas modificaciones permitieron la medición de fuerzas tanto en ambientes líquidos como en vapores. En esta tesis se utilizó un AFS modelo Mark IV desarrollado por Parker, Christenson y Ninham,⁵ el cual es una versión más avanzada y mejorada del modelo Mk II. Nuevas versiones y modificaciones han sido realizadas por Israelachvili y McGuiggan⁶ (Mk III), por Parker y Stewart^{7,8} (un AFS con un transductor piezoeléctrico, un “bimorph”, como sensor) y por Stewart⁹ (un AFS con un capacitor como sensor). Otras técnicas para medir fuerzas superficiales se pueden encontrar en una revisión de Claesson *et al.*¹⁰.

3.1.1 AFS Mk IV.

A continuación se da una descripción general del AFS Mk IV junto con algunos aspectos de una medición de las interacciones de superficie utilizando el AFS. Un esquema del aparato se encuentra en la figura 3.1.

Inicialmente las superficies a usar, generalmente mica, son parcialmente convertidas en un espejo mediante la evaporación en vacío de plata ($\sim 500 \text{ \AA}$ de espesor) sobre uno de sus lados, con el fin de desarrollar una cavidad óptica. La mica es ideal para las mediciones de fuerzas en superficies debido a que es molecularmente plana, transparente, químicamente inerte y además flexible. Después de la evaporación los pedazos de mica se pegan (con la parte plateada hacia abajo, *i.e.*, fuera de la zona de experimentación) sobre discos ópticos cilíndricos de sílice que tienen un radio de 1-2 cm. En las secciones 3.1.4 y 3.1.5 se da una mayor descripción sobre la preparación de las superficies y sobre como se pegan en los discos de sílice.

⁴ Israelachvili, J. N.; Adams, G. E. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*, **1978**, *74*, 975-1001.

⁵ Parker, J. L.; Christenson, H. K.; Ninham, B. W. *Rev. Sci. Instrum.* **1989**, *60*, 3135-3138.

⁶ Israelachvili, J. N.; McGuiggan P. M. *J. Mater. Res.* **1990**, *5*, 2223-2231.

⁷ Parker J. L. *Langmuir* **1992**, *8*, 551-556.

⁸ Stewart A. M; Parker J. L *Rev. Sci. Instrum.* **1992**, *63*, 5626.

⁹ Stewart, A. M. *Meas. Sci. Technol.* **2000**, *11*, 298-304.

¹⁰ Claesson, P. M; Ederth, T.; Bergeron, V.; Rutland, M. W. *Adv. Colloid. Interface Sci.* **1996**, *67*, 119-183.

Posterior al pegado de las superficies en los discos, estos son colocados dentro del AFS con sus ejes de manera perpendicular uno con respecto al otro, lo que da una configuración cilíndrica cruzada, ver figura 3.1. Uno de los discos de sílice, el superior, es rígidamente colocado en un cristal piezoeléctrico, y el otro, el inferior, es colocado al final de un sensible y sofisticado resorte, un resorte de doble viga volada (“en cantiliver”), que da un movimiento lineal, en la dirección vertical, de la superficie suspendida mientras el resorte se flexiona. El resorte es generalmente construido con dos vigas para minimizar las flexiones laterales.

La configuración cilíndrica cruzada tiene como ventajas el evitar los problemas de una alineación precisa y los efectos de los bordes que podrían ocurrir si se utilizaran dos superficies planas. También si el punto de contacto se llega a contaminar es posible encontrar nuevas posiciones de contacto en las mismas superficies. Para lograrlo se separan las superficies y se mueve la superficie superior primero en la dirección del eje de uno de los cilindros y después en la del otro (es decir, manteniendo la configuración cilíndrica cruzada) y de esta manera zonas previamente no investigadas pueden llevarse a contacto. El área de contacto es generalmente de 40 a 100 μm en diámetro, dependiendo del radio de curvatura de las superficies. Además, el arreglo es conveniente para comparar el experimento y la teoría, ya que la aproximación de Derjaguin puede utilizarse para relacionar la fuerza medida entre dos superficies curvadas con la energía de interacción entre dos superficies planas. En la sección 3.1.3 se explica con más detalle esta aproximación.

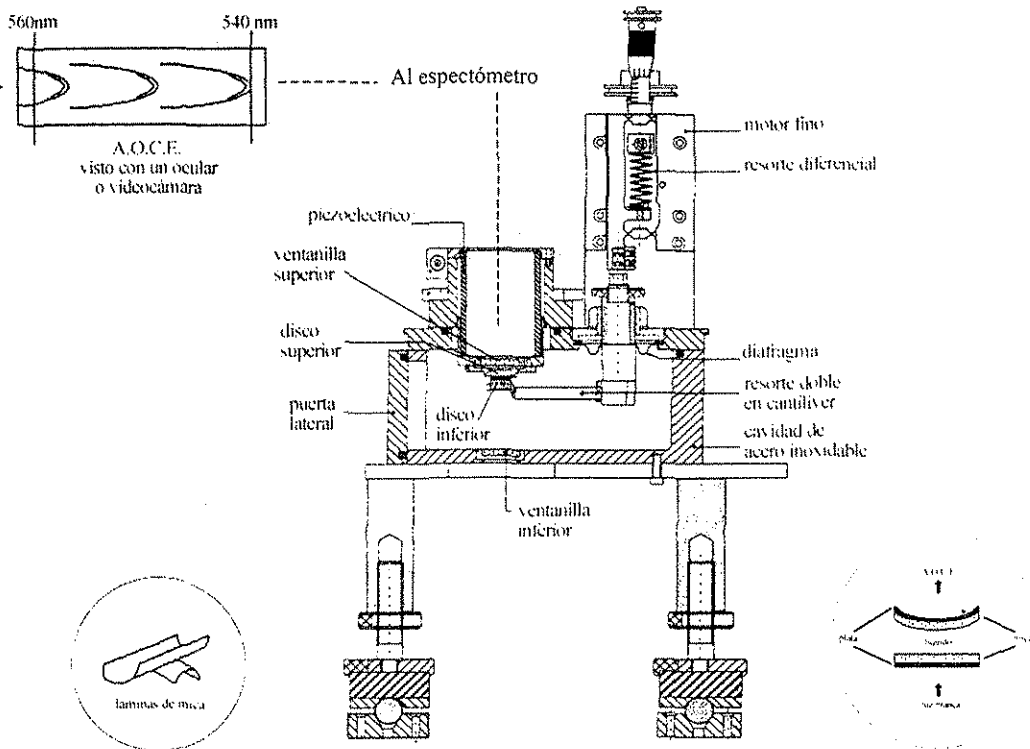
La separación entre las superficies es controlada por tres diferentes mecanismos con una precisión final cercana a 1 \AA .⁵ La superficie que se encuentra en el resorte es posible moverla hacia arriba o abajo mediante dos motores que se encuentran unidos al resorte por medio de un eje que atraviesa un diafragma. El primero, es un motor burdo unido a un micrómetro con un intervalo de movimiento de un centímetro que permite colocar a la superficies en un intervalo de separación de unos 10 nanómetros.⁵ El segundo es un motor de control medio con un intervalo de $15 \mu\text{m}$ que tiene reducido su movimiento mediante el uso de un resorte diferencial. Con este resorte diferencial se logra pasar el movimiento del eje de una micra a un nanómetro de desplazamiento de la superficie.⁵ Finalmente, un cristal piezoeléctrico es utilizado para lograr los ajustes finos en la separación de las superficies;

los cuales son del orden de un ángstrom en un intervalo de $1.2 \mu\text{m}$.⁵ El cristal piezoeléctrico tiene la forma de un tubo en cuyo extremo se coloca en el centro la superficie superior. Este cristal se expande o contrae linealmente, solo de manera vertical, al aplicar o quitar una diferencia de potencial eléctrico de manera radial a través de sus paredes cilíndricas.

La distancia entre las dos superficies es determinada interferométricamente a través de la cavidad óptica formada por las superficies, con una resolución de aproximadamente 2 \AA utilizando anillos de orden cromático equivalente (A. O. C. E. ó F. E. C. O por sus siglas en inglés) y las fuerzas son determinadas a partir de la deflexión del resorte, con una sensibilidad de 10^{-7} N . En las secciones 3.1.2 y 3.1.3 respectivamente, se explica con más detalle tanto la técnica interferométrica como el proceso para el cálculo de las fuerzas.

Las mediciones en el AFS pueden ser realizadas con las superficies sumergidas completamente en un líquido (40 y 400 ml) o a través de una gota ($\sim 0.2\text{-}0.5 \text{ ml}$) que se encuentre entre las superficies. El método de la gota es generalmente empleado cuando el líquido a usar no se tiene en cantidades suficientes o tiene un costo elevado. El aparato consta de varias puertos o entradas con los cuales es posible inyectar líquidos tanto en la cámara del aparato como entre las superficies, ingresar pequeños recipientes con sales o líquidos para controlar la presión de vapor, y también introducir nitrógeno de ultra alta pureza para secar o reducir la humedad dentro de la cámara del aparato. La temperatura del sistema debe ser controlada ($\pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$) calentando el aparato o controlando la temperatura del cuarto en el que se encuentre este.¹¹

¹¹ *Surface Force Apparatus. User's Manual*, Anuthec Pty Ltd., Canberra, Australia, 1993.



APARATO DE FUERZAS DE SUPERFICIES MARK 4

Figura 3.1. Aparato de Fuerzas de Superficies (AFS) Mk IV.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.1.2 Cálculo de la separación entre las superficies.

La distancia de separación entre las superficies puede determinarse con una alta resolución por medio del uso de interferometría de haz múltiple. La teoría original se debe a Tolansky¹² y es descrita en detalle para el caso de la técnica del AFS por Israelachvili.¹³

La capa de plata, las superficies de mica y el medio entre las superficies forman un interferómetro simétrico de tres capas. Cuando luz blanca es dirigida de manera normal a las superficies, esta atraviesa el disco de sílice inferior del AFS y al llegar al disco superior se producen múltiples reflexiones entre las capas de plata que se encuentra en la parte posterior de la micas. Solamente ciertas longitudes de onda, que interfieren constructivamente, logran pasar a través del disco superior. La luz que emerge a través de este disco es dirigida a un espectrómetro donde las diferentes longitudes de onda son separadas y aparecen como un espectro de anillos, "anillos de orden cromático equivalente", que aparecen a una longitud de onda de interferencia en particular para cada orden de anillo, n . El orden del anillo u orden de interferencia, n , es igual al número de antinodos en la onda de luz resultante formada por la interferencia constructiva de las longitudes de onda de la luz incidente. La forma de estos anillos es parabólica debido a la configuración cruzada cilíndrica en que la que se encuentran las superficies, sino fuera este el caso, se vería solo un espectro de líneas, ver figura 3.2.

La posición de los anillos en el espectro se mide utilizando una línea vertical de una retícula movable que se encuentra en el plano focal de un ocular. La longitud de onda de los anillos se determina por comparación con las líneas de emisión de una lámpara de mercurio. Si tenemos en contacto dos superficies de mica, el primer anillo de interferencia con el orden más bajo, $n = 1$, aparece a $\lambda_1^0 = 4\mu_{mica}T$, donde μ_{mica} es el índice de refracción de la mica a la longitud de onda de interferencia λ_n^0 , y T es el espesor de una de las superficies de mica en el interferómetro. El siguiente anillo ($n = 2$) aparece a una longitud de onda más corta, $\lambda_2^0 = 2\mu_{mica}T$, y el n -ésimo anillo a $\lambda_n^0 = (4/n)\mu_{mica}T$.

¹² Tolansky, S., *Multiple-beam Interferometry of Surfaces and Films*, Oxford University Press, London, 1949.

¹³ Israelachvili, J. N. *J. Colloid Interface Sci.* 1973, 44, 259-272.



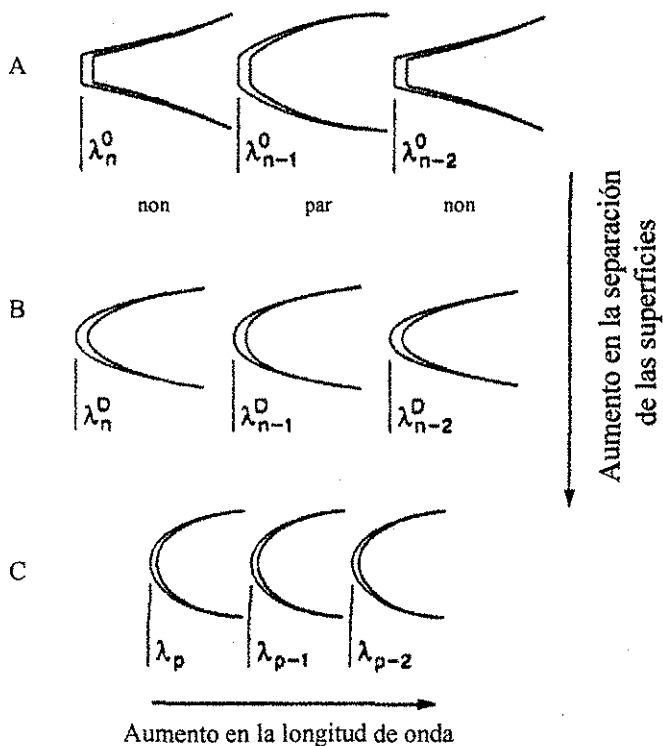


Figura 3.2. Espectro de interferencia que se obtiene entre dos superficies de mica plateadas y colocadas, una sobre la otra, en una configuración cilíndrica cruzada. A) Superficies en contacto adhesivo ($D=0$). Las superficies están aplanadas debido a la deformación de la mica y del pegamento en el que esta soportada. B) Superficies separadas a una $D \approx 200$ Å. C) Superficies separadas unos cuanto micrómetros ($p \gg n$).

Si se separan las superficies una distancia, D , los anillos de interferencia se mueven, en la dirección horizontal dentro del espectrómetro, hacia longitudes de onda mayores, λ_n^D , dado que el camino óptico dentro del interferómetro ha aumentado. El cambio en longitud de onda dependerá del índice de refracción del medio que exista entre las superficies de mica, y puede demostrarse que la nueva separación y este índice de refracción puede

calcularse simultáneamente a partir de la relación entre las longitudes de onda, λ_n^0 , en contacto $D=0$, y la nueva longitud de onda de interferencia, λ_n^D por la ecuación:¹³

$$\tan(2\pi\mu_{medio}D/\lambda_n^D) = \frac{2\mu_{mica} \operatorname{sen}[\pi(1 - \lambda_n^0/\lambda_n^D)/(1 - \lambda_n^0/\lambda_{n-1}^0)]}{(1 + \mu^2) \cos[\pi(1 - \lambda_n^0/\lambda_n^D)/(1 - \lambda_n^0/\lambda_{n-1}^0)] \pm (\mu^2 - 1)}, \quad (3.1)$$

donde el signo + se toma cuando n es impar y - cuando n es par, μ_{mica} y μ_{medio} es el índice de refracción de la mica y del medio respectivamente a λ_n^D , y $\mu = \mu_{mica}/\mu_{medio}$. Un aspecto a considerar es que en la interfase entre la plata y la mica existe un cambio de fase en la onda electromagnética que actúa incrementando la longitud del camino óptico. Para corregir esto, se puede utilizar un factor de corrección para el cambio de longitud de onda y que en el caso de mediciones alrededor de 5500 \AA es: $F_n \approx 1.024 + 1/n$.¹³

Si la distancia entre las superficies es menor a $\sim 300 \text{ \AA}$ la ecuación de arriba puede simplificarse por un desarrollo en serie. La aproximación da como resultado:¹³

$$D = \begin{cases} nF_n(\lambda_n^D - \lambda_n^0)/2\mu_{mica}, & \text{para } n \text{ impar} \\ nF_n(\lambda_n^D - \lambda_n^0)\mu_{mica}/2\mu_{medio}^2, & \text{para } n \text{ par} \end{cases} \quad (3.2)$$

La precisión de estas ecuaciones a diferentes separaciones depende de la diferencia entre el índice de refracción de la mica y del medio. Es aparente, en una primera aproximación, que los anillos par (n par) son dependientes del índice de refracción del medio que separa las superficies, mientras que los anillos non no lo son, lo que hace posible que, usando la ecuación 3.1, sea posible calcular al mismo tiempo tanto la separación de las superficies como el índice de refracción. En muchos casos el índice de refracción del medio en bulto es conocido por medio de otras técnicas, lo que facilita los cálculos, pero el método de todas maneras puede utilizarse para calcular los cambios en el índice de refracción a distancias pequeñas debido a un ordenamiento o adsorción de material en las superficies. Una ecuación aproximada para el índice de refracción a separaciones pequeñas se obtiene si combinamos las dos ecuaciones anteriores para el caso de dos anillos consecutivos, uno non, n , y uno par, $n-1$.¹³

$$\mu = \sqrt{\frac{(\lambda_{n-1}^D - \lambda_{n-1}^0)(n-1)F_{n-1}}{(\lambda_n^D - \lambda_n^0)nF_n}} \mu_{mica} \quad (3.3)$$

La diferencia en forma de los anillos non y par se puede explicar, en una primera aproximación, por la ecuaciones simplificadas anteriores. A la misma separación, D , el cambio de posición de un anillo non es proporcional a μ_{mica}/nF_n , mientras que el cambio en un anillo par es menor (si $\mu_{medio} < \mu_{mica}$) y proporcional a $\mu_{medio}^2/(n-1)F_{n-1}\mu_{mica}$. Como resultado, los anillos non aparecerán más angostos en su “punta” que los pares (ver Figura 3.2). Esta diferencia en la forma es más pronunciada conforme mayor sea la diferencia entre los índices de refracción de la mica y el medio. Cuando esta diferencia es pequeña, o la separación entre las superficies muy grande, ambos anillos parecen idénticos.

En general en las mediciones de la distancia de separación entre las superficies y los valores de longitud de onda en contacto, $D = 0$, se utiliza un anillo non. Esto debido a que la posición de los anillos non depende menos del índice de refracción, y que son más fáciles de enfocar en un fondo oscuro. Los cálculos anteriores pueden extenderse para el caso de puntos de contacto entre capas adsorbidas con índices de refracción diferente al de la mica.

La resolución en la separación de las superficies depende del grosor de la mica (generalmente 1 a 2 Å para un grosor de $\sim 2 \mu m$, ver sección 3.1.4), mientras que la resolución en la dirección radial, *i.e.*, en la dirección horizontal de las superficies, depende de la magnificación del lente del microscopio con el que se colecta y enfoca la luz que emerge del AFS, combinado con la distancia de las superficies al espectrómetro. En la mayoría de los experimentos se utiliza un lente 5x, lo que da un factor de magnificación de $f \approx 25$ veces en el ocular del espectrómetro. La magnificación puede ser medida enfocando una escala de calibración en la posición de las superficies y comparándola con la retícula que se encuentra en el ocular del espectrómetro.¹⁴

Las ecuaciones de arriba suponen que la placas del interferómetro consisten de un medio isotrópico. Sin embargo, la mica es ópticamente anisotrópica (birefrigente) y los anillos de interferencia aparecen dobles para cada orden de anillo en el espectro, dado que dos diferentes caminos ópticos para la luz de interferencia surgen de la estructura de la mica. El

¹⁴ Ruths, M., Tesis de la Universidad de California, Santa Barbara, CA, EU, 1996.

anillo que surge del menor índice de refracción de la mica se le llama β y el otro, que aparece a una longitud de onda mayor, γ .

Información importante sobre las interacciones de las superficies a través de un medio (por ejemplo, la adhesión) se pueden deducir no solo por medio de la curvas de fuerza, sino también, por la forma de los anillos de interferencia, los cuales semejan la forma actual de las superficies deformadas y el espacio que existe entre ellas.¹⁵ Deformaciones debidas al confinamiento ó flujo de material se observan comúnmente. Otro ejemplo de la aplicación de los anillos de interferencia es en el estudio de los cambios en el tiempo de la rugosidad de las superficies.¹⁶ También es posible estudiar la orientación de materiales birefringentes confinados entre las superficies al observar los efectos que tienen estos en los anillos de interferencia.¹⁷ Recientemente Heuberger, Luengo e Israelachvili¹⁸ demostraron como la interferometría de haz múltiple puede utilizarse para obtener información topográfica de las superficies en el AFS con una resolución nanométrica. También, demostraron la influencia que varios parámetros, como son el índice de refracción, el grosor y asimetría de las capas, la reflectividad del espejo de plata, y las características topográficas, tienen sobre las propiedades de los anillos en cuanto a su visibilidad, posición y forma.

3.1.3 Medición de fuerzas.

Las fuerzas son medidas como función de la distancia mientras se acercan o se separan las superficies. Como ya se comentó, en un AFS una de las superficies se encuentra montada en un soporte rígido (en un cristal piezoeléctrico), y la otra se encuentra suspendida en un sensible y sofisticado resorte. La fuerza entre las superficies es determinada por la deflexión de este resorte. La máxima deflexión durante el curso de una medición puede ser de $1-2 \mu\text{m}$.

¹⁵ Horn, R. G.; Israelachvili, J. N.; Pribac, F. J. *Colloid Interface Sci.* **1987**, *115*, 480-492.

¹⁶ Levins, J. M.; Vanderlick, T. K. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 10405-10411.

¹⁷ Rabinowitz, P. J. *Opt. Soc. Am. A* **1995**, *12*, 1593-1601.

¹⁸ Heuberger, M.; Luengo, G.; Israelachvili, J. N. *Langmuir* **1997**, *13*, 3839-3848.

La distancia entre las dos superficies se varía de una manera precisa utilizando la expansión, o contracción, del cristal piezoeléctrico provocada por un cambio en el voltaje que se le aplica a este. Durante una medición de fuerzas, inicialmente se registra el cambio en la separación de las superficies ΔD (que se mide utilizando los anillos de interferencia) con respecto al cambio en el voltaje aplicado ΔV para calibrar la distancia que se mueven las superficies en cada paso de acercamiento o separación. El movimiento del cristal piezoeléctrico es calibrado a grandes distancias de separación entre las superficies, donde no existen fuerzas. En general la calibración se realiza entre los $2000-3000 \text{ \AA}$, aunque lo anterior puede cambiar dependiendo del sistema ya que algunas veces, como es el caso de polímeros, es necesario realizar la calibración a más de 5000 \AA . Durante el procedimiento de calibración, se supone que la expansión del cristal piezoeléctrico es lineal con respecto al cambio del voltaje aplicado.

Al acercar las superficies en pasos calibrados, $\Delta D_{\text{calibrado}}$, cualquier desviación de esta calibración, ΔD_{medido} , indica una deflexión del resorte y por lo tanto que una fuerza repulsiva o atractiva se encuentra actuando entre las superficies a esa distancia en particular, ver figura 3.3. Si la constante del resorte es conocida la diferencia entre las fuerzas entre el punto inicial y final puede calcularse usando la ley de Hooke:

$$\Delta F = k (\Delta D_{\text{calibrado}} - \Delta D_{\text{medido}}) \quad (3.4)$$

La sensibilidad en la medición de las fuerzas, que depende de la constante del resorte y de la precisión en la medición de la distancia, es del orden de $F = 10^{-7} \text{ N}$ en los experimentos realizados en esta tesis. Esta constante se mide al finalizar cada experimento colocando pequeñas pesas sobre la superficie en el resorte y midiendo la deflexión por medio de un microscopio.

Para lograr comparar los resultados de diferentes experimentos (o de diferentes puntos de contacto entre las mismas superficies) la fuerza medida se normaliza por el radio de curvatura de las superficies en contacto. La geometría de dos cilindros cruzados cercanos a contacto corresponde geoméricamente a la de una esfera cercana a una superficie plana.

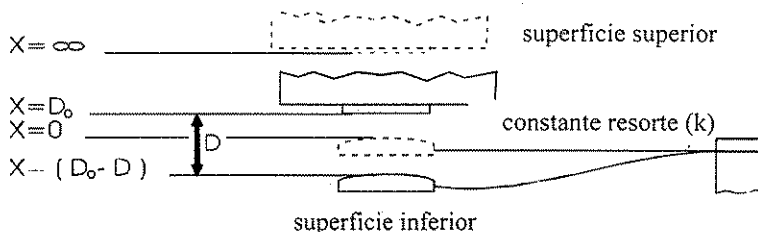


Figura 3.3. Si la superficie superior se mueve hacia la de abajo hasta $x = D_0$ provoca que la superficie inferior, si existe una fuerza, se mueva hacia $x = D_0 - D$, i.e., la deflexión del resorte es $(D - D_0)$.

En la práctica, uno mide el radio en dos direcciones perpendiculares, R_1 y R_2 , para tomar en cuenta cualquier elipticidad de la zona de contacto, y se utiliza el promedio geométrico $R = (R_1 R_2)^{1/2}$ para normalizar la fuerza medida. El radio, en cada dirección, se obtiene fácilmente a través de la forma de los anillos de interferencia cuando las superficies están cercanas a contacto y es:

$$R_n = \frac{(x/f)^2}{8\Delta D} \quad (3.5)$$

donde x es el ancho de un anillo, el que se utiliza para medir la fuerza, a una distancia ΔD a partir de la punta de este anillo y f es la magnificación del sistema óptico (ver Figura 3.4). Para cambiar la dirección y medir el radio en la dirección perpendicular, se introduce un prisma que cambia el haz de luz colectado del AFS en 90° antes de ser transmitido al espectrómetro.

Como se mencionó antes, la fuerza normalizada experimentalmente obtenida entre dos superficies curvas como función de la distancia de separación, $F_c(D)/R$, puede ser directamente relacionada con la energía de interacción entre dos superficies planas, $W_p(D)$ (la cual es usualmente más fácil de derivar teóricamente), si aplicamos la aproximación de Derjaguin.^{19,20} En esta aproximación, se considera que cuando el intervalo de interacción entre dos cuerpos curvados es tal que los dos cuerpos no interactúan significativamente hasta que la distancia de máximo acercamiento es muy pequeña comparada con el radio de

¹⁹ Derjaguin, B. V. *Kolloid Z.* **1934**, *69*, 155-164.

²⁰ White, L. R. *J. Colloid Interface Sci.* **1983**, *95*, 286-288.



curvatura de los cuerpos, entonces la energía de interacción entre estos cuerpos curvados puede obtenerse de la correspondiente energía de interacción por unidad de área de dos superficies planas paralelas.

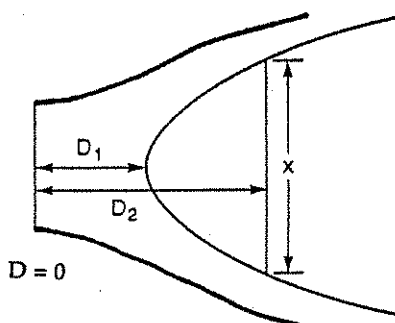


Figura 3.4. Medición del radio de curvatura de las superficies a partir de los anillos de interferencia.

Para el caso de dos superficies cilíndricas cruzadas perpendicularmente (que es equivalente a una esfera cercana a una superficie plana), utilizando la aproximación Derjaguin y de acuerdo a la definición de fuerza ejercida de un cuerpo a otro, se obtiene:

$$\frac{F_c(D)}{R} = 2\pi W_p(D) \quad (3.6)$$

La aproximación es válida para cualquier tipo de energía de interacción, siempre y cuando, como se mencionó antes, el intervalo de interacción y la separación de las superficies sean mucho más pequeños que el radio de curvatura de las superficies. Esta condición se cumple en el AFS pues el radio de los discos cilíndricos de sílice es de aproximadamente 2 cm y el intervalo de interacción, en general, es menor a 100 nm. Sin embargo, Parker y Attard,²¹ demostraron que cuando las fuerzas que se ejercen sobre las

²¹ Parker, J. L.; Attard, P. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 10398-10405.

superficies provocan grandes deformaciones en estas, no es apropiado utilizar la aproximación de Derjaguin dado que en esta se considera al radio de curvatura sin deformaciones. Para el caso de superficies de mica soportadas en pegamento estas deformaciones se pueden ver fácilmente para valores de $F_c(D)/R$ que exceden aproximadamente 10 mN/m (basado en un radio de curvatura sin deformaciones), estos valores de fuerza nunca fueron excedidos en los experimentos realizados en esta tesis.

En una curva de fuerza, que describa la interacción entre las superficies, pueden existir regiones donde la derivada de la fuerza con respecto a la distancia sea mayor que la constante del resorte. Estas regiones son inaccesibles para la técnica que describimos, y en una distancia de separación de las superficies donde $\partial F(D)/\partial D > k$ existirá una inestabilidad mecánica donde la superficie montada en el resorte brincará hacia o de la otra superficie a la siguiente región estable, al acercar o separar respectivamente las superficies. Un resorte más débil, con una constante más baja, da una mayor sensibilidad al medir fuerzas, pero a expensas de mayores regiones “inaccesibles”. Mediciones más precisas dentro de estas regiones se pueden lograr cambiando la constante del resorte, de tal manera que la inestabilidad ocurra en otro punto a lo largo de la curva de fuerza. Un accesorio del AFS es un resorte con constante variable, en éste su rigidez puede ser convenientemente cambiada en varios ordenes de magnitud durante un experimento al mover una abrazadera que se encuentra a la lo largo de un resorte débil (esto sin la necesidad de abrir el instrumento). Para mediciones de fuerzas en aire y en líquidos con baja viscosidad, la constante del resorte usualmente se escoge en el intervalo de $50 - 200 \text{ N/m}$.

Cuando las superficies se encuentran en contacto adhesivo, es posible calcular la fuerza de adhesión, $F(0)$, normalizada por el radio de curvatura, R , separando las superficies. La fuerza requerida para separar las superficies se calcula por medio de la siguiente ecuación:

$$\frac{F(0)}{R} = kD_j + \frac{F(D_j)}{R} \quad (3.7)$$

donde k es la constante del resorte y $F(D_j)$ es la fuerza a la distancia D_j a la cual las superficies brincaron al separarlas.

Los principales errores en la medición de fuerzas con el AFS surgen principalmente de la deriva ("drift") instrumental, que evita que las superficies se mantengan a una distancia en equilibrio durante una medición, de la determinación de la constante del resorte y de la determinación del radio de curvatura.²²

3.1.4 Preparación de las superficies de mica.

El sustrato más utilizado en la medición de fuerzas superficiales es mica (mica muscovita). Otros sustratos que se han utilizado son sílica,^{23,24,25} alumina²⁶ o nitruro de silicio²⁷ y algunos metales como plata,²⁸ platino²⁹ y oro.^{30,31} En esta tesis se usó como sustrato mica.

²² Zäch, M.; Heuberger M. *Langmuir* **2000**, *16*, 7309-7314.

²³ Horn, R. G.; Smith, D. T.; Haller, W. *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *162*, 404-408. Grabbe, A.; Horn, R. G. *J. Colloid Interface Sci.* **1993**, *157*, 375-383.

²⁴ Vigil, G.; Xu, Z.; Steinberg, S.; Israelachvili, J. N. *J. Colloid Interface Sci.* **1994**, *165*, 367-385.

²⁵ Ruths, M.; Johannsmann, D.; Rühle, J.; Knoll, W. *Macromolecules* **2000**, *33*, 3860-3870.

²⁶ Berman, A.; Steinberg, S.; Campbell, S.; Ullman, A.; Israelachvili, J. N. *Tribol. Lett.* **1998**, *4*, 43-48. Horn, R. G.; Clarke, D. R.; Clarkson, M. T.; *J. Mater. Res.* **1988**, *3*, 413-416.

²⁷ Golan, Y.; Alcantar N. A.; Kuhl, T. L.; Israelachvili, J. N. *Langmuir* **2000**, *16*, 6955-6960.

²⁸ Parker, J. L.; Christenson, H. K. *J. Chem. Phys.* **1988**, *88*, 8013-8014.

²⁹ Smith, C. P.; Maeda, M.; Atanasoska, L.; White, H. S.; McClure, D. J. *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 199-205.

³⁰ Levins, J. M.; Vanderlick, T. K. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 5067-5076; *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *185*, 449-458. Knarr, R. F.; Quon, R. A.; Vanderlick, T. K. *Langmuir* **1998**, *14*, 6414-6418.

³¹ Ruths, M.; Heuberger, M.; Scheumann, V.; Hu, J.; Knoll, W. *Langmuir* **2001**, *17*, 6213-6219.

La mica es un mineral natural transparente, ópticamente anisotrópico (birefringente), formado por capas de aluminosilicato que se mantienen juntas por enlaces iónicos a una capa de átomos de potasio, su fórmula idealizada es $KAl_2(AlSi_3)O_{10}(OH)_2$. La estructura se encuentra esquematizada en la figura 3.5 y una imagen real de la estructura atómica superficial de la mica se puede ver en la figura 3.6.

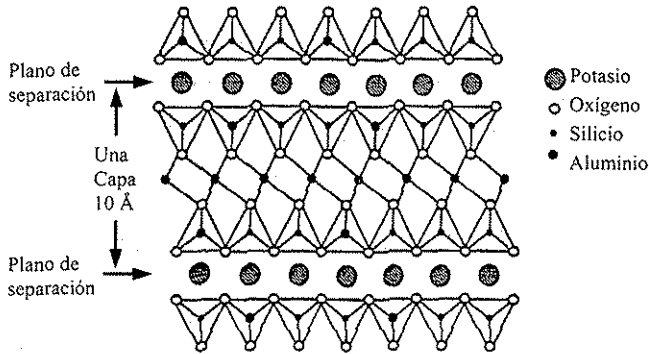


Figura 3.5. Estructura cristalina de mica muscovita. Nótese que no se muestran los átomos de hidrógeno.

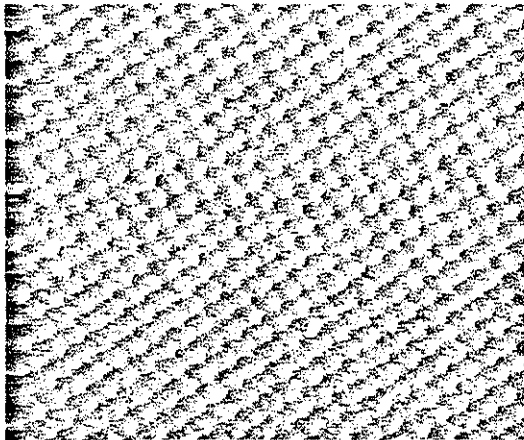


Figura 3.6. Una imagen de alta resolución de MFA de mica muscovita. Las partes oscuras son la cavidades hexagonales en el plano basal. La profundidad de una cavidad es 0.17 nm con los grupos hidroxil directamente debajo de cada brecha. La distancia entre pico y pico es de aproximadamente 5.1 \AA .

Los índices de refracción de la mica de color roja o café son:

$$\mu_p = 1.5794 + 4.76 \times 10^5 / \lambda^2 (\text{\AA}^2) \text{ y } \mu_y = 1.5846 + 4.76 \times 10^5 / \lambda^2 (\text{\AA}^2).$$

Para la mica de color verde sus índices de refracción son:

$$\mu_p = 1.5907 + 4.76 \times 10^5 / \lambda^2 (\text{\AA}^2) \text{ y } \mu_y = 1.5953 + 4.76 \times 10^5 / \lambda^2 (\text{\AA}^2).$$

La mica consiste de capas de aproximadamente 10 \AA , cada capa es esencialmente dos láminas de silicatos unidas por átomos de aluminio. La sustitución isomórfica de aluminio por silicio en las laminas del silicato da como resultado una carga negativa cada 48 \AA^2 , lo que corresponde a 2.1×10^{14} cargas por cm^2 . Sin embargo, esta carga es neutralizada por iones de potasio (y en menor medida de sodio) que se encuentran entre las capas de aluminosilicato. Dado que la interacción entre los átomos de potasio y los de oxígeno es más débil que los enlaces entre las capas de aluminosilicato el cizallamiento, o separación de las capas, se da a lo largo del plano basal de los átomos de potasio. Es debido a esta condición que la mica puede cizallarse a través de este plano basal y formar superficies molecularmente planas.³²

Si al separar una capa de mica esta se sumerge en agua, los iones potasio que se encuentran uniformemente distribuidos en la superficie se disocian, con lo que la superficie de mica adquiere una carga negativa. Si todos los iones potasio se disocian entonces se obtiene una carga negativa cada 48 \AA^2 . En una solución salina la carga superficial es ordenes de magnitud menor debido a que protones y cationes presentes en la solución se adsorben en la superficie y de esta manera disminuyen la carga neta.³²

La mica es ideal como substrato para la medición de fuerzas superficiales debido a que puede ser cizallada en delgadas laminas molecularmente planas y con un espesor uniforme ($1-3 \mu\text{m}$) en un área de varios centímetros cuadrados. Si se observan estas láminas a través de luz blanca aparecen colores debido a la interferencia de la luz y la intensidad de los colores aumenta conforme se disminuye el espesor de las láminas. Esta propiedad es usada para determinar visualmente el espesor y uniformidad de las láminas de mica.

La mica también tiene la ventaja de que no se dilata en la presencia de agua u otros líquidos, es químicamente inerte (aunque esto puede ser una desventaja pues limita las posibilidades de modificar la superficie) y es flexible. Todo esto, junto con el hecho de

³² Claesson, P. M., Tesis del Instituto Real de Tecnología, Estocolmo, Suecia, 1986.

lograr superficies molecularmente planas, son condiciones necesarias para una superficie que se pretenda usar en una medición de fuerzas superficiales.³³

La preparación de las superficies de mica comienza con la separación, cizallamiento, de láminas delgadas a partir de la orilla de grandes y gruesas láminas o bloques de mica; utilizando pinzas con puntas muy finas o una aguja. El grosor de la mica se puede estimar de la flexibilidad y los colores de interferencia de la lámina separada. Cuando se logra obtener una lámina lo suficientemente grande ($> 5 \text{ cm}^2$) y del espesor adecuado, esta se corta en pequeños pedazos rectangulares mediante un alambre caliente de platino. Los pedazos cortados son inmediatamente colocados sobre una lámina de mica recién separada de otro pedazo grueso, es decir, una lámina soporte. Estos pedazos se adhieren a la lámina soporte debido a las fuerzas atractivas de van der Waals, excepto en los bordes donde la mica fue fundida debido al alambre caliente de platino pero esto es en nuestro favor pues de ahí es posible volver a separarlas de la lámina soporte. Las piezas que no se llegan a pegar bien generalmente se debe a que están contaminadas, posiblemente por polvo, vapores, platino, etc., y deben ser descartadas. Recientemente se ha encontrado que pequeños pedazos de mica fundida son expulsados del alambre de platino durante el corte y se quedan depositados en la mica. En el caso de mediciones de fuerzas en medios acuosos parece ser que estos no afectan las mediciones, pero si cuando se miden fenómenos capilares.³⁴

La limpieza durante toda la operación es muy importante, pues cualquier fuente de contaminación puede afectar los experimentos que se realicen. Tanto la separación, como el manejo de la mica deben realizarse de preferencia en un cuarto limpio, en una mesa de flujo laminar horizontal, usando guantes (libres de polvo o talco) y una máscara para proteger a la mica de contaminación "humana". También es recomendable, por cuestiones de salud, evitar la inhalación del polvo y los pequeños pedazos que se producen durante la separación de la mica.

Una vez que se han colocado los pequeños pedazos de mica en la lámina soporte se le deposita una capa de plata ($\sim 500\text{--}550 \text{ \AA}$) por medio de una evaporación en vacío ($\sim 10^{-6} \text{ atm}$) a una razón de $1\text{--}2 \text{ \AA/s}$ para dar una reflectividad de aproximadamente 98–99%. Una

³³ Blomberg, E., Tesis del Instituto Real de Tecnología, Estocolmo, Suecia, 1993.

³⁴ Ohnishi, O.; Hato, M.; Tamada, K.; Christenson, H. K. *Langmuir* 1999, 15, 3312-3316.

capa más gruesa produce anillos más nítidos pero a costa de una disminución en la intensidad en el brillo. La lámina soporte que ha sido plateada debe conservarse en un desecador al vacío para evitar su contaminación y lograr conservarla hasta su posterior uso.

Para el caso de una medición de fuerzas, lo ideal es lograr que los pedazos de mica sean lo más delgado posible, pues esto da la mejor resolución en cuanto a distancia en el interferómetro, pero, en la práctica es muy difícil manejar estos pedazos durante el pegado en los discos de sílice. En general un grosor de $1-2 \mu\text{m}$ es óptimo y da una resolución en distancia de $1-2 \text{ \AA}$. Para el caso de mediciones de fricción, es necesaria una mica más robusta y micas de $3-4 \mu\text{m}$ pueden ser usadas, especialmente si las fuerzas en el sistema a estudiar ya han sido medidas anteriormente con una mica delgada.

Algo importante a considerar con la mica es que es un material anisotrópico y la orientación y alineación de las direcciones cristalográficas de los pedazos pueden afectar el orden del material en el medio a estudiar y, por lo tanto, afectar los resultados experimentales. Para evitar esto, McGuiggan e Israelachvili³⁵ encontraron un procedimiento para siempre lograr que dos pedazos de mica estén siempre alineados dentro del AFS independientemente de cómo estén sus ejes en la lámina original de mica. Por cada pedazo rectangular de mica que se corte de la lámina delgada y se coloque en la lámina soporte, se corta otro con su eje largo perpendicular con respecto al cortado anteriormente y se voltea con respecto al anterior antes de colocarlo en la lámina soporte de mica. Posteriormente, se platean los pedazos de mica y se pegan con sus ejes largos sobre el eje de los discos de sílice, con lo que estos dos pedazos estarán perfectamente alineados, con la misma estructura que en el cristal sólido, si sus bordes de corte están alineados, ver figura 3.7.

En algunos experimentos, como son adsorciones de monocapas amorfas o depósitos gruesos de polímeros, las fuerzas medidas a separaciones pequeñas no dependen de las interacciones de van der Waals de la mica, ni de su estructura cristalográfica. En estos casos la orientación y alineación de los ejes cristalográficos no es tan importante, sin embargo, es más fácil lograr ajustar la óptica del sistema para obtener anillos mejor definidos y en foco si la birefringencia es maximizada o minimizada.

³⁵ McGuiggan, P. M.; Israelachvili, J. N. *J. Mater. Res.* **1990**, *5*, 2232-2243.

3.1.5 Pegado de las superficies en los discos de sílice.

Las superficies de mica, u otro substrato en su caso, que forman el interferómetro en el AFS son pegadas a discos ópticos cilíndricos de sílice con un radio de curvatura de $1-2\text{ cm}$. Un radio pequeño de curvatura da un radio de contacto pequeño entre los dos discos, lo cual es deseable en algunos experimentos (por ejemplo en medios viscosos o cuando se quiere aplicar grandes presiones), mientras que un radio de curvatura grande, es decir una mayor región de interacción, da como consecuencia fuerzas más fuertes y más fácilmente medibles.

Es muy importante considerar la elasticidad del pegamento así como la cantidad que se aplica en los discos de sílice, ya que esto afecta el radio de curvatura de la superficie creada y por lo tanto el tamaño de la posición de contacto entre las superficies. También, la elasticidad del pegamento afecta las deformaciones de las superficies provocadas por fuertes fuerzas adhesivas o por presión. El radio de curvatura también se ve afectado por la flexibilidad de la mica que se pega en los discos, de tal manera que entre más gruesa sea la mica mayor será el radio.

El pegamento más comúnmente usado en el caso de experimentos en soluciones acuosas o con polímeros inertes es el Epon 1004 (Shell), el cual es una resina epóxica termoestable transparente derivada del bisfenol-A y de la epiclorohidrina. Su temperatura de fusión es de $90-100\text{ }^{\circ}\text{C}$. El proceso de pegado comienza colocando algunos pedazos de este pegamento sobre los discos de sílice calientes y mientras este se funde se esparce, con una pinzas de punta curvadas, sobre los discos de una manera homogénea. El exceso de pegamento se elimina y se procura dejar una pequeña y suave capa de pegamento. Usualmente durante este proceso se forman pequeñas burbujas las cuales es necesario eliminar. Para lograr esto, y además uniformizar la capa de pegamento, los discos se colocan en un horno con vacío a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por unos 30 minutos. Posteriormente, los discos se mantienen calientes para que el pegamento esté fundido y entonces se coloca un pedazo de mica con su parte plateada sobre el pegamento y se deja que por si misma se adhiera sobre este. Inmediatamente después se retiran de la plataforma de calentamiento, para evitar que se oxide la capa de plata por exceso de calentamiento. Existen otros pegamentos epóxicos con temperaturas de fusión más bajas (Epon 1002) o altas (Epon 1007 y 1009) comparados con el Epon 1004. Estos pegamentos epóxicos se disuelven muy fácilmente en varios disolventes orgánicos,

especialmente en acetona y cloroformo, los cuales pueden ser utilizados para limpiar los discos de sílice y las pinzas después de que fueron utilizados.

Para experimentos en el AFS con disolventes orgánicos, es necesario usar otros adhesivos. En estos casos es posible utilizar una mezcla de dextrosa y galactosa. La ventaja de utilizar una mezcla de azúcares es que son menos susceptibles a cristalizar que un material puro. Para experimentos con disolventes no polares y no aromáticos, es posible pegar las superficies con 1,5-difenilcarbazido, el cual tiene un punto de fusión entre 175-177 °C. La ventaja de este compuesto radica en que, cuando está fundido, es más fácil de esparcir de manera homogénea que el caso de los pegamentos epóxicos. Sin embargo, es ligeramente soluble en agua.¹⁴

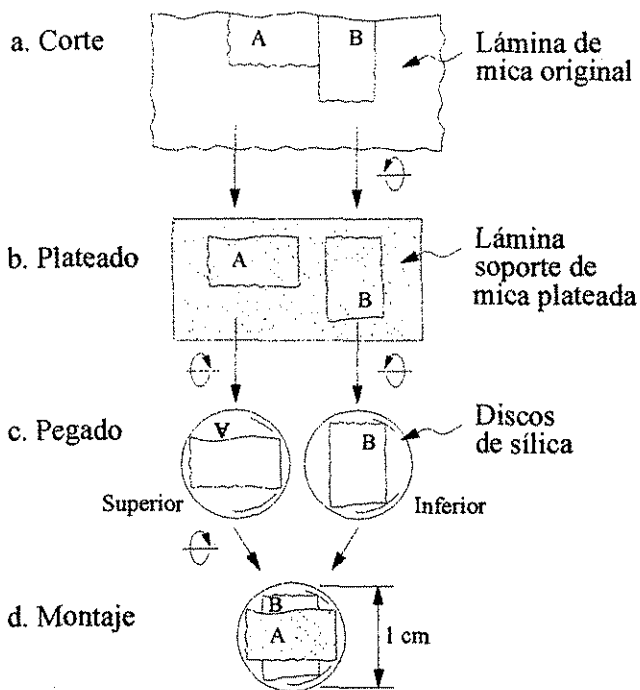


Figura 3.7. Procedimiento de corte y pegado que se utiliza con la mica para lograr mantener la dirección cristalográfica original. Adaptada de McGuiggan e Israelachvili.³⁵

3.2 Películas de Langmuir y Películas de Langmuir-Blodgett.

3.2.1 Películas de Langmuir.

Las películas de Langmuir son capas monomoleculares de moléculas tensoactivas que se encuentran en la interfase de dos distintas fases. Las dos fases pueden ser dos líquidos inmiscibles, como agua y hexano, pero son más comunes en sistemas gas-líquido como es aire y agua. Los tensoactivos son moléculas anfifílicas, es decir, moléculas que están compuestas por una parte hidrofílica, como un grupo hidroxil o carboxil, y una parte hidrofóbica, típicamente una cadena de hidrocarburos. Cuando una molécula anfifílica se disuelve en un disolvente y se esparce en la superficie de un líquido polar, como agua, el disolvente se evapora dejando a estas moléculas orientadas en la interfase aire-agua; las “cabezas” hidrofílicas orientadas hacia el bulto de agua y las “colas” hidrofóbicas hacia el aire. Sin embargo, una monocapa superficial solo se producirá si existe un balance entre las partes hidrofílicas e hidrofóbicas de la molécula: si la parte hidrofóbica es muy pequeña, la molécula se disolverá en el agua; si la cabeza es insuficientemente hidrofílica, las moléculas formaran multicapas en la superficie o hasta pueden evaporarse.

Como se explicó anteriormente, la molécula anfifílica que formara la película, o monocapa, de Langmuir, se disuelve en un disolvente adecuado y se esparce sobre una superficie limpia de agua (o una solución acuosa) que se encuentra en una palangana de Langmuir.³⁶ La palangana de Langmuir es un recipiente con una superficie de poli-tetra-fluoroetano (PTFE) de aproximadamente 5 mm de profundidad (excepto en donde se realiza los depósitos de LB que es de aproximadamente 65 mm), el volumen de agua que ocupa la palangana varía pues existen diferentes modelos, ver figura 3.8.

El disolvente que se utiliza para esparcir a las moléculas anfifílicas debe cumplir ciertos criterios como es que sea de baja solubilidad en agua, que sea inerte para las moléculas que formaran la monocapa y que el tiempo que tarde en evaporarse sea relativamente corto después de esparcirse. Algunos disolventes que se suelen utilizar son hexano, ciclohexano (con solubilidades < 0.1 g/1000 g H₂O), tolueno (1.5 g/1000 g H₂O) y cloroformo (8 g/1000 g H₂O). En algunos casos se utiliza pequeñas porciones de un co-disolvente, por ejemplo etanol, para lograr disolver la sustancia que formará la película.

³⁶ Grunfeld, F. *Rev. Sci. Instrum.* **1993**, *64*, 548-555.

La calidad del agua usada como subfase en una palangana de Langmuir es de crucial importancia si se quieren evitar serios errores en el estudio de películas de Langmuir. La presencia de aun pequeñas cantidades, trazas, de contaminates pueden dramáticamente afectar las propiedades superficiales de una monocapa. Por ejemplo, iones metalicos pueden unir a moléculas de ácidos grasos e impurezas orgánicas pueden reducir la tensión superficial del agua, con lo que se cambia la forma de la monocapa y de las mediciones que se hacen de ella. Por lo tanto, la subfase acuosa debe ser altamente pura y tener un valor de tensión superficial cercano al teórico que es de 72.8 mN/m a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Para lograr esto se utiliza un sistema de ultra alta purificación basado en una combinación de cinco diferentes tecnologías (foto oxidación por luz ultravioleta, ósmosis inversa, adsorción orgánica, intercambio de iones y ultramicro filtración) que permiten producir agua con una pureza casi teórica (con una resistencia mayor a $18 \text{ M}\Omega\text{-cm}$).

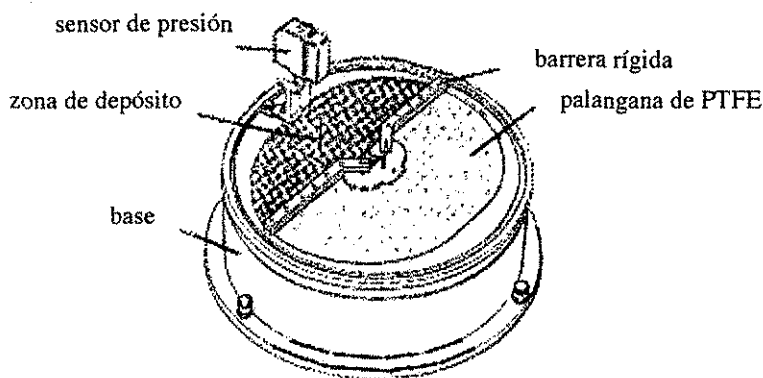


Figura 3.8. Palangana de Langmuir. Adaptada de Grunfeld.³⁶

Las películas de Langmuir se pueden comprimir a temperatura constante para formar una capa ordenada. Para lograr esto se utiliza una barrera que recorre la superficie de agua variando el área disponible para la monocapa, ver figura. 3.9. La velocidad de compresión varía dependiendo de la película bajo estudio y es necesario realizar varias isotermas para encontrar la velocidad a la cual no se afecte a la monocapa y sea posible lograr resultados reproducibles. Usualmente se utiliza una velocidad relativamente alta a bajas presiones, la cual se disminuye tan pronto como la presión de superficie empieza a aumentar, aunque si

la película es muy rígida es preferible mantener una velocidad de compresión baja para evitar una distribución inhomogénea de la presión superficial.

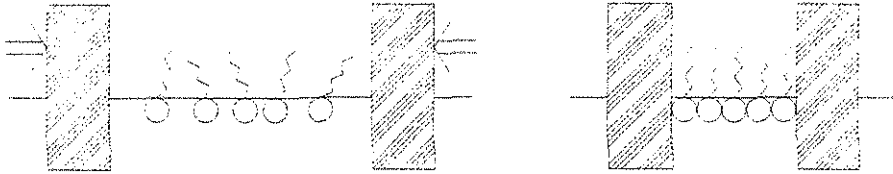


Figura 3.9. Monocapas expandidas y comprimidas en una superficie de agua por una barrera de PTFE.

Las características de la monocapa se pueden estudiar midiendo los cambios de presión superficial que ocurren cuando la monocapa es comprimida lateralmente. La presión superficial, π , es igual a la diferencia entre la tensión superficial del agua pura, γ_0 , y la de una superficie de agua cubierta con una monocapa, γ , y se expresa generalmente en mili-Newtons por metro, mN/m. La presión superficial se mide de manera experimental mediante el uso de una placa de Wilhelmy. Esta placa esta formada por una tira de papel cromatográfico (aprox. 2 cm largo, 1 cm ancho, 0.15 mm grueso) que esta suspendida en la interfase aire-agua, en donde es jalada hacia el bulto de la subfase debido a la tensión superficial del agua. Si un contaminante, o un tensoactivo, se esparce en la superficie la tensión superficial se reducirá para disminuir la energía libre de la superficie. Tomando esto en consideración, se puede demostrar que la diferencia de fuerzas que se ejercen en la placa de Wilhelmy entre la inmersión en agua pura y una superficie cubierta con un tensoactivo esta dada por:³⁷

$$\Delta F = 2(\gamma_0 - \gamma) = 2\pi \quad (3.8)$$

Experimentalmente, la fuerza que actúa en el papel se mide por medio una microbalanza electrónica.³⁵

³⁷ *Tensiometers and Langmuir-Blodgett Troughs*, Nima Operating Manual, 4th Edition, England, 1998.

Una gráfica de la presión superficial contra el área ocupada por molécula se conoce como una isoterma presión superficial-área y su forma es característica de las moléculas que forman la monocapa. El área por molécula puede ser calculada si el número de moléculas que se depositó en la superficie es conocido. La figura 3.10 muestra una típica e idealizada isoterma de presión-área donde se muestra un comportamiento general de la mayoría de las monocapas. La isoterma muestra tres diferentes regiones que reflejan tres diferentes estados de compresión de la monocapa. Inicialmente, cuando la monocapa se esparce en la superficie de agua y no se le ha aplicado ninguna presión lateral, las moléculas se comportan como un gas bidimensional. Al ir comprimiendo gradualmente la monocapa, su estructura se vuelve más ordenada y el comportamiento molecular corresponde al de un líquido bidimensional. Si aun se reduce más el área molecular, la monocapa actúa como un cuasi sólido con un comportamiento lineal entre la presión superficial y el área molecular. Eventualmente, el sistema llega a lo que se conoce como presión de colapso, π_c , en donde la monocapa pierde de manera irreversible su forma monomolecular debido a que la fuerza que se ejerce sobre la monocapa es demasiado grande para mantenerla confinada en dos dimensiones y las moléculas son expulsadas fuera de ella. Extrapolación de la pendiente de la fase sólida produce el área molecular a presión cero, A_0 . Esta área corresponde, de manera ideal, a la sección transversal de la parte hidrofóbica de la molécula que forma la monocapa.³⁷

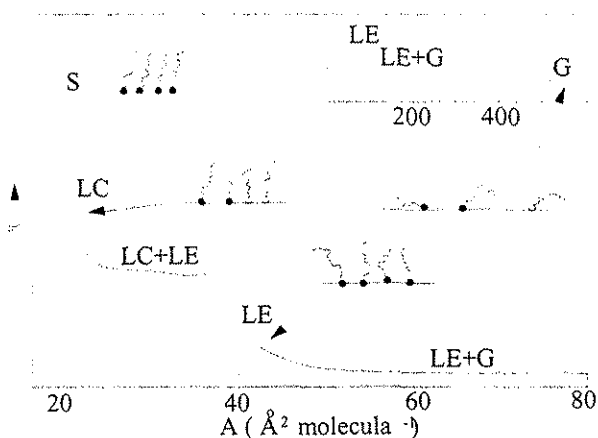


Figura 3.10. Isoterma idealizada de una molécula anfifílica en una superficie de agua. Adaptada de Knobler, C. M. *Science* 1990, 249, 870-874.

3.2.2 Preparación de una película de Langmuir-Blodgett.

Las películas de Langmuir-Blodgett (LB) son películas bien ordenadas formadas por moléculas anfífilas las cuales son depositadas capa por capa en un sustrato sólido a partir de una película de Langmuir formada inicialmente en la interfase agua-aire. Existen otras fuentes donde estas películas han sido revisadas con mayor detalle,³⁸ aquí solo se discutirán algunos aspectos de las películas de LB.

Antes de producir una película de LB se realiza una isoterma de la monocapa que formará la película de Langmuir, esto con la finalidad de determinar las condiciones en las que se realizará el depósito, como son: presión superficial, área molecular, fase, etc. Una vez que la película se encuentra en la condición deseada de depósito, el sustrato a cubrir (el cual si es hidrofílico se sumerge en el agua antes de esparcir la monocapa) se levanta a través de la monocapa y esta se deposita en el sustrato volviéndolo hidrofóbico, ver figura 3.11. La monocapa se va depositando en el sustrato manteniendo durante todo el proceso la presión constante, lo cual se logra mediante un proceso de autorregulación de la barrera. Una vez finalizado el depósito, si se desea, se puede volver a sumergir el sustrato a través de la monocapa con lo que una segunda capa puede depositarse, volviendo a la superficie de nuevo hidrofílica. De esta manera se pueden en principio, depositar cualquier número de capas para producir una película cuyo grosor será, idealmente, igual al producto de la longitud de la molécula que se deposite por el número de veces que el sustrato atraviese la interfase aire-agua. Si el sustrato es hidrofóbico, el procedimiento es el mismo, excepto que la primera capa que se deposite será cuando el sustrato se sumerja por primera vez en el agua a través de la monocapa.

La velocidad de depósito es un parámetro muy importante durante el proceso de depósito de la monocapa. En principio, la velocidad de depósito puede ser alta (~ 24 mm/min) si este se realiza cuando se sumerge la superficie ya que a velocidades bajas el menisco de agua se vuelve inestable y afecta la calidad del depósito. Sin embargo, para el caso de que el depósito se realice cuando se saca al sustrato del agua a través de la monocapa existe un límite en la velocidad que se puede usar. Este límite está dado por la razón a la cual el agua que se encuentra en la película que se deposita logra drenarse del sustrato.

³⁸ Roberts, G. G., *Langmuir-Blodgett Films*, Plenum Press, New York, 1990.



Todas las monocapas y películas de LB que se realizaron en esta tesis fueron preparadas en palanganas de Langmuir marca *Nima* (Nima Technology LTD, Inglaterra) controladas por computadora. La temperatura del sistema se mantuvo constante por medio de un recirculador de agua y todos los experimentos se realizaron en un ambiente libre de polvo (un cuarto limpio).

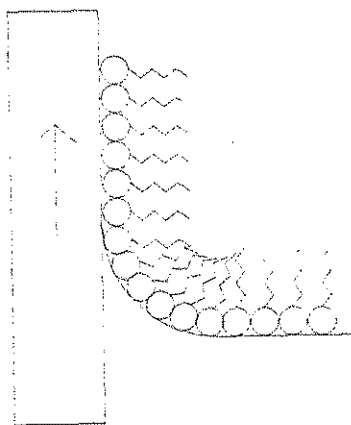


Figura 3.11. Deposito de Langmuir-Blodgett (LB) en una superficie hidrofílica.

3.3 Visualización de películas de Langmuir y de Langmuir-Blodgett.

La visualización de ciertas características de las diferentes fases de las películas de Langmuir y LB como son su mosaico de dominios, morfología, densidad, fluidez, etc., es de gran importancia para controlar las características estructurales que existen en estas películas. Además, las películas de Langmuir y LB no están exentas de tener defectos y uno desearía poder visualizarlos para lograr minimizar el número de ellos y tener un mayor calidad en las películas. A continuación se describen dos técnicas, una para películas de Langmuir y otra para películas de LB, que nos permiten lograr esta visualización.

3.3.1 El microscopio de ángulo de Brewster.

El microscopio de ángulo de Brewster (MAB), es en estos momentos una de las técnicas más utilizadas para la visualización de películas de Langmuir. La técnica fue desarrollada y reportada independientemente por un grupo francés, Hénon y Meunier,³⁹ y por un grupo alemán, Hönig y Möbius,⁴⁰ en 1991 y esta basada en las propiedades del ángulo de Brewster.

La reflectividad de una interfase plana entre dos medios con índices de refracción n_1 y n_2 , depende de la polarización del haz de luz incidente y del ángulo de incidencia θ . Para una interfase de Fresnel (una interfase donde el índice de refracción cambia abruptamente de n_1 a n_2 para $z=0$) y un haz p -polarizado (el campo eléctrico en el plano de incidencia), la reflectividad desaparece en el ángulo de Brewster θ_b , ver figura 3.12, el cual se define por la siguiente relación:

$$\tan(\theta_b) = n_2/n_1 \quad (3.9)$$

Si la interfase es entre aire, $n_1=1$, y agua, $n_2=1.333$ (a 632.8 nm , la longitud de onda de la luz de un láser He-Ne), el valor del ángulo de Brewster resulta ser 53.1 grados.

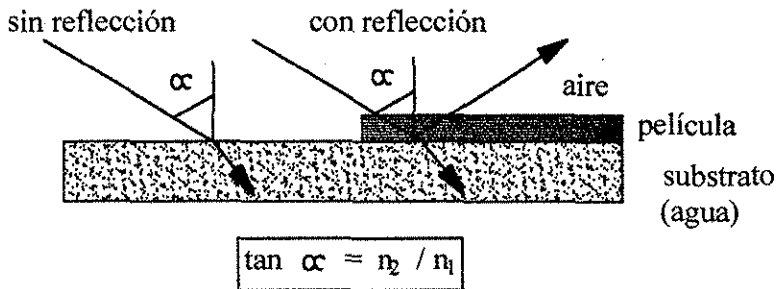


Figura 3.12. Principio en el que se basa el microscopio de ángulo de Brewster.

³⁹ Hénon, S.; Meunier, J. *Rev. Sci. Instrum.* **1991**, *62*, 936-939.

⁴⁰ Hönig, D.; Möbius, D. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 4590-4592.

Para una interfase real, la intensidad de la luz reflejada tiene un mínimo en el ángulo de Brewster, pero no se desvanece por completo. La baja intensidad de la luz reflejada en el ángulo de Brewster depende fuertemente de las propiedades interfaciales. La reflectividad de una interfase real en el ángulo de Brewster para un haz p -polarizado tiene tres orígenes:³⁹

1) El grosor de la interfase. La interfase aire-agua no es una interfase ideal ya que no existe una frontera bien definida entre los índices de refracción de los dos medios, esto debido a que el aire en la vecindad de la superficie de agua está saturado por vapor de agua y además, las propiedades interfaciales del agua son diferentes a las que esta tiene en bulto. Si además, se introduce una densa monocapa de moléculas anfífilas en la interfase aire-agua se provocará una variación en el índice de refracción $n(z)$ sobre el grosor de la monocapa l , ver figura anterior.

2) La rugosidad de la interfase real. Las ondas capilares, vibraciones mecánicas, fluctuaciones térmicas y corrientes convectivas que existen en la superficie del agua provocan una rugosidad de la superficie con un intervalo de un par de angstroms. Sin embargo, para el caso de monocapas en la superficie de agua las fluctuaciones térmicas se disminuyen debido a la alta tensión superficial de la monocapa y se pueden despreciar en una primera aproximación. Estas solo introducen un pequeño error en el grosor de la monocapa de aproximadamente 3 Å.

3) La anisotropía de la monocapa. Algunas fases condensadas en una monocapa son ópticamente anisotrópicas y esta anisotropía puede incrementar enormemente la intensidad de la luz reflejada. Si esta monocapa ópticamente anisotrópica no tiene un eje vertical z de simetría, entonces la luz reflejada es una función de la orientación de la monocapa en este plano.

Experimentalmente se ilumina la interfase en la incidencia de Brewster con un haz de alta intensidad de un láser p -polarizado. La intensidad de la luz reflejada, usualmente una millonésima parte de la intensidad incidente, es recibida directamente por un microscopio situado en el ángulo de Brewster y de ahí se lleva a un detector (una cámara CCD), lo que permite visualizar la morfología lateral de la monocapa. Si además, se introduce un analizador antes del detector es posible detectar la anisotropía óptica de la monocapa, ver

figura 3.13. El límite teórico de resolución esta dado por la longitud de onda de la luz, pero en la práctica la resolución lateral que se alcanza es de aproximadamente $4 \mu\text{m}$.

Como se comentaba anteriormente, la luz reflejada en un MAB detecta cualquier cambio en el índice de refracción de la interfase aire-monocapa-agua y esto puede ser utilizado para investigar y caracterizar algunos aspectos de una monocapa como son: homogeneidad, defectos, separación de fases, transiciones de fase, orientación, tamaño y morfología de los dominios, anisotropía, adsorción a partir de la subfase, etc. Una ventaja que tiene esta técnica con respecto a otras, como la microscopía por fluorescencia, es que no es necesario utilizar moléculas “marcadoras” (probes) que pueden afectar a la monocapa y que pueden evitar visualizar ciertas fases de esta. En un MAB, es posible visualizar todas las transiciones de fase de una monocapa y, quizás lo más importante, no se perturba al sistema durante la medición experimental. Las observaciones por MAB de esta tesis se realizaron en un BAM1 (Nanofilm Technologie GMBH, Alemania).

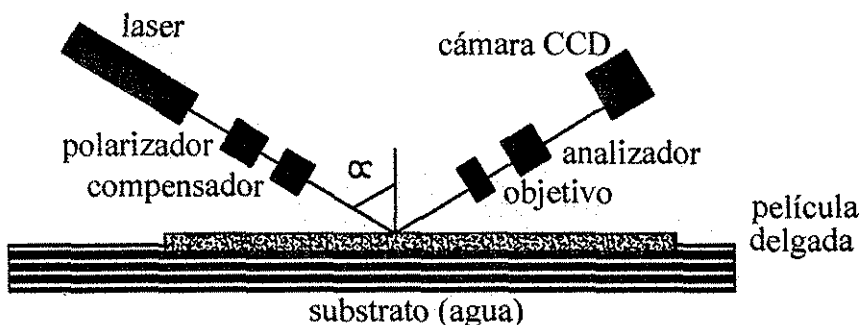


Figura 3.13. Disposición experimental del Microscopio de ángulo de Brewster (MAB).

3.3.2 El Microscopio de Fuerza Atómica.

El microscopio de fuerza atómica (MFA),⁴¹ ha sido ampliamente utilizado en el estudio de películas de LB, donde se han logrado visualizar los dominios, defectos y la rugosidad que existe en las películas. Un requisito muy importante en cualquier superficie que se desee usar para realizar mediciones de fuerzas superficiales es que su rugosidad sea menor que la distancia de separación en la que se tiene interés medir las fuerzas.

Inicialmente diseñado como una técnica de visualización, el MFA también ha sido utilizado en los últimos años como un aparato para medir fuerzas, particularmente utilizando una partícula coloidal sobre una superficie plana.^{42,43} Comparado con un AFS, en el MFA no es posible obtener ciertos valores como son: distancias absolutas, el radio local de interacción, el grosor de las capas adsorbidas (excepto en situaciones especiales) o deformaciones superficiales. Su mayor ventaja reside en la facilidad de su manejo (el tiempo para realizar un experimento en un MFA es mucho menor que en un AFS) y su versatilidad.

La idea básica de un MFA, es medir las fuerzas que existen entre una pequeña punta y una superficie. La punta es colocada al final de un resorte tipo "canteliver", el cual se flexiona verticalmente como resultado de las fuerzas que existen entre la punta y la superficie. Usualmente, los resortes son de silicio o nitruro de silicio y se les puede encontrar comercialmente con una variedad de valores de constante de fuerza (de 0.01 a 100 N/m), frecuencias de alta resonancia y tamaño de puntas (típicamente con un radio entre 10 - 100 nm). La superficie se coloca en un cristal piezoeléctrico con el cual es posible mover la superficie en todas las direcciones.

Las imágenes tridimensionales son adquiridas al barrer la superficie con la punta y al mismo tiempo ir registrando las deflexiones del resorte. Existen una gran variedad de modos de medición y su uso depende del tipo de información que se quiere obtener de la superficie. Los dos modos más comunes que se usan en un MFA son el de contacto y el de contacto intermitente (o modo Tapping^{MR}). Existen dos diferentes formas de producir imágenes en el modo contacto: altura constante y fuerza constante. De estos dos, el más

⁴¹ Binnig, G.; Quate, C. F.; Gerber, C. *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *56*, 930-933.

⁴² Ducker, W. A.; Senden, T. J.; Pashley, R. M. *Nature* **1991**, *353*, 239-241.

⁴³ Ducker, W. A.; Senden, T. J.; Pashley, R. M. *Langmuir* **1992**, *8*, 1831-1836.

usado es el de fuerza constante. En este modo, el ángulo del resorte con respecto a un haz de luz se mantiene constante durante un barrido por medio de un circuito electrónico cerrado que ajusta la posición vertical del piezoeléctrico que se usa para barrer la superficie. Las imágenes se obtienen bajo la suposición de que la interacción entre la punta y la superficie como función de la separación es la misma en todos los puntos de la superficie y por lo tanto cualquier fuerza que se obtenga corresponde a un particular valor de separación.

En el modo de contacto intermitente, se hace oscilar al resorte cerca de su valor de frecuencia de resonancia. Al acercarse la punta a la muestra, el resorte deja de oscilar libremente debido a que es afectado por las interacciones con la superficie. En este caso, cambios en la amplitud, frecuencia, o fase de la oscilación pueden usarse en un circuito cerrado. Típicamente, las imágenes se obtienen a partir del voltaje requerido para ajustar la posición vertical del piezoeléctrico de tal manera que se mantenga una amplitud de oscilación fija. Con el modo de contacto intermitente, es posible lograr que las interacciones entre la punta y la superficie se vean reducidas al mínimo, lo cual es una condición importante en el estudio de películas de LB dada su naturaleza suave. Sin embargo, no siempre es posible evitar que, durante el proceso de barrido, estas interacciones provoquen cambios irreversibles en la superficie. Otra ventaja en el modo de contacto intermitente, es que permite utilizar velocidades de barrido más altas que en el modo de contacto cuando se evalúa de manera cuantitativa la rugosidad de una superficie.⁴⁴

Dos microscopios de fuerza atómica fueron utilizados en esta tesis para estudiar monocapas transferidas a mica. Se utilizó un NanoScope IIIa SPM (Digital Instruments, California, EUA) con un área de barrido de $15 \times 15 \mu\text{m}$ y un JSTM-4200 JEOL (JEOL, Japón) "scanning probe microscope" con un área de barrido de $10 \times 10 \mu\text{m}$. Un barrido preliminar a diferentes frecuencias se realizó en todos los casos para definir el área específica a estudiar. Se utilizaron tanto el modo de contacto como el modo de contacto intermitente, para obtener imágenes topográficas, de deflexión, y fase. En estos barridos se utilizaron puntas de Si_3N_4 con una constante de fuerzas típica de 0.3 Nm^{-1} para el caso del

⁴⁴ Simpson, G. J.; Sedin, D. L.; Rowlen, K. L. *Langmuir* **1999**, *15*, 1429-1434.

instrumento Digital y puntas de silicio de $\sim 40 \text{ Nm}^{-1}$ para el JEOL. Todas las imágenes fueron analizadas usando los programas de análisis (softwares) respectivos de cada instrumento.

3.4 Elipsometría.

La elipsometría es una de las muchas técnicas que existen en estos días con la cual es posible estudiar las propiedades ópticas de una película delgada. Está basada en el hecho de que el estado de polarización de una onda de luz se ve alterado cuando esta es reflejada en una interfase. Este cambio es extremadamente sensible a las propiedades superficiales y puede ser detectado de manera muy precisa. La elipsometría es especialmente apropiada para realizar estudios de crecimiento o adsorción de películas delgadas sobre superficies sólidas. Es posible realizar mediciones tanto en la interfase aire-sólido como en la interfase líquido-sólido. En soluciones acuosas ha sido posible medir la adsorción de tensoactivos,⁴⁵ proteínas,^{46,47} ADN⁴⁸ y polímeros^{49,50} sobre superficies sólidas. Esta técnica tiene la ventaja de que es rápida y no destructiva, y por lo tanto, también es posible realizar estudios cinéticos. Los sustratos usados en una medición elipsométrica deben ser reflectivos y tener una rugosidad baja para poder lograr obtener buenos resultados. Algunos ejemplos de sustratos con excelentes propiedades ópticas que se usan en elipsometría son: aluminio, plata, oro, silicio y óxido de silicio. Los principios de la técnica elipsométrica han sido

⁴⁵ Arnebrant, T.; Bäckström, K.; Jönsson, B.; Nylander, T. *J. Colloid Interface Sci.* **1989**, *128*, 303-312.

⁴⁶ Wahlgren, M.; Arnebrant, T. *J. Colloid Interface Sci.* **1989**, *136*, 259-265.

⁴⁷ Nylander T., Tesis de la Universidad de Lund, Lund, Suecia, **1987**.

⁴⁸ Eskilsson, K.; Leal, C.; Lindman, B.; Miguel, M.; Nylander, T. *Langmuir* **2001**, *17*, 1666-1669.

⁴⁹ Malmsten, M.; Lindman, B. *Langmuir* **1990**, *6*, 357-364.

⁵⁰ Tiberg, F.; Malmsten, M.; Linse, P.; Lindman, B. *Langmuir* **1991**, *7*, 2723-2730.
Eskilsson, K.; Tiberg, F. *Macromolecules* **1997**, *30*, 6323-6332.

extensamente revisados y discutidos por Azzam y Bashara,⁵¹ y por lo tanto, aquí solo se dará una pequeña descripción del procedimiento utilizado en esta tesis.

En esta tesis se utilizó un elipsómetro para películas delgadas Rudolph Research, tipo 43603-200E, con una disposición horizontal y el cual se muestra esquematizado en la figura 3.14. En los experimentos realizados en esta tesis se considera que el haz de luz atraviesa un medio de índice de refracción conocido, n_0 , y a través de una región interfacial con un índice de refracción variable espacialmente, n_I , antes de ser reflejado por un sustrato cuyas propiedades ópticas son conocidas.

Durante el curso de un experimento se midieron los ángulos elipsométricos Ψ y Δ , los cuales describen la diferencia en el estado de polarización entre la onda incidente y la onda reflejada. Estos ángulos pueden ser expresados como función de la longitud de onda, λ , el ángulo de incidencia, ϕ_0 , y las propiedades ópticas del sistema reflejante por la siguiente fórmula:

$$\tan \Psi e^{i\Delta} = f(\lambda, \phi_0, \text{parámetros ópticos}) \quad (3.10)$$

En el caso de una reflexión en una interfase, los parámetros ópticos son los índices de refracción de las dos fases, pero cuando películas planas e isotrópicas se encuentran localizadas entre los dos medios, entonces los coeficientes de reflexión total no solo dependerán de los índices de refracción sino también del grosor de cada una de estas capas.⁵¹

A partir de los ángulos elipsométricos Ψ y Δ , y tomando en cuenta una capa uniforme, se calculó el grosor elipsométrico, d_f , y el índice de refracción promedio, n_I , utilizando un método iterativo desarrollado por Tiberg y Landgren.⁵² En este método es necesario tomar valores de Ψ y Δ en dos diferentes medios y se considera que el sistema está formado por cuatro capas (Si, SiO₂, la película adsorbida y el medio).⁵³ La cantidad adsorbida Γ , se calculó utilizando d_f y n_I , a partir de la fórmula derivada por de Feijter *et al.*:⁵⁴

⁵¹ Azzam, R. M. A.; Bashara, N. M. *Ellipsometry and Polarized Light*, North Holland: Ámsterdam, 1989.

⁵² Tiberg, F.; Landgren, M. *Langmuir* 1993, 9, 927-932.

⁵³ Landgren, M.; Jönsson, B. *J. Phys. Chem.* 1993, 97, 1656-1660.

⁵⁴ de Feijter, J. A.; Benjamins, J.; Veer, F. A. *Biopolymers* 1978, 17, 1759-1772.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

$$\Gamma = \frac{(n_1 - n_0)d_f}{dn/dc} \quad (3.11)$$

donde dn/dc es el incremento en el índice de refracción y el cual debe de ser calculado independientemente. Valores típicos de dn/dc usados en adsorción de diferentes tipos de proteínas, como β -lactoglobulina, lisozima, albumina bovina,³⁴ están entre 0.181 y 0.187 g/cm^3 .

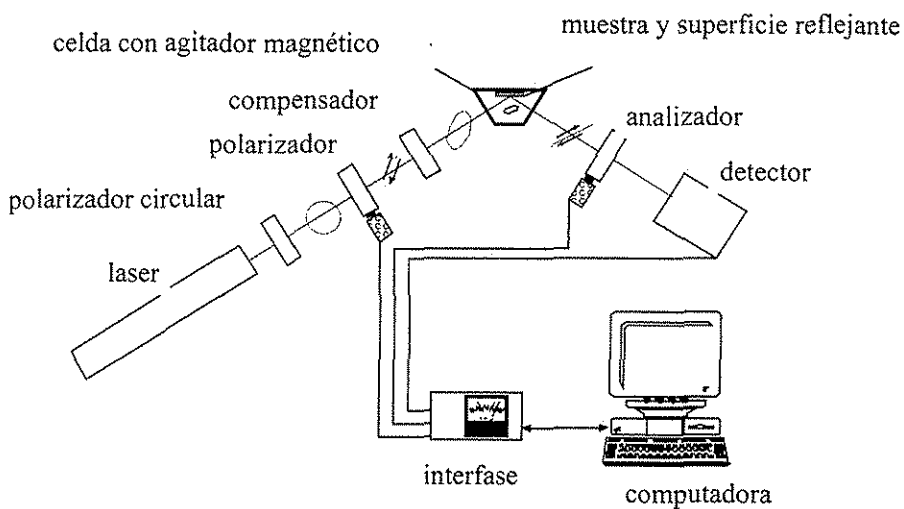


Figura 3.14. Esquema de la disposición del elipsómetro Rudolph Research usado en esta tesis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.-Superficies e Interacciones Hidrofóbicas.

Uno de los objetivos del presente trabajo es poder estudiar las propiedades anfífilas de las proteínas. Para lograr esto era necesario disponer de diferentes superficies en donde se pudiera estudiar las interacciones de las proteínas. La mica, el substrato que utilizamos en el aparato de fuerzas de superficie (AFS), es hidrofílica y cargada de manera negativa. Por lo tanto, una de las principales actividades dentro del trabajo en esta tesis fue encontrar un procedimiento para modificar a la mica para volverla una superficie neutra e hidrofóbica y que además fuera adecuada para usarse tanto en el AFS como en el microscopio de fuerza atómica (MFA).

Como consecuencia de esta necesidad, una parte de las investigaciones de esta tesis se dirigieron hacia lograr comprender lo que se conoce como la *interacción "hidrofóbica" de largo alcance*, la cual se ha encontrado experimentalmente en una gran variedad de diferentes tipos de superficies hidrofóbicas y cuyo origen es en estos momentos un tema de un extenso debate.

A continuación, se da una pequeña aclaración entre el *efecto hidrofóbico* y la *interacción "hidrofóbica" de largo alcance*, y una introducción al trabajo ya realizado por otros investigadores en el área de la superficies hidrofóbicas y de su interacción. También, se describe el método experimental desarrollado en esta tesis para producir superficies hidrofóbicas para el AFS y el MFA, y los resultados obtenidos con ellas. Por último, se dan las conclusiones de lo que se considera es el avance aportado por este trabajo hacia el entendimiento de la producción de superficies hidrofóbicas y su interacción.

4.1 Efecto hidrofóbico e interacción hidrofóbica.

Una distinción se debe hacer entre el *efecto hidrofóbico*, que es un fenómeno frecuentemente encontrado en las interacciones de moléculas hidrofóbicas y el agua, y la *interacción "hidrofóbica" de largo alcance* de la que hablamos aquí, la cual se refiere a la interacción que se observa solamente entre superficies macroscópicas. Ambos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

fenómenos están sujetos a una amplia discusión, y las confusiones con respecto a la terminología y los hechos científicos son impactantes en ambas áreas.

Las moléculas de agua, en su estado líquido, están normalmente ordenadas en una estructura tetrahedral de corto alcance y la razón principal de este inusual ordenamiento son los fuertes enlaces de hidrógeno que existen entre las moléculas de agua, y el hecho de que tales enlaces puedan ser formados en cuatro direcciones, permitiendo que se establezca una estructura tridimensional.¹ Si se introduce, por ejemplo, una cadena de un alcano en el sistema se evita que las moléculas de agua interactúen entre ellas. Esto es de lo más favorable para la cadena de alcano, la cual rápidamente interactúa con las moléculas de agua de los alrededores (con lo que, en este sentido, no es tan "hidrofóbica"), mientras que varios enlaces agua-agua se rompen. Para sobreponer esto, la estructura del agua se reorganiza alrededor de la cadena de alcano optimizando el número de enlaces agua-agua, pero con el costo de una substancial reducción de la entropía. Ahora, si en vez de una existen varias cadenas de alcano, lo que se observa es que estas tienden a agregarse puesto que con esto se disminuye la perturbación de la estructura del agua. Esta tendencia de los hidrocarburos a agregarse en agua determina, entre otras cosas, la estructura terciaria de las proteínas y es un elemento importante en el auto ensamblaje de las membranas biológicas. Lo que hace a esta interacción tan diferente en comparación con las otras interacciones intramoleculares es la fuerte interacción en el *disolvente*, i.e., los efectos entrópicos debidos a los cambios en la estructura del agua son considerables. Exactamente como esto afecta la interacción es aun un tema de amplia discusión, pero cualquiera que sea la razón, no tiene relación con el hecho de observar una atracción de largo alcance en superficies macroscópicas hidrofóbicas.

4.2 Interacción "hidrofóbica" de largo alcance.

En las ultimas dos décadas, las atracciones de largo alcance observadas entre superficies macroscópicas hidrofóbicas en agua y soluciones acuosas han sido una de las

¹ Tanford, C. *The Hydrophobic Effect*, John Wiley & Sons, New York, 1980.

principales preocupaciones de la comunidad científica del área de superficies y coloides.² Israelachvili y Pashley,³ al trabajar superficies de mica que se habían vuelto hidrofóbicas por medio de una adsorción de un tensoactivo catiónico a partir de la solución, fueron los primeros en encontrar esta atracción en exceso a la atracción precedida por las fuerzas de van der Waals. A partir de este descubrimiento, se han realizado una gran cantidad de experimentos para estudiar esta interacción, con una multitud de dispositivos experimentales, sistemas, y procedimientos de preparación de las superficies. Los resultados obtenidos de todas estas investigaciones tienen en común que las superficies son hidrofóbicas y que en todas existe una interacción "hidrofóbica" extra entre dos de estas superficies en agua. Sin embargo, todos los resultados son diferentes en cuanto al intervalo de interacción y la forma de la atracción.

Los procedimientos de preparación de las superficies incluyen la ya mencionada adsorción de tensoactivos,^{3,4} películas de Langmuir-Blodgett,⁵ silanización de mica⁶ o sílica,⁷ depósito por plasma,⁸ y modificación de oro por medio de grupos tiol.⁹ Además, existen resultados con otros sistemas solvofóbicos en donde en vez de agua se utilizó etilen glycol^{10,11} y propanotriol.¹² También, se han investigado los efectos de la

² Christenson, H. K. "The long range attraction between macroscopic hydrophobic surfaces" in *Modern approaches to wettability: Theory and applications*, Schrader, M. E., Loeb, G., Eds.; Plenum Press: New York, 1992.

³ Pashley, R. M.; Israelachvili, J. N. *Colloid. Surf* 1981, 2, 169.

⁴ Parker, J. L.; Yaminsky, V. V.; Claesson, P. M. *J. Phys. Chem.* 1993, 97, 7706. Craig, V. S. J.; Ninham, B. W.; Pashley, R. M. *Langmuir* 1998, 14, 3326-3332.

⁵ Claesson, P. M.; Blom, C. E.; Herder, P. C.; Ninham, B. W. *J. Colloid Interface Sci.* 1986, 114, 234-242.

⁶ Wood, J.; Sharma, R. *Langmuir* 1994, 10, 2307-2310.

⁷ Parker, J. L.; Claesson, P. M.; Attard, P. *J. Phys. Chem.* 1994, 98, 8468-8480.

⁸ Parker, J. L.; Cho, D.; Claesson, P. M. *J. Phys. Chem.* 1989, 93, 6121.

⁹ Ederth, T.; Claesson, P. M.; Liedberg, B. *Langmuir* 1998, 14, 4782-4789.

¹⁰ Parker, J. L.; Claesson, P. M. *Langmuir*, 1992, 8, 757.

¹¹ Tsao, Y. H.; Evans, D. F.; Wennerström, H. *Science* 1993, 262, 547.

temperatura^{7,13}, el gas disuelto,¹⁴ electrolitos,^{15,16} la hidrofobicidad de la superficie,^{17,18} la longitud de la cadena del hidrocarburo,¹³ etc., pero desafortunadamente muchos de los estudios están en desacuerdo sobre cual es la importancia de los efectos de cada uno de estos factores sobre la atracción "hidrofóbica" de largo alcance.

Muchos investigadores han dedicado grandes esfuerzos en tratar de explicar los diversos resultados experimentales con un modelo teórico, pero la situación es tan confusa como en el lado experimental. Algunas de las explicaciones involucran cambios estructurales en el agua que se extiende a partir de las superficies hidrofóbicas,^{19,20} varios modelos proponen un origen electrostático de la interacción,^{21,22} otros metaestabilidad de las películas delgadas de agua que se encuentran unidas a las superficies hidrofóbicas,^{7,23} se proponen fenómenos de adsorción y desorción de las interfases^{24,25} y también, que la interacción es debida a la formación de cavidades de vapor y/o a

¹² Boehnke, U. C.; Remmler, T.; Motschmann, H.; Wurlitzer, S.; Hauwede, J.; Fischer, T. *M. J. Colloid Interface Sci.* **1999**, *211*, 243.

¹³ Tsao, Y. H.; Yang, S. X.; Evans, D. F.; Wennerström, H. *Langmuir* **1991**, *7*, 3154.

¹⁴ Craig, V. S. J.; Ninham, B. W.; Pashley, R. M. *Langmuir*, **1999**, *15*, 1562-1569.

¹⁵ Christenson, H. K.; Claesson, P. M.; Parker, J. L. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 6725.

¹⁶ Craig, V. S. J.; Ninham, B. W.; Pashley, R. M. *Langmuir*, **1998**, *14*, 3326-3332.

¹⁷ Pashley, R. M.; McGuiggan P. M.; Ninham, B. W.; Evans, D. F. *Science* **1985**, *229*, 1088-1089.

¹⁸ Hato, M. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 18530-18538.

¹⁹ Eriksson, J. C.; Ljunggren, S.; Claesson, P. M. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **1989**, *85*, 163.

²⁰ Derjaguin, B. V.; Churaev, N. V. *Langmuir* **1987**, *3*, 607.

²¹ Attard, P. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 6441.

²² Tsao, Y. H.; Evans, D. F.; Wennerström, H. *Langmuir*, **1993**, *9*, 779.

²³ Bérard, D. R.; Attard, P.; Patey, G. N. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 7236.

²⁴ Yaminsky, V. V.; Ninham, B. W.; Christenson, H. K.; Pashley, R. M. *Langmuir*, **1996**, *12*, 1936-1943.

²⁵ Christenson, H. K.; Yaminsky, V. V. *Colloids Surf. A* **1997**, *129-130*, 67

burbujas, las cuales forman un puente entre las superficies.^{7,26} Así mismo, se han realizado simulaciones del comportamiento del agua cerca de paredes hidrofóbicas y los resultados indican que existe una disminución de la densidad cerca de estas.^{27,28} Sin embargo, en estas simulaciones los resultados de interacción no concuerdan con los resultados experimentales. En realidad, dada la gran variedad cualitativa y cuantitativa de los datos experimentales publicados, es difícil que exista una sola explicación para todos estos datos.

Recientes resultados experimentales y de simulación sugieren que la *interacción "hidrofóbica" de largo alcance* es, en realidad, un número de diferentes fenómenos, los cuales pueden atribuirse a pequeñas variaciones en la estructura de las diferentes superficies que se están usando en los estudios.²⁴ Como se verá más adelante, los resultados obtenidos en esta tesis parecen concordar con esta opinión.

4.3 Estudios en el AFS con mica hidrofóbica.

El AFS es la técnica principal en la cual se basa esta tesis y como se pensaba realizar una superficie hidrofóbica había que tomar en cuenta ciertas consideraciones para que esta pudiera usarse en este aparato. La principal consideración era tomar en cuenta que el substrato más común que se utiliza en el AFS es mica (ver sección 3.1.4) y, desafortunadamente, esta es inerte y no tiene grupos con los cuales se puedan realizar enlaces covalentes, lo que dificulta su modificación. También, había que considerar que las superficies creadas debían tener una rugosidad mínima (de preferencia que fueran molecularmente planas), lo cual es un requisito para cualquier superficie que se pretenda usar en mediciones de fuerzas superficiales. Finalmente, otra consideración era que estas fueran estables tanto en aire como en agua y soluciones acuosas.

²⁶ Attard, P. *Langmuir* **1996**, *12*, 1693-1695. Attard, P. *Langmuir*, **2000**, *16*, 4455-4466.

²⁷ Forsman, J.; Jönsson, B.; Woodward, C. E.; Wennerström, H. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 4253.

²⁸ Sakurai, M.; Tamagawa, H.; Ariga, K.; Kunitake, T.; Inoue, Y. *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *289*, 567.

Afortunadamente, este trabajo se facilitó ya que en los últimos años se han realizado una extensa cantidad de estudios con el AFS sobre capas hidrofóbicas en mica.^{2,5,6,8,13,15,17,22,29,30,31,32,33,34,35} Sin embargo, como se mencionó anteriormente, los resultados de estos estudios son bastantes confusos y en muchos casos la estabilidad de las capas hidrofóbicas usadas era cuestionable.^{1,15,35} Lo que sí queda claro a partir de todos estos resultados es que es de gran importancia la manera en que las superficies son preparadas y que lograr una superficie hidrofóbica lo más plana (sin rugosidad), neutra y estable es clave para una adecuada medición de las fuerzas hidrofóbicas entre superficies macroscópicas.

De todos los procedimientos realizados para volver hidrofóbica a la mica el desarrollado por Wood y Sharma,⁶ en donde se deposita una monocapa de octadeciltrióxido de silano ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{Si}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_3$) sobre la mica, es en el que se cubren todas las consideraciones mencionadas anteriormente; y se optó por seguir este método en esta tesis. Dentro de las ventajas de este procedimiento se encuentra el hecho de que se producen superficies hidrofóbicas estables (robustas), neutras y planas, y que hasta el momento es el único en el que, al utilizarlas en el AFS, no se ha encontrado la atracción "hidrofóbica" de largo alcance.³⁶ Por otro lado, la técnica es relativamente sencilla y, en

²⁹ Israelachvili, J. N.; Pashley, R. M. *Nature* **1982**, *300*, 341.; *J. Colloid Interface Sci.* **1984**, *98*, 500-514.

³⁰ Christenson, H. K.; Claesson, P. M. *Science* **1988**, *239*, 390-392. Claesson, P. M.; Christenson, H. K. *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 1650.

³¹ Parker, J. L.; Claesson, P. M.; Cho, D. L.; Ahlberg, A.; Tidblad, J.; Blomberg, E. *J. Colloid Interface Sci.* **1990**, *134*, 449.

³² Kékicheff, P.; Christenson, H. K.; Ninham, B. W. *Colloids Surf.* **1989**, *40*, 31.

³³ Christenson, H. K.; Claesson, P. M.; Berg, J.; Herder, P. C. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 1472.

³⁴ Kurihara, K.; Kunitake, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10927.

³⁵ Christenson, H. K.; Parker, J. L.; Yaminsky, V. V. *Langmuir* **1992**, *96*, 6725.

³⁶ Wood, J.; Sharma, R. *Langmuir* **1995**, *11*, 4797-4802.



nuestro caso, nos era completamente accesible en cuanto a las condiciones experimentales.

4.4 Procedimiento para realizar superficies hidrofóbicas de OTE.

En esta tesis varios experimentos se realizaron en superficies de mica que fueron modificadas para volverlas hidrofóbicas por medio de depósitos de Langmuir-Blodgett (ver secciones 3.2.1 y 3.2.2 de esta tesis) con octadeciltriétoxissilano (OTE), siguiendo el procedimiento de Wood y Sharma.⁶ A continuación se da una pequeña descripción del procedimiento:

Una superficie de mica, ya sea lista para usarse en el AFS o para su uso en el MFA, se introduce en una subfase acidificada de agua (con HCL o HNO₃ para obtener un $pH=2$) a una temperatura de 23 °C. Previamente, la mica fue activada al exponerla a un plasma de aire/agua generado por radio frecuencia (~2 min a ~30 W, 100 mTorr). Posteriormente, una solución de OTE en cloroformo se esparce sobre la superficie aire/agua y se espera a que ocurra la polimerización del OTE, así como también a que el cloroformo se evapore. Por lo general, uno espera hasta que la caída en la presión sea insignificante, lo que en este sistema no es mayor a 15 minutos. A continuación, se realiza la compresión de la monocapa y posteriormente esta se deposita sobre la mica a una presión constante de 10-12 mN/m (velocidad de depósito de 1 mm/min). Después de terminado el depósito, las superficies de mica hidrofóbicas son horneadas y templadas en un horno al vacío (100 °C, 100 mTorr) por dos horas antes de su uso (ver figura 4.1).

4.4.1 Comentarios sobre el procedimiento de Wood y Sharma.

Los silanos son compuestos que se han utilizado extensamente en la funcionalización de superficies.³⁷ Una gran cantidad de ellos se encuentran accesibles comercialmente, con los cuales es posible preparar superficies con diferentes propiedades. Dentro de estos compuestos, el octadeciltriclorosilano (OTS) es uno de los compuestos que se ha utilizado para ser depositado en mica por adsorción a partir de la solución

³⁷ Leyden, D. E. *Silanes Surfaces and Interfaces*; Gordon Breach: New York.

(autoensamblaje),^{38,39} dada su alta reactividad por sus tres grupos polares (-Cl). Sin embargo, Kessel y Granick⁴⁰ encontraron que el OTE es mejor pues es menos susceptible a hidrólisis lo cual, como se verá más adelante en los resultados, es importante para la técnica. En general, los procedimientos para producir capas hidrofóbicas de OTE sobre mica por medio de autoensamblaje son complejos y la calidad de las superficies obtenidas no siempre son aceptables para una superficie que se piense utilizar en mediciones de fuerzas superficiales.^{41,42}

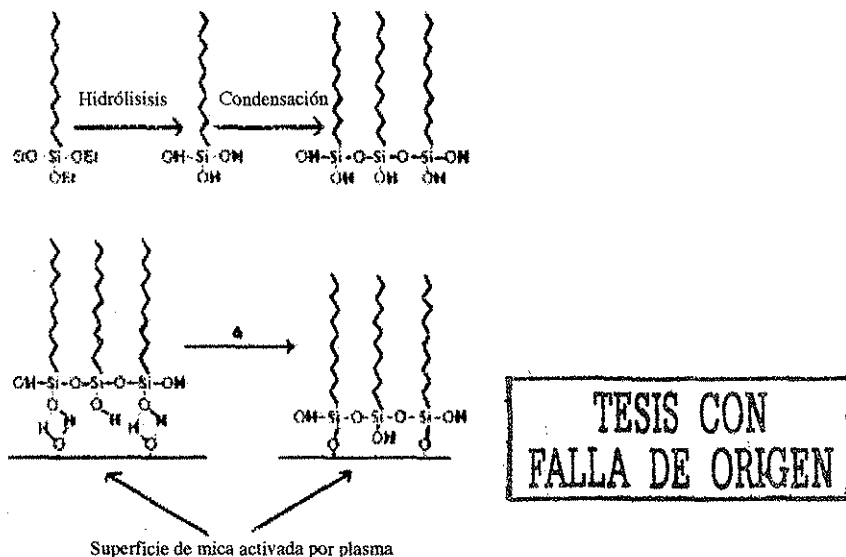


Figura 4.1. Representación esquematizada de la silanización de mica activada. Adaptada de Wood y Sharma.⁶

³⁸ Carson, G. A.; Granick, S. *J. Mater. Res.* **1990**, *5*, 1745.

³⁹ Lambert, A. G.; Neivandt, D. J.; McAloney, R. A.; Davies, P. B. *Langmuir* **2000**, *16*, 8377-8382.

⁴⁰ Kessel, C. R.; Granick, S. *Langmuir* **1991**, *7*, 533.

⁴¹ Peanasky, J.; Schneider, H. M.; Granick, S.; Kessel, C. R. *Langmuir* **1995**, *11*, 953-962.

⁴² Xiao, X-D.; Liu, G.; Charych, D. H.; Salmeron, M. *Langmuir*, **1995**, *11*, 1600-1604.

El procedimiento de Wood y Sharma⁶ elimina los problemas asociados al proceso de autoensamblaje (como son control y reproducibilidad del proceso, estabilidad y homogeneidad de las superficies, conocimiento del grosor de la capa producida, etc.) al utilizar la técnica de Langmuir-Blodgett (LB), la cual tiene la ventaja de que es suficiente depositar una sola monocapa para lograr volver hidrofóbica a la mica, que esta capa es casi molecularmente plana y que además, la técnica de LB produce monocapas de silanos más densamente empacadas.⁴³

Como se mencionó anteriormente, la modificación de mica no es fácil debido a que es un material inerte que no contiene grupos reactivos y por lo tanto realizar enlaces covalentes de grupos reactivos como son cloro-, etoxy-, o metoxisilanos no es posible. Hasta hace muy poco la única manera de cambiar sus propiedades superficiales era utilizando los sitios negativos en la superficie de la mica como puntos de unión. Una manera de hacerlo es utilizar moléculas cargadas positivamente³ o iones que se encuentren en una solución salina y que pueden remplazar a los átomos de potasio que se encuentren en la superficie. Esta sustitución también se puede lograr utilizando depósitos más ordenados por medio de la técnica de Langmuir-Blodgett.⁴⁴ Sin embargo, Parker *et al.*³¹ demostraron que al exponer la superficie de mica a un plasma producido a partir de vapor de agua se pueden introducir en la superficie grupos silanol (-Si-OH), los cuales pueden ser utilizados para enlazar químicamente moléculas de silanos. La combinación de espurreo y reacción en el medio ambiente del plasma es lo que altera las propiedades de la superficie y la activa. Este tratamiento por plasma causa mínimas alteraciones en la superficie de la mica y se han logrado medir fuerzas oscilatorias de octametilciclotetrasiloxano,³¹ las cuales solo son posibles de medir en superficies molecularmente planas.

Las condiciones en las que se encuentra la superficie de agua en el procedimiento de Wood y Sharma son las optimas para lograr una monocapa ordenada. Estudios de difracción superficial de rayos X en OTS⁴⁵ muestran que la polimerización se favorece y

⁴³ Kojio, K.; Ge, S.; Takahara, A.; Kajiyama, T. *Langmuir* **1998**, *14*, 971-974.

⁴⁴ Marra, J. J. *Colloid Interface Sci.* **1985**, *107*, 446.

⁴⁵ Barton, S. W.; Goudot, A.; Rondelez, F. *Langmuir*, **1991**, *7*, 1029-1030.

acelera a $pH=2$, lo que provoca un ordenamiento de largo alcance de la monocapa. A temperaturas menores a la utilizada en este procedimiento es probable que se logre todavía un mayor ordenamiento, pero dada la rigidez de la monocapa lo más seguro es que los efectos sean mínimos. OTE fue seleccionado en vez de OTS ya que se considera que el primero se hidroliza a una velocidad menor y esto le permitiría formar una monocapa antes de que la hidrólisis / polimerización ocurra en el plano de la interfase aire-agua. El proceso de horneado que se realiza al final del depósito de la monocapa de OTE en mica tiene como función disminuir los esfuerzos entre las fronteras de grano de la monocapa y reducir la cantidad de agua que exista entre los grupos silanol de OTE y la superficie de mica para de esta manera crear una monocapa más estable.

4.5 Resultados y discusión.

4.5.1 Monocapa de Langmuir de OTE.

En la figura 4.2 se presenta una isoterma típica presión superficial contra área medida en una monocapa de OTE, la cual se obtuvo al esparcir una solución de OTE en cloroformo en una subfase de agua acidificada ($pH=2$) a 23 °C y la cual después se comprimió hasta colapso. En general, la velocidad de compresión fue de $15 \text{ cm}^2/\text{min}$. Esta isoterma es esencialmente la misma a la obtenida por Wood y Sharma⁶ y en la cual se observa una coexistencia de fases a presiones laterales menores a $\sim 1 \text{ mN/m}$ y un abrupto aumento de la presión a áreas menores a $\sim 25 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$. Solo aquellas monocapas de OTE que presentaron una isoterma con estas características fueron utilizadas para cubrir mica por medio de un depósito de Langmuir-Blodgett (LB).

4.5.2 Imágenes de Microscopía de Ángulo de Brewster.

Imágenes de microscopía de ángulo de Brewster (MAB, ver sección 3.3.1 de esta tesis) se utilizaron para visualizar y evaluar las monocapas de OTE producidas y que se usaron en los depósitos de LB de OTE sobre mica. En mi conocimiento, una observación directa de esta monocapa no ha sido reportada anteriormente.

Las imágenes de MAB muestran que la hidrólisis y la polimerización de las moléculas de OTE ocurren casi instantáneamente una vez que las gotas de la solución de OTE tocan la subfase de agua cuando son esparcidas en esta, sin embargo, esto no evita la formación

de una monocapa y además, es posible que este proceso continúe durante la evaporación del cloroformo y el acomodo de la monocapa en la interfase aire-agua.

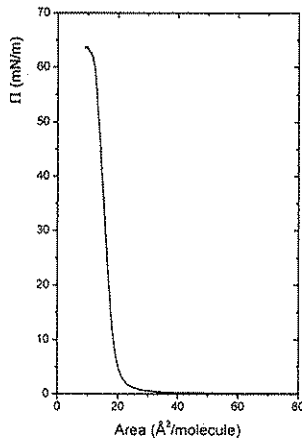


Figura 4.2. Isoterma típica de OTE a 23 °C.

En la figura 4.3 se presentan imágenes de MAB de una monocapa de OTE a diferentes presiones laterales. En la figura 4.3a se observa, a lo largo de todo el campo visual del microscopio ($\sim 850 \mu m$), a la monocapa como una red finamente tejida. En este caso la presión lateral, Π , es cero y el área, a , es $60 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$. Si uno observa detenidamente, se puede ver que en la monocapa existen pequeños hoyos, los cuales se vuelven más pequeños al incrementar la presión lateral. En la figura 4.3b, la monocapa se encuentra a $\Pi \sim 25 \text{ mN/m}$ y $a = 19 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ y esta parece estar compuesta, a la resolución del MAB, por grandes y homogéneos dominios casi sin hoyos, cuyos tamaños son del orden de milímetros.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

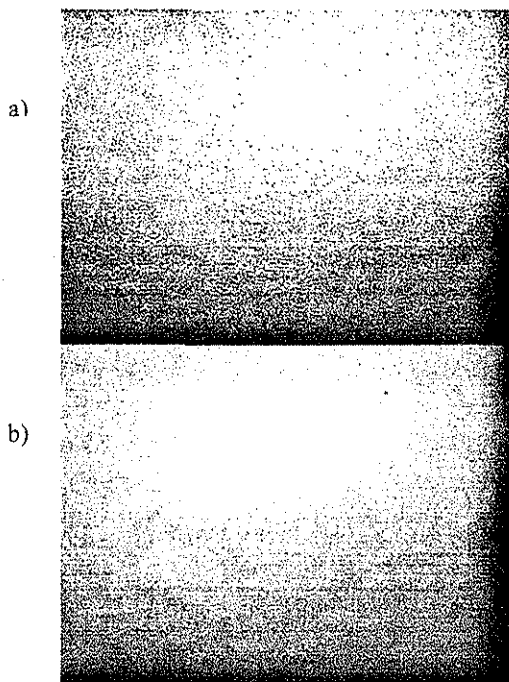


Figura 4.3. Imágenes de MAB de monocapas de OTE a diferentes presiones laterales, a 25°C . a) $\Pi \sim 0$ y $a = 60 \text{ \AA}^2/\text{molec}$. b) $\Pi \sim 25 \text{ mN/m}$ y $a = 19 \text{ \AA}^2/\text{molec}$. En todas las figuras de MAB la distancia horizontal corresponde a $850 \mu\text{m}$.

Puede llegar a ocurrir que a $\Pi > 0 \text{ mN/m}$ las monocapas de OTE presenten extensas áreas donde estos dominios planos polimerizados no cubren homogéneamente la interfase aire-agua. Esto representa un problema para lograr obtener depósitos homogéneos por LB. Estas zonas defectuosas usualmente se forman en las primeras etapas de la polimerización, cuando se esparce la solución de OTE en la subfase de agua, y son debidas a la formación de dominios polimerizados irregulares y a la rigidez de la monocapa. Si una monocapa con estas zonas defectuosas es comprimida, la mayoría de los dominios parecen juntarse haciendo las zonas defectuosas más pequeñas hasta que llegan a desaparecer. Sin embargo, puede ocurrir que aun después de comprimir la monocapa todavía queden zonas defectuosas. Esto solo puede observarse con el MAB pues la sensibilidad con la que se mide la presión superficial no permite observar en la isoterma algún cambio apreciable.

En la figura 4.4 se presentan varios ejemplos de lo descrito anteriormente. En la figura 4.4 a, a $\Gamma=0$, la película presenta grandes dominios polimerizados homogéneos similares a los descritos anteriormente, pero aquí algunas áreas de la subfase no están cubiertas por estos dominios. Estas áreas que no están bien cubiertas se asemejan a la coexistencia gas-fase condensada que se encuentra en tensoactivos cuando son observados con el MAB. En las figuras 4.4b y 4.4c, se muestran un par de ejemplos donde estos dominios planos no cubren adecuadamente la subfase, y como esta situación persiste a presiones laterales altas. En la experiencia desarrollada al trabajar con esta monocapa de OTE se encontró que siempre se obtenían películas más homogéneas cuando usábamos soluciones de OTE diluidas (menores a 1.2 mg/ml) en combinación con un esparcimiento de esta solución sobre la subfase lo más homogénea y cuidadosamente posible.

4.5.3 Imágenes de Microscopía de Fuerza Atómica de OTE en mica.

En las figuras 4.5 y 4.6 se muestran imágenes de MFA (modo contacto, en aire) de monocapas de OTE depositadas sobre mica, las cuales se transfirieron a $\Gamma=10 \text{ mN/m}$ y $\Gamma=12 \text{ mN/m}$, respectivamente. Aquí hay que notar que en estas figuras se tiene una muy diferente escala de la que se tiene en la imágenes de MAB que se describieron anteriormente (aproximadamente uno o dos ordenes menos que en el caso de MAB). En ambas figuras se pueden observar grandes dominios de OTE que están cubriendo a la mica, los cuales son planos y semicirculares.

Estas imágenes son similares a las que Wood y Sharma³⁶ obtienen. Así mismo, estas imágenes y las que se obtuvieron por MAB apoyan la idea general^{6,46} de que cuando se tiene una monocapa de OTE en la interfase aire-agua a áreas moleculares relativamente grandes ($a > 25 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, $\Gamma=0 \text{ mN/m}$), la película esta compuesta por islas aisladas formadas por moléculas de OTE polimerizadas, similares a una fase condensada, rodeadas por una fase gaseosa. Esta situación recuerda la transición de fase gas-fase condensada que se encuentra en sistemas anfífilicos convencionales. Los dominios

⁴⁶ Bourdieu, L.; Daillant, J.; Chatenay, D.; Braslau, A.; Colson, D. *Phys. Rev. Lett.* **1994**, *72*, 1502-1505.



condensados y la fase gaseosa deben estar tanto en equilibrio térmico como químico debido a la reacción de polimerización.

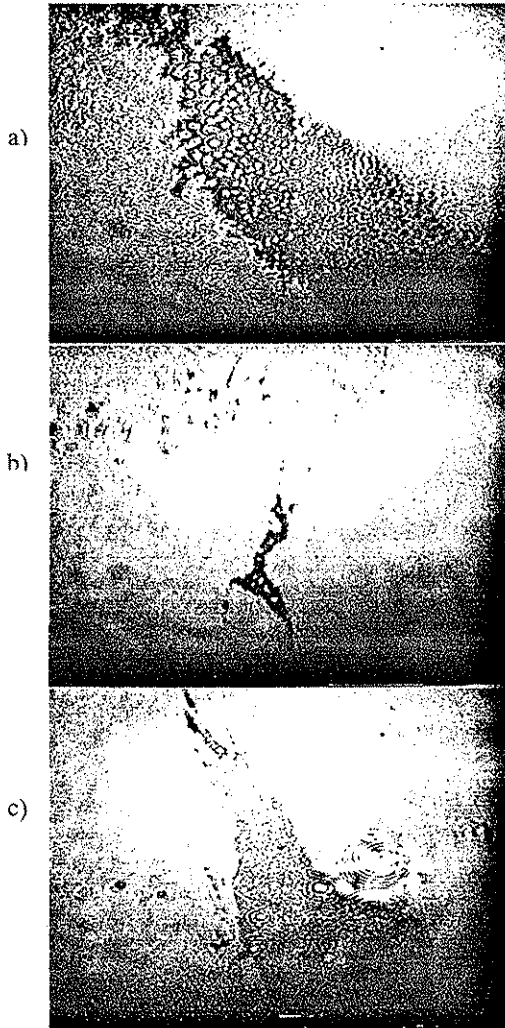


Figura 4.4. Imágenes de MAB de monocapas de OTE que muestran una cobertura no homogénea, a diferentes presiones laterales y a 25°C . a) $\Pi=0 \text{ mN/m}$. y $a=47 \text{ \AA}^2/\text{molec}$. b) $\Pi=15 \text{ mN/m}$. c) $\Pi=20 \text{ mN/m}$.

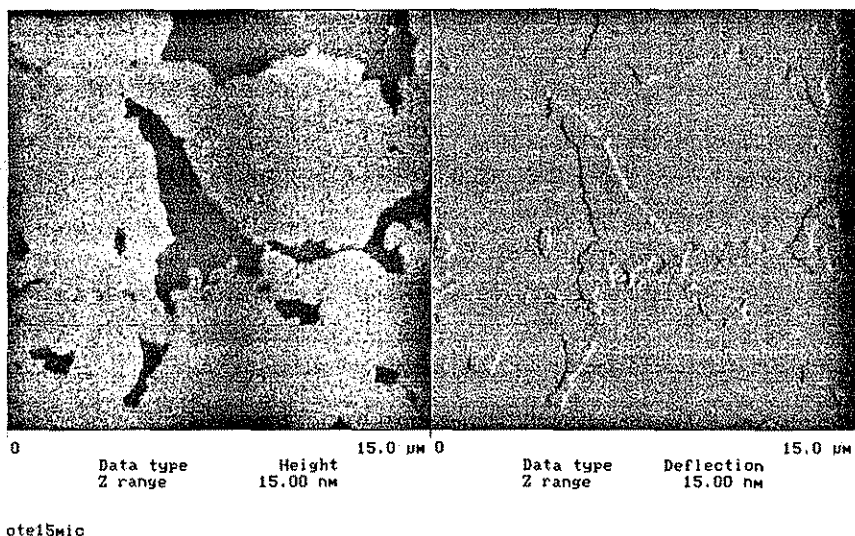


Figura 4.5. Imágenes de MFA en modo contacto ($15 \mu\text{m} \times 15 \mu\text{m}$ de área de barrido), de mica activada cubierta con una monocapa de OTE. a) Imagen de altura. b) Imagen de deflexión. La monocapa fue transferida a $\Pi=10 \text{ mN/m}$ y a 23°C . Se observa claramente la formación de los dominios de las fases condensada y gaseosa previos a la transferencia.

Por lo tanto, se puede concluir que el aumento de la presión superficial que se observa en la isoterma, a áreas menores a $25 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, ocurre cuando estos dominios (islas) son forzados a juntarse. Si se realiza un análisis de altura de las imágenes, se puede observar que la diferencia de altura entre la fase condensada y la fase gaseosa es de aproximadamente $1.2 \pm 0.4 \text{ nm}$ (este valor se obtuvo a partir de mediciones en varias muestras y posiciones). Sin embargo, la altura de los grandes dominios circulares es *ca.* $2.2 \pm 0.2 \text{ nm}$ cuando se midieron usando el AFS (ver sección 4.5.4). Estas superficies hidrofóbicas son bastante estables y pudieron utilizarse y estudiarse durante varios días sin que se les apreciara algún cambio (el único cuidado que se tuvo con ellas fue que se guardaron en un desecador para evitar su contaminación y la acumulación de humedad).

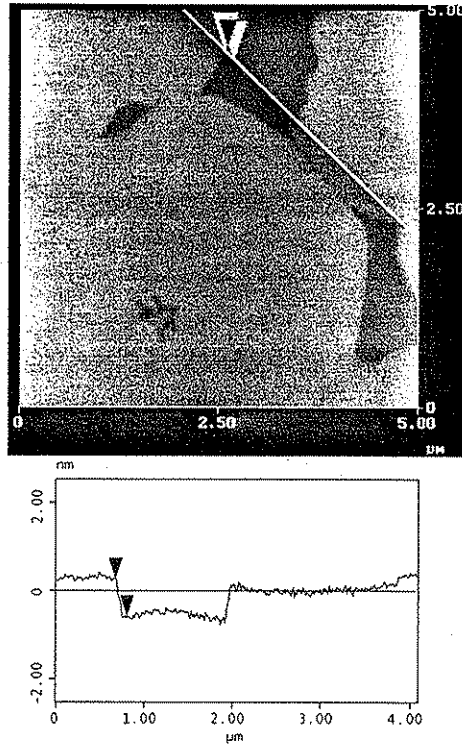


Figure 4.6. Imágenes en modo contacto de MFA de mica activada cubierta con una monocapa de OTE y un perfil de altura de la línea que atraviesa la imagen. La diferencia de altura entre las flechas, para este perfil en particular, es de 0.83 nm . La monocapa fue transferida a $\Pi=12 \text{ mN/m}$ y a $23 \text{ }^\circ\text{C}$.

La estabilidad de la monocapa posiblemente sea debida a los enlaces covalentes entre la superficie y la monocapa. Recientemente, Kim *et al.*,⁴⁷ encontraron que agua podía adsorberse en monocapas de OTE formadas por autoensamblaje. En este caso, para una humedad dada, el grosor de la capa de agua siempre se reducía drásticamente si las superficies recibían el tratamiento por plasma antes de que la monocapa se depositara. Esta reducción parece deberse al hecho de que la monocapa era más estable y estaba mejor anclada a la superficie muy probablemente a través de enlaces covalentes, como parece ser nuestro caso.

⁴⁷ Kim, S.; Christenson, H. K.; Curry, J. E. *Langmuir* **2002**, *18*, 2125-2129.

Con respecto a la discusión de las imágenes obtenidas por MAB se debe hacer un importante comentario, ya que se puede concluir fácilmente que una mejor y más homogénea película de LB se obtiene a una mayor presión de transferencia de la monocapa, i. e. a altas presiones existen menos defectos en la monocapa. Sin embargo, barridos de MFA de muestras en las cuales se depositó una monocapa a presiones laterales mayores a $\sim 15 \text{ mN/m}$ muestran que parte del material que forma la monocapa es enviado hacia fuera de esta, formando algo como agregados tridimensionales que se encuentran de manera irregular sobre la monocapa y cuyos diámetros son del orden de los $50\text{--}100 \text{ nm}$ y sus alturas pueden llegar hasta aproximadamente 7 nm .

Estos agregados se ven como pequeños puntos brillantes en las imágenes de MFA (modo de contacto intermitente en aire) que se presentan en la figura 4.7. Agregados similares a estos han sido observados en monocapas de OTE formadas por autoensamblaje⁴² y en películas de LB de heptadecafluorotetrahidrodeciltrióxosilano depositadas en vidrio fundido.⁴⁸ En ambos casos, su presencia fue explicada como resultado de una polimerización tridimensional en la solución que se prepara antes de la hidrólisis de los compuestos. Estos agregados no pueden ser vistos con el MAB debido al bajo contraste que presenta la monocapa de OTE y a la limitada resolución espacial del MAB ($<4 \mu\text{m}$). Sin embargo, lo que sí se pudo observar algunas veces con el MAB en las monocapas de OTE que se realizaron, fueron oscilaciones localizadas⁴⁹ y abombamientos (buckling),⁴⁶ lo cuales son considerados mecanismos de expulsión de material fuera de las monocapas debajo de la temperatura de colapso y que han sido observados en monocapas rígidas. Desafortunadamente, en la isoterma medidas y debido a la sensibilidad con que se mide la presión lateral, y a la rigidez de la monocapa, no siempre es posible advertir cambios significativos en estas provocados por la presencia de material polimerizado.

⁴⁸ Ohnishi, S.; Ishida, T.; Yaminsky, V. V.; Christenson, H. K. *Langmuir*. **2000**, *16*, 2722-2730.

⁴⁹ Galvan-Miyoshi, J.; Ramos, S.; Ruiz-García, J.; Castillo, R. *J. Chem. Phys.* **2001**, *115*, 8178-8184.

Sin embargo, a veces es posible observar un cambio relativamente grande en el área en la cual se empieza a incrementar rápidamente la presión y esto si puede relacionarse con la presencia de material polimerizado en la solución de OTE en cloroformo que se utilizó para formar la monocapa.

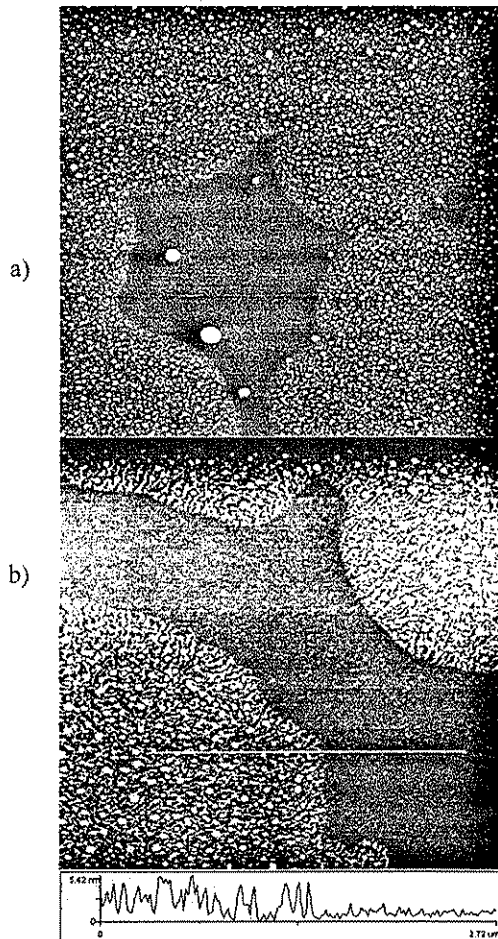


Figura 4.7. Imágenes de MFA en modo contacto intermitente de monocapas de OTE sobre mica con agregados 3D que sobresalen de la misma. a) Imagen de $5 \times 5 \mu\text{m}$ de una monocapa transferida a 12 mN/m , donde la solución de OTE prepolimerizada estuvo expuesta a trazas de agua. b) Imagen de $6 \times 6 \mu\text{m}$ de una película de OTE similar a la presentada en (a), excepto que aquí la solución de OTE fue filtrada; la transferencia también fue a 12 mN/m .

Estos agregados tridimensionales son encontrados raramente, como se ven las figuras 4.5 y 4.6, cuando las transferencias se realizan a presiones laterales menores a $11-10-12$ mN/m , y cuando la solución de OTE prepolimerizado se maneja con extremo cuidado. En particular, se deben evitar cualquier traza de agua pues esta es la que produce los pequeños cúmulos polimerizados. Como resultado de todo el trabajo realizado para esta tesis se ha encontrado que para estar seguros de producir una superficie de OTE limpia es indispensable que todas las operaciones de la preparación de la solución de OTE en cloroformo se realicen bajo una atmósfera de nitrógeno.

La figura 4.7a muestra una imagen de OTE en mica, la cual fue depositada a $11=12$ mN/m , y en donde la solución de OTE prepolimerizada fue expuesta a trazas de agua; los agregados se observan como pequeños puntos brillantes. El filtrado de la solución prepolimerizada a través de filtros de $0.020 \mu m$, antes de esparcirla sobre la subfase de agua, ayuda a disminuir el número de agregados. Sin embargo, como se puede observar en la figura 4.7b no es posible eliminarlos todos. En esta imagen, las fases condensadas y gaseosas están bastante claras, y confirman el hecho de que en la fase gas también hay una cobertura por el OTE de la mica, aunque con una densidad menor que en los dominios condensados. La figura 4.8 muestra una imagen de MFA de la fase condensada de OTE sobre mica con agregados. Aquí, estos agregados no están bien definidos en la imagen lo cual sugiere que son de una naturaleza suave y que al interaccionar con la punta del MFA no logran ser bien caracterizados. La figura 4.9 muestra una imagen de MFA (modo contacto intermitente, alta amplificación) de la fase gaseosa y en la cual se observa muy pocos agregados.

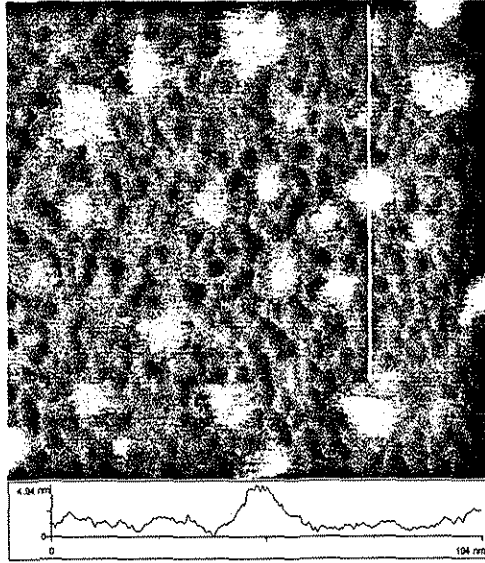


Figura 4.8. Imagen de MFA de $250 \times 250 \text{ nm}$ en modo contacto intermitente de la misma película de OTE de la figura 4.7 (a), donde se observan a los agregados que sobresalen sobre la fase condensada; la transferencia fue a 12 mN/m .

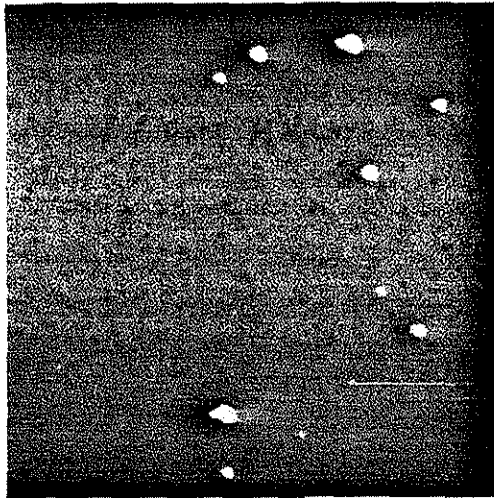


Figura 4.9. Imagen de MFA de $250 \times 250 \text{ nm}$ en modo contacto intermitente de la misma película de OTE de la figura 4.7 (b), donde se observa la escasa presencia de agregados que sobresalen sobre la fase gaseosa; la transferencia fue a 12 mN/m .

4.5.4 Fuerzas entre superficies hidrofóbicas.

4.5.4.1 Preparación de las superficies hidrofóbicas de OTE para el AFS.

Las superficies hidrofóbicas de OTE utilizadas en el AFS se prepararon de acuerdo al procedimiento de Wood y Sharma⁶ descrito en la sección 4.3 y fueron evaluadas por medio de MFA utilizando una superficie testigo la cual se preparo junto con las que se usaron para el AFS. La hidrofobicidad de la superficies producidas se verificó mediante los ángulos de contacto de avance y retroceso de una gota de agua en estas superficies, los cuales siempre fueron mayores a 100° , lo cual confirma el alto grado de hidrofobicidad de estas superficies.

4.5.4.2. Procedimiento experimental para mediciones de fuerzas superficiales entre superficies hidrofóbicas utilizando el AFS.

Los principios en los que se basa las mediciones de fuerzas con el AFS y una mayor descripción de la técnica del AFS se encuentra en el capítulo 3 de esta tesis, aquí solo se da una descripción muy general del procedimiento experimental.

El AFS, equipado con una cámara de gran volumen (400 ml), fue desarmado y todas sus partes interiores fueron enjuagadas con agua, etanol y posteriormente secadas con nitrógeno ultrapuro antes de armarlo nuevamente. Las superficies de mica, ya listas para ser usadas en el AFS, fueron pegadas sobre los discos ópticos de sílice semicilíndricos e inmediatamente después montadas en el AFS. El armado del instrumento y la preparación de las superficies fueron realizados en un cuarto limpio, bajo condiciones esencialmente libres de polvo.

Una vez que las superficies están colocadas en el AFS se realiza la medición de la posición de contacto mica-mica en aire. Si el contacto se encontraba con la adhesión característica de mica-mica y libre de partículas, la superficies se desmontaban del AFS y se realizaba el depósito de OTE como se describió anteriormente. Terminado este proceso, los discos de sílice con la mica vuelta hidrofóbica fueron nuevamente montados en el AFS y se determinó el valor del grosor de la monocapa de OTE que fue depositada, el cual fue comparado con el valor reportado⁶ de 21 \AA . Posteriormente, el aparato fue volteado con el puerto lateral hacia arriba para poder aspirar la interfase aire-líquido durante el llenado de agua y para asegurar que la interfase aire-agua pasara las superficies

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

de la mica hidrofóbica lo más rápido posible. Previamente, el agua fue degasada por medio de una ebullición bajo vacío durante varias horas antes de que se usara en el AFS. Mediante este procedimiento se reducen las posibilidades de contaminación así como el riesgo de que burbujas de aire se peguen a la superficie hidrofóbica. La posición de contacto y una curva de fuerza fueron entonces registradas en agua para verificar que el sistema fuese limpio. Todas las mediciones fueron realizadas a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.5.4.3 Interacción entre superficies hidrofóbicas de OTE en agua.

La figura 4.10 muestra curvas representativas de la fuerza de interacción entre dos superficies hidrofóbicas de OTE en agua. Este tipo de curvas fueron encontradas en varios experimentos. Como se puede observar, la interacción entre las superficies debajo de 250 \AA de distancia de separación es repulsiva. La magnitud de estas fuerzas repulsivas se incrementa con la disminución de la separación entre las superficies hasta que las superficies saltan a contacto a cierta separación. En algunas mediciones la existencia de una fuerza atractiva no se observa claramente y la interacción parece ser puramente repulsiva. Sin embargo, si las superficies en estos casos se dejaban a una distancia de separación pequeña, observamos que muy lentamente pero espontáneamente las superficies se movían a contacto. El espesor de la capa de OTE, obtenido a partir de la nueva posición de contacto con respecto a la posición de contacto de la superficie pura de mica, fue de 21 \AA en cada superficie. Este valor está de acuerdo con los valores medidos previamente en aire. Cuando las dos superficies en contacto eran separadas la adhesión medida fue de 230 mN/m . En un acercamiento consecutivo, después de que las superficies habían estado en contacto, la repulsión generalmente comenzaba a una separación de las superficies más pequeña. Por otro lado, si las superficies no eran llevadas a contacto en el primer acercamiento, la fuerza repulsiva era idéntica en el segundo acercamiento. Así mismo, en esta figura se muestra una curva que se obtuvo en otro experimento y con otras superficies de OTE, en esta curva se puede observar que aunque la fuerza repulsiva es similar a las curvas de las otras superficies pero aquí las superficies brincaron a contacto desde 170 \AA de separación y a una fuerza de 1 mN/m . Estas curvas no son iguales a la reportadas por Wood y Sharma³⁶ en donde ninguna fuerza fue observada hasta que las superficies brincan a contacto a una separación de las

superficies de 200 \AA . Esta discrepancia entre nuestros resultados y los de Wood y Sharma se discute a continuación.

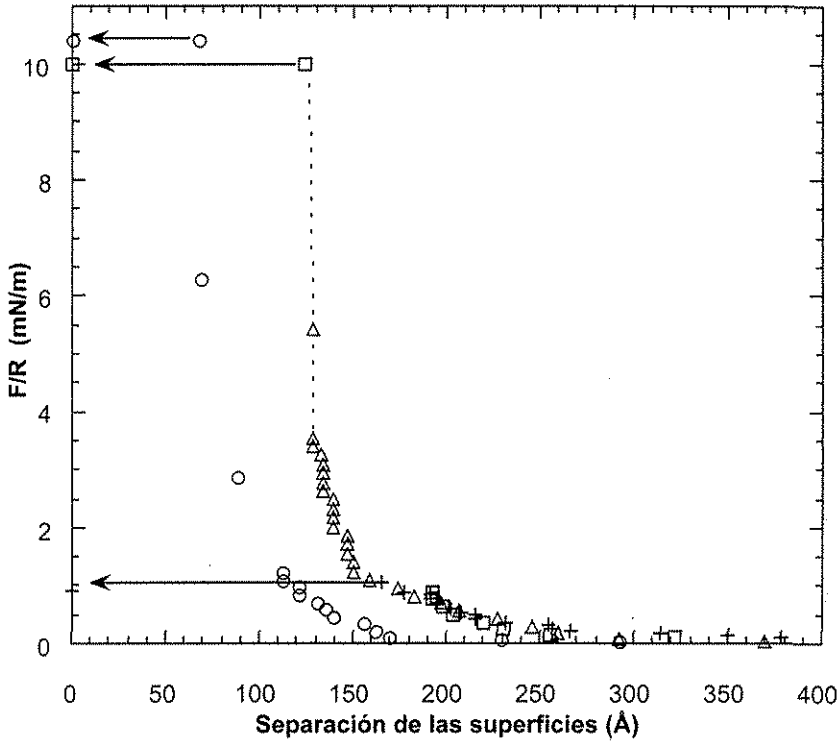


Figura 4.10. Curvas de fuerza, F (normalizadas por el radio de curvatura, R), contra distancia para tres acercamientos consecutivos, en la misma posición, de dos superficies de OTE a $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$. La separación de las superficies de 0 \AA , corresponde al contacto OTE-OTE, el cual está a 42 \AA del contacto mica-mica. En el primer acercamiento (Δ), la fuerza es puramente repulsiva y no se encontró ninguna fuerza de adhesión. En el segundo acercamiento (\square), las superficies brincan a contacto OTE-OTE desde 124 \AA y a una fuerza de 11.6 mN/m . En el tercer acercamiento (\circ), la fuerza repulsiva es considerablemente más débil y las superficies brincan a contacto desde 68 \AA a una fuerza aplicada de 6.3 mN/m . Para comparar, también se incluye el primer acercamiento de otro experimento (+) en donde se midió la interacción de fuerzas entre superficies de OTE. Para todos los experimentos la adhesión medida fue de aproximadamente 230 mN/m .

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Explicar el origen de estas observaciones no es sencillo. La fuerza repulsiva medida parece indicar la existencia de cargas expuestas de la superficie, sin embargo, las curvas de fuerzas repulsivas encontradas no pueden ser ajustadas una fuerza electroestática de doble capa y además las imágenes de MFA analizadas en la sección 4.4.3 (ver especialmente figura 4.6) muestran que hay una completa cobertura de la mica. Un origen de la fuerza repulsiva también puede ser la presencia de un exceso de material en la superficie (como el que se observa en las imágenes de MFA descritas anteriormente), el cual causa una repulsión estérica. Sin embargo, si fuera este el caso, no esperaríamos tener una posición de contacto que correspondiera a una monocapa de OTE en cada superficie. Aunque por otro lado, hay que considerar que estos agregados o excesos son bastante suaves y quizás durante el brinco atractivo hacia contacto son deformados o expelidos del área de contacto. La presencia de estos agregados en las superficies usadas es posible ya que aunque siempre se usaron superficies como las que se ven en la figuras 4.5 y 4.6, la máxima área de observación es de $15 \times 15 \mu\text{m}$ y la probabilidad de que existan unos cuantos de estos en toda el área de contacto ($50 \times 50 \mu\text{m}$) no puede descartarse. Una fuerza repulsiva similar a las que observamos fue encontrada en el primer acercamiento en aire entre superficies de OTE formadas por autoensamblaje.⁴² En este caso subsecuentes acercamientos en la misma posición ya no presentaban una interacción de largo alcance. Aquí, la explicación que dan los Kessel y Granick, es que la repulsión tiene un origen electroestático pero, en realidad, mas parece que fuera el resultado de eliminar el exceso de material formado durante la adsorción desde la solución.

Por otro lado, la presencia en las curvas medidas de una fuerza atractiva (los brincos espontáneos) que lleva a las superficies hacia contacto, sugiere la presencia de vapor atrapado o burbujas de aire en la posición de contacto, las cuales forman un puente entre las superficies que se manifiesta con una fuerza atractiva.^{7,26} Esta fuerza surge porque es más favorable reemplazar la costosa interfase líquido-vapor por la interfase sólido-vapor, y una vez que ocurre la atracción las burbujas se esparcen lateralmente.²⁶ La presencia de micro burbujas ha sido reportada antes con otras superficies hidrofóbicas similares a las

que utilizamos nosotros^{26,30,50,51,52,53}, pero en esos casos una fuerza atractiva de largo alcance (~ 100 nm) infiere la presencia de estas.

Imágenes recientes de MFA (en modo tapping) de superficies hidrofóbicas en agua revelan que estas superficies están cubiertas de dominios suaves, interpretadas como nanoburbujas, las cuales tienen una forma irregular y están densamente empacadas sobre la superficie.⁵³ Tales características no fueron vistas cuando las superficies fueron observadas en modo de contacto. En este mismo estudio,⁵³ se encontró que el radio de curvatura de estas burbujas estaba en el orden de 199 nm con una altura por arriba del sustrato de 20 – 30 nm. La forma irregular y no circular de estas nanoburbujas podría explicar su presencia en superficies hidrofóbicas, ya que las nanoburbujas con forma esférica están en contra de la termodinámica convencional, la cual predice que estas deben disolverse rápidamente debido a la alta presión de su gas interno que evita que exista un equilibrio con el medio.⁷ Al igual que en nuestro caso, la curva de fuerza registrada en ese estudio,⁵³ también presentaba un fuerza repulsiva antes de que las superficies saltaran a contacto suave. Esta fuerza repulsiva no era electrostática pues tenía una longitud de decaimiento de unos 25 nm, lo cual es inferior al valor esperado de una fuerza electrostática de doble capa. Una explicación a esta repulsión es que esta se debe a un efecto hidrodinámico del drenado del agua al ser desplazada de la superficie por la burbuja.

Con respecto a los resultados obtenidos en esta tesis, la variabilidad en el punto donde ocurre la atracción espontánea (ver figura 4.10), lo cual no es característico de una fuerza en equilibrio, bien puede ser otra indicación de burbujas en la superficie ya que diferentes tamaños de burbujas en diferentes experimentos y posiciones deben dar diferentes intervalos de atracción, como es lo que ocurre en nuestro caso (en especial comparar los

⁵⁰ Carambassis, A.; Jonker, L. C.; Attard, P.; Rutland, M. W. *Phys. Rev. Lett.* **1998**, *80*, 5357-5360.

⁵¹ Ishida, N.; Sakamoto, M.; Miyahara, M.; Higashitani, K. *Langmuir* **2000**, *16*, 5681-5687.

⁵² Ishida, N.; Inoue, T.; Miyahara, M.; Higashitani, K. *Langmuir* **2000**, *16*, 6377-6380.

⁵³ Tyrell, J. W. G.; Attard, P. *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *87*, 176104-1-176104-4



brincos entre los diferentes experimentos). Estas burbujas podrían estabilizarse gracias a la presencia de las pequeñas irregularidades o defectos que se observan en las superficies (ver imágenes de MFA, los bordes entre los dominios de la fase condensada y la fase gaseosa pueden ser lugares en los que se puede anclar una micro burbuja y aun más si existen agregados). La presencia de estas burbujas no es de extrañarse puesto que aunque se realizó un proceso de degasado en el agua, la forma en que se llena la cámara del AFS no permite que las superficies crucen la interfase aire-agua lo suficientemente rápido para evitar su formación.

Cuando estas superficies se utilizaron para adsorber sobre ellas un lípido (monooleína, MO), las curvas de fuerza fueron cambiando conforme transcurría el tiempo de adsorción, ver figura 4.11. Las curvas de fuerza obtenidas después de 24 y 48 h fueron similares a la curva de fuerza medidas antes de la adición de MO. Después de 72 h, observamos un cambio en la interacción medida. La repulsión observada había disminuido considerablemente y las superficies saltaron hacia contacto hidrofóbico, *i.e.* hasta la monocapa de OTE, desde una separación de 185 Å. En este caso, la adhesión medida al separar las superficies fue de 260 mN/m. Esta curva de fuerza es similar a las que reportaron Wood y Sharma.³⁶ Como se discutió previamente esto apoya la idea de que la presencia de burbujas de aire y/o exceso de material sean el origen de la fuerza repulsiva. La presencia de MO reduce la tensión interfacial gas-agua y facilita que el agua moje las superficies hidrofóbicas, con lo que se desestabiliza cualquier burbuja en la superficie. Explicar, el efecto de MO sobre el exceso de material no es fácil, pero se puede considerar que dada su naturaleza suave estos también son removidos, "lavados", por la MO de la superficie.

Resumiendo, dado que en nuestro caso siempre se observó un espesor de la capa de OTE de 21 Å, una reducción del intervalo de la fuerza de repulsión a medida que se repetían los acercamientos de las superficies, una variabilidad en los brincos espontáneos y además, que la fuerza repulsiva casi desaparece en presencia de MO, se puede concluir, tomando en cuenta además las imágenes de MFA, que la fuerza repulsiva es causada por un exceso de material y/o burbujas de aire o vapor los cuales son removidos de las superficies cuando estas son llevadas a contacto o en la presencia de un tensoactivo.

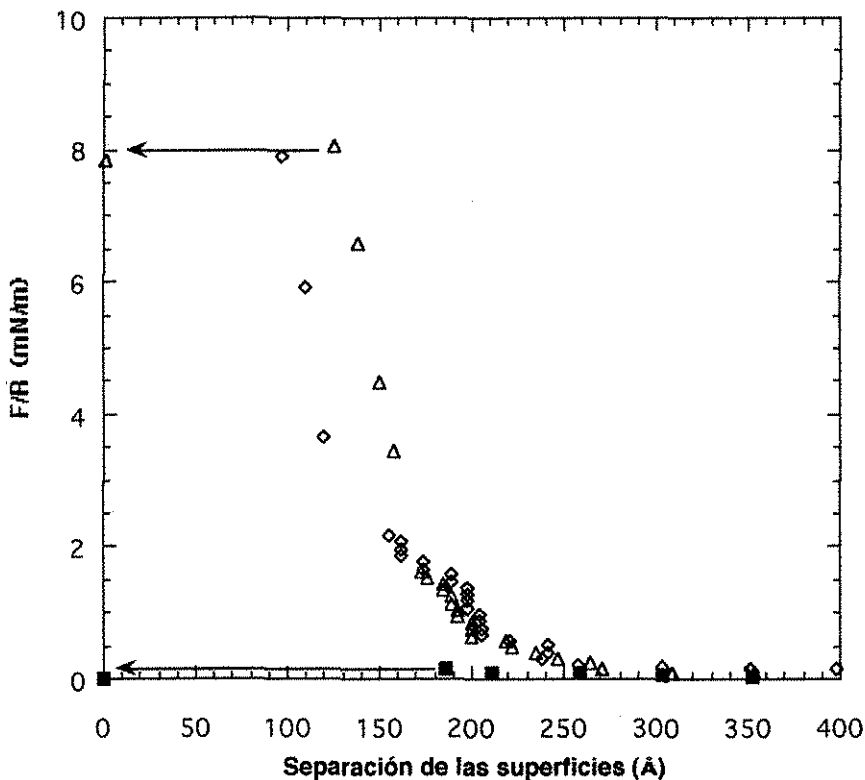


Figura 4.11. Curvas de fuerza, F (normalizadas por el radio de curvatura R), contra distancia para tres acercamientos consecutivos, en la misma posición, de dos superficies de OTE a $T=20\text{ }^\circ\text{C}$ después de haber agregado un cristal de MO en la cámara del AFS. La curva medida después de 24 h (\diamond) es similar a las curvas medidas antes de adicionar MO. La curva después de 48 h (Δ) es similar a la anterior pero aquí las superficies brincan a contacto OTE-OTE desde 124 \AA a una fuerza de 8 mN/m . Después de 72 h (\blacksquare), se observa una disminución significativa de la fuerza de repulsión y las superficies brincan a contacto OTE-OTE desde una distancia de 185 \AA y a una fuerza de 0.2 mN/m . La adhesión medida al separar las superficies fue de 260 mN/m .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.6 Conclusiones.

Algunas importantes conclusiones se pueden obtener del trabajo realizado con las superficies hidrofóbicas de OTE. Una de ellas, es el énfasis que hay que hacer en la comunidad que se dedica a la investigación de superficies e interacciones hidrofóbicas, de que para lograr medir las fuerzas entre superficies hidrofóbicas es importante y necesario caracterizar las superficies que se usan en los experimentos (de ahí la importancia de técnicas como la MAB y MFA), ya que con esto muchas de las observaciones pueden entenderse de una mejor manera sin tener que suponer o proponer nuevos efectos o interacciones. En nuestro particular caso, esta claro que con los silanos es necesario un extremo cuidado en el proceso de preparación de las superficies, en especial en la prepolimerización que se puede dar en las soluciones que se usan para formar ya sea las monocapas, las películas de LB, o los depósitos por autoensamblaje.

Es difícil dar una conclusión en cuanto a la *interacción "hidrofóbica" de largo alcance*, pero el hecho de que el intervalo y la magnitud de la fuerza hayan disminuido en las diferentes mediciones nos dice que la interacción es más un efecto de las características de las superficies (ya sea porque había un exceso de material o por la presencia de burbujas) que de la propia interacción hidrofóbica entre las moléculas que las conforman. Obviamente, es necesario más trabajo con estas superficies hidrofóbicas para poder dar una conclusión definitiva.

Otro aporte importante de este trabajo es que, aunque no se logro medir de una manera directa la interacción hidrofóbica, si se lograron producir superficies lo suficientemente hidrofóbicas, estables, homogéneas y planas para ser usadas como sustrato para adsorber proteínas y lípidos, y utilizarse tanto en el AFS como en MFA. Esto se demostrará en los capítulos siguientes donde se exponen los resultados de usar estas superficies en dos diferentes experimentos de adsorción de lípidos y proteínas.

5.- Interacción entre capas adsorbidas de *monooleína* y la acción de una proteína *lipasa* en las capas formadas.

Los lípidos son moléculas muy importantes en cualquier forma de vida. Por ejemplo, los fosfolípidos son el principal elemento estructural de las membranas celulares de la mayoría de los organismos, mientras que los triglicéridos junto con los carbohidratos y las proteínas, son la principal fuente de energía en las plantas y los animales. Para poder metabolizar a los lípidos, son necesarias las enzimas (proteínas) hidrolasas ester carboxílicas (esterasas). Estas enzimas catalizan la hidrólisis de los enlaces carboxil y ester de los lípidos produciendo ácidos y alcoholes. El grupo de las esterasas responsable de la hidrólisis de un triglicérido de cadena larga en di- y monoglicéridos, ácidos grasos libres, y glicerol en la interfase aceite/agua son conocidas como triacilglicerol lipasas (Comisión Enzimática de la Unión Internacional de Bioquímica 3.1.1.3).

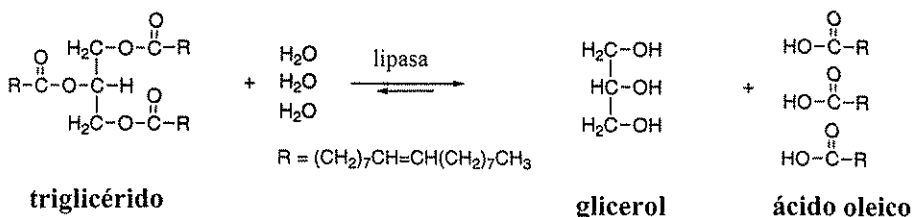


Figura 5.1. Hidrólisis catalizada por una lipasa de un triglicérido en glicerol y ácido oleico.

Las lipasas son enzimas solubles en agua que se encuentran en diferentes líquidos corporales en mamíferos (*e.g.* jugo pancreático, plasma sanguíneo, saliva y leche), en plantas productoras de triglicéridos, en hongos y en microorganismos.¹ La producción de lipasas se ha vuelto una importante operación industrial con aplicaciones en, *e.g.*, detergentes, procesamiento de alimentos, papel, industria farmacéutica, industria oleoquímica, preparación de piel, industria de lácteos, y en la industria química especializada.² La lipólisis (rompimiento de lípidos) catalizada por lipasas es una

¹ Schmid, R. D.; Verger, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1608.

² Svendsen, A. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1543*, 223-238.

reacción compleja que involucra varias etapas como son unión, orientación y activación de la lipasa, unión de la molécula sustrato al sitio activo y la reacción catalítica en sí misma.^{2,3} Las lipasas son un grupo especial de esterasas que presentan el fenómeno conocido como activación interfacial, *i.e.*, su actividad enzimática se ve favorecida en la interfase lípido-agua. La actividad de las lipasas es muy baja en sustratos (lípidos) monoméricos, pero se incrementa fuertemente cuando el sustrato alcanza concentraciones arriba de su nivel de saturación, en donde los lípidos pueden existir en la forma de diferentes agregados (ver figura 5.2).

La mayoría de los lípidos tienen baja solubilidad en agua y cuando son dispersados en una solución acuosa forman diversas estructuras autoensambladas como son micelas, emulsiones, cristales líquidos, vesículas, etc. Se ha encontrado que la actividad lipolítica de las lipasas es extremadamente dependiente de las propiedades de la interfase lípido-agua,^{4,5} *i.e.*, de la estructura y organización lateral de las estructuras autoensambladas de los lípidos.

Aunque en estos días existe un conocimiento más o menos avanzado sobre la estructura de las lipasas, aun es poco lo que se conoce sobre la estructura de los lípidos y su relación en la interacción lípido-enzima. Con la intención de lograr un mejor entendimiento de esta interacción utilizamos el aparato de fuerzas de superficies (AFS) para estudiar la interacción de fuerzas entre un sustrato, monooleína (MO), mientras esta sujeto a una lipólisis catalizada por la enzima lipasa *Thermomyces* (anteriormente *Humicula*) *lanuginosa* (TLL, por sus siglas en inglés).

³ Panaiotov, I.; Verger, R. In: Baszkins, A.; Norde, W. (Eds.) *Physical Chemistry of Biological Interfaces*, Marcel Dekker, New York, **2000**, 359-400.

⁴ G. H. Peters, U. Dahmen-Levison, K. de Meijere, G. Brezesinski, S. Toxvaerd, H. Möhwald, A. Svendsen, P. K. J. Kinnunen *Langmuir*, **16** (2000) 2779-2788.

⁵ Y. Cajal, A. Svendsen, J. De Bolós, S. A. Patkar, M. A. Alsina *Biochimie*, **82** (2000) 1053-1061.

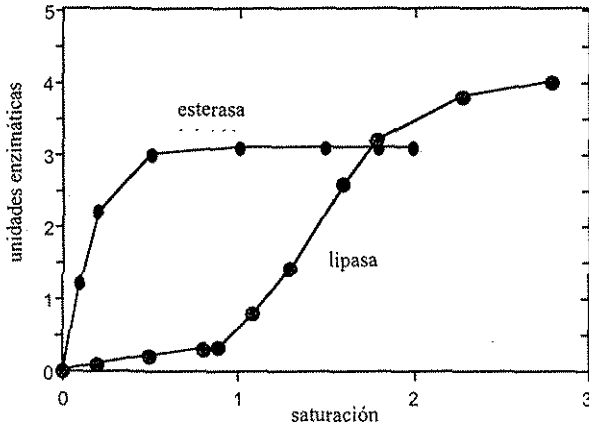


Figura 5.2. Activación interfacial de una lipasa porcina pancreática triglicérida (PTL). La actividad enzimática de una esterasa de hígado de caballo se compara con la de PTL como función del sustrato triacetina, la cual se expresa en múltiplos de saturación. Es claro que la actividad de PTL se incrementa enormemente en el punto de saturación del lípido, demostrando la habilidad de la PTL de activarse en la interfase lípido/agua. Adaptada de Sarda y Desnuelle,⁶ quienes propusieron el mecanismo de activación interfacial en 1958.

La razón por la que hemos escogido estudiar MO es porque si hubiésemos comenzado con el triglicérido, al sistema se hubiesen ido agregando más de cinco componentes adicionales (dioleína, monooleína, ácido oleico, oleato y glicerol) mientras transcurre el proceso lipolítico. Por lo tanto, nos hemos concentrado en el último compuesto digerible en esta reacción en cadena, que es MO. Así mismo, se realizaron estudios paralelos de elipsometría para cuantificar directamente tanto la cantidad adsorbida de MO en una superficie hidrofóbica, como el efecto de la lipasa en la adsorción superficial.

A continuación se da una mayor descripción del sustrato (MO) y de la lipasa (TLL) utilizadas en estos estudios, y se describen los resultados obtenidos tanto en el AFS como con la técnica elipsométrica.

⁶ Sarda, L.; Desnuelle, P. *Biochim. Biophys. Acta* 1958, 30, 513.

5.1 Lipasa *Thermomyces Lanuginosa*.

Las enzimas son proteínas con actividad biocatalítica. La específica secuencia de aminoácidos de cada proteína determina la estructura tridimensional de la enzima y consecuentemente su habilidad catalítica. Las enzimas pueden incrementar la velocidad de reacción por factores de por lo menos un millón de veces al reducir la barrera de transición energética. Cambios en la estructura de la enzima son, por lo común, destructivos en cuanto a la actividad enzimática. De hecho, la mutación de un aminoácido esencial para la reacción catalítica reduce significativamente la actividad. La ventaja de las enzimas, comparadas con los catalizadores químicos tradicionales, es su alta selectividad y que productos de una alta pureza pueden producirse a una temperatura de entre 20 y 40 °C usando un mínimo de reactivos.

La hidrólisis de los enlaces ester de gliceroles acilicos es catalizada por lipasas, las cuales son enzimas solubles en agua. Esta catálisis heterogénea toma lugar en una interfase, y por ello, uno frecuentemente habla de “activación interfacial” en conexión con la actividad de la lipasa.^{4,7} Esta activación interfacial involucra cambios estructurales en la enzima, donde una “tapa” (una estructura) que cubre el sitio activo es abierta cuando la lipasa es expuesta a la interfase lípido-agua, como se observa por *e.g.* en la lipasa *Thermomyces lanuginosa* (TLL),^{8,9} la cual fue usada en esta tesis. Ilustraciones tanto de la conformación inactiva como de la activa se pueden observar en la figura 5.3. La estructura de esta enzima fue encontrada por medio de rayos X en 1994 por Derewenda, *et al.*¹⁰ y por Lawson, *et al.* (con inhibidor).¹¹ La estructura encontrada en la

⁷ Verger, R. *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 32-38.

⁸ Brzozowski, A. M.; Savage, H.; Verna, C. S.; Turkenburg, J. P.; Lawson, D. M.; Svendsen, A.; Patkar S. *Biochemistry* **2000**, *39*, 15071-15082.

⁹ Cajal, Y.; Svendsen, A.; Girona, V.; Patkar, S. A.; Alsina M. A. *Biochemistry* **2000**, *39*, 413-423.

¹⁰ Derewenda, U.; Svenson, L.; Wei, Y.; Green, R.; Kobos, P. M.; Joerger, R.; Haas, M. J.; Derewenda, Z. S. *J. Lipid Res.* **1994**, *35*, 524-534.

¹¹ Lawson, D. M., Brzozowski, A. M.; Dodson, G. G.; Hubbard, R. E.; Hüge-Jensen, B.; Boel, E.; Derewenda, Z. S. En *Lipases-their biochemistry, structure and application* (Woley, P. Y Petersen, S., Eds.) Cambridge University Press., **1994**, *pages* 77-94.

TLL revela una tapa formada por nueve aminoácidos con una estructura α hélice. En la conformación activa una amplia superficie hidrofóbica es expuesta y que interactúa favorablemente con la interfase lípido/agua.

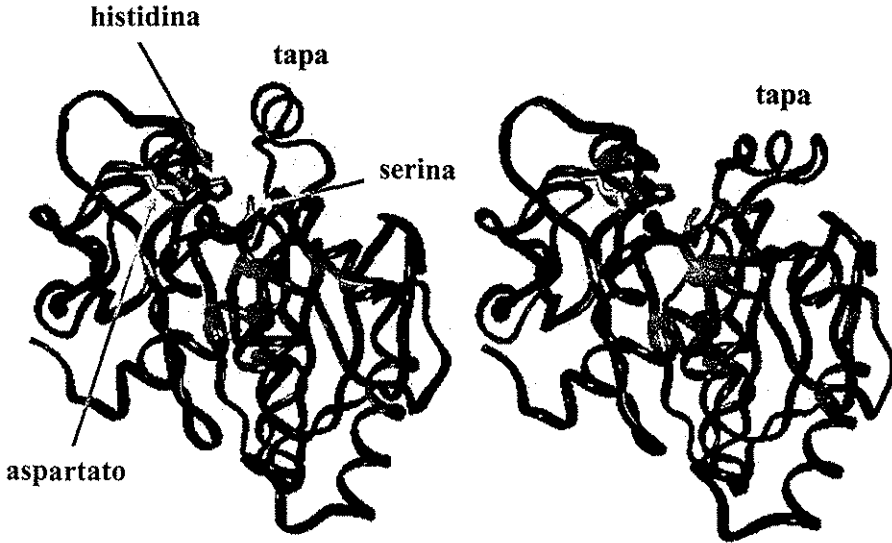


Figura 5.3. Conformaciones inactivas, izquierda, y activas (abierta), derecha, de la TLL.

Las lipasas pertenecen a la familia de las " $\alpha\beta$ hidrolasas", las cuales tienen principalmente láminas β paralelas rodeadas por α hélices en el sitio catalítico. Este sitio contiene una triada de aminoácidos compuesta por serina, histidina y aspartato o glutamato, a los cuales se une el triglicérido. El residuo serina, el cual es nucleofílico, está localizado en una vuelta "hairpin" entre una lámina β y una α hélice, en la boca de un largo y angosto túnel hidrofóbico, ver figura 5.3.

Las lipasas son usualmente llamadas de acuerdo al microorganismo que las produce. En nuestro caso la lipasa utilizada, la TLL, fue producida de manera extracelular por un hongo, el *Thermomyces lanuginosa*. TLL es una enzima específica 1,3, lo que significa que rompe los enlaces éster en las posiciones 1 y 3 del triglicérido. Tiene un peso molecular de 32000 g/mol y un punto isoeléctrico a $pH=4.4$. Su actividad es óptima a temperaturas alrededor de los 35-40 °C y se incrementa a pH entre 7 y 11. Es una

proteína muy estable en el sentido de que la lipasa es estable en detergente, en un amplio intervalo de *pH* (5-9), a altas temperaturas (hasta 75 °C), y es resistente a la oxidación.

5.2 Monooleína.

Monooleato de glicerol, frecuentemente referido como monooleína (MO), es un lípido polar, noionico de importancia biológica y técnica en los procesos de lipólisis. Los monoglicéridos, como MO, son intermediarios en la hidrólisis de triacilglicéridos para formar ácidos grasos y gliceroles.^{4,12} La reacción ocurre, por ejemplo, en el tracto gastrointestinal y es catalizada por lipasas.

Monooleína es un lípido disponible comercialmente y el cual es producido en la industria en gran escala por medio de una interesterificación (glicerolisis) de triglicéridos con glicerol.¹³ Debido a sus propiedades anfífilicas, los monoglicéridos son usados comúnmente como emulsificantes en la industria de alimentos, por ejemplo, en margarinas, productos lácteos y panes.^{14,15} También es usado en la industria farmacéutica y de cosméticos.¹⁶ MO es un monoglicérido que ocurre como una mezcla en equilibrio de dos isómeros: 1-monoacil glicerol (90%) y 2-monoacil glicerol (10%) debido a que existe una fácil migración acílica (ver figura 5.4). Ambos isómeros son anfífilicos pero 1-monooleína es menos activo superficialmente debido a que 2-monooleína tiene una "cabeza" hidrofílica más grande, lo cual se refleja en sus respectivas propiedades de auto ensamblaje. Por ejemplo, 2-monooleína forma una fase lamelar en exceso de agua, mientras que 1-monooleína favorece la formación de estructuras cristalinas inversas.¹⁷ El

¹² Verger, R.; Pattus, F. *Chem. Phys. Lipids* **1982**, *30*, 189-227.

¹³ Sonntag, N. O. V. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1982**, *59*, 795.

¹⁴ Krog, N.; Riisom, T. H.; Larsson, K. *Encyclopedia of Emulsion Technology*, Becher, P., Ed.; Marcel Dekker: New York, **1983**, 2,321.

¹⁵ Krog, N. *Food Emulsifier and Their Chemical and Physical Properties. In Food Emulsions*; Larsson, K. and Friberg, S. Eds.; Marcel Dekker: New York, 1997, 141.

¹⁶ McIntyre. *In Fatty acids in industry*; Johnson, R. W. and Fritz, E., Eds.; Marcel Dekker, New York, 1989, 351.

¹⁷ Ljusberg-Wahren, H.; Herslöf, B.; Larsson, K. *Chem. Phys. Lipids* **1983**, *33*, 211.

comportamiento de fases del sistema MO-agua ha sido minuciosamente estudiado^{18,19,20,21,22,23} y se sabe que MO forma una fase líquida cristalina (cúbica bicontinua) en exceso de agua ya que la solubilidad monomérica es muy pequeña.



Figura 5.4. Esquema de reacción de la migración acilica de monooleina.

Esta fase cúbica, se dice que es bicontinua debido a que esta consiste de una bicapa curvada que se extiende tridimensionalmente, separando dos redes de canales de agua. El diámetro del canal de agua es de 5 nm cuando la estructura se encuentra completamente hinchada de agua. Últimamente las estructuras cúbicas han recibido una gran atención; en particular su microestructura y su importancia para los sistemas biológicos. Por ejemplo, varias membranas biológicas formadas por lípidos forman fases cúbicas y se ha sugerido que los glicerolos acílicos asumen una estructura cúbica en el estado intermedio de la digestión lipídica.²⁴ También, estudios recientes han demostrado que las fases cúbicas pueden acomodar una amplia variedad de proteínas globulares²⁵ y moléculas de interés

¹⁸ Lindblom, G.; Larsson, K.; Johansson, L.; Fontell, K.; Forsén, S.; *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 5465-5470.

¹⁹ K. Larsson *Nature* **1983**, *304*, 664.

²⁰ Hyde, S. T.; Andersson, S.; Ericsson, B.; Larsson, K. *Z. Kristallogr.* **1984**, *168*, 213-219.

²¹ Landh T. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 8453-8467.

²² Briggs, J.; Chung, H.; Caffrey, M. *J. Phys. II France* **1996**, *6*, 723-751.

²³ Qui, H.; Caffrey, M. *Biomaterials* **2000**, *21*, 223-234.

²⁴ Mariani, P.; Luzatti, V.; Delacroix, H. *J. Mol. Biol.* **1988**, *204*, 165.

²⁵ Nylander, T.; Mattison, C.; Razumas, V.; Miezes, Y.; Håkansson, B. *Colloid Surf. A. Physicochem. Eng. Aspects* **1996**, *114*, 311.

farmacéutico.^{26,27} Borne *et al.*, han investigado el efecto de la acción de la lipasa en una fase cúbica basada en MO²⁸ y pudieron relacionar los cambios estructurales con el diagrama de fase del sistema acuoso MO- ácido oleico / oleato de sodio.²⁹

Monocapas de MO en la interfase aire-agua son conocidas por ser meta-estables.^{30,31} Estudios de relajamiento de monocapas de MO cercanas a la presión superficial de colapso ($\Pi \approx 46 \text{ mN/m}$), indican que el proceso puede ser considerado como precursor a la formación de fases mesomórficas (cúbicas), cerca de la interfase.³¹ Esto puede ser relacionado con el comportamiento en la fase de bulto mencionado anteriormente. Sin embargo, la desorción de MO, que se cree es un factor dominante para el relajamiento por debajo de la presión de esparcimiento de equilibrio ($\Pi_e \approx 46 \text{ mN/m}$),³² también contribuye al proceso de relajamiento a esta alta presión. Se ha reportado que la monocapa de MO muestra una débil difracción de rayos X, aun a altas presiones superficiales ($\Pi \approx 35 \text{ mN/m}$), indicando falta de ordenamiento de largo alcance en la monocapa.³³ También, por medio de este mismo estudio se encontró que el grueso de la

²⁶ Larsson, K. *Lipids-Molecular Organization, Physical Functions and Technical Applications*; The Oily Press Ltd.: Dundee, **1994**.

²⁷ Caboi, F.; Nylander, T.; Razumas, V.; Talaikyté, Z.; Monduzzi, M.; Larsson, K. *Langmuir*, **1997**, *13*, 5476-5483.

²⁸ Caboi, F.; Borné, J.; Nylander, T.; Khan, A.; Svendsen, A.; Patkar, S. *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces* **2002**, *26* (1-2), 159-171.

²⁹ Borné, J.; Nylander, T.; Khan, A. *Langmuir* **2001**, *17*, 7742-7751.

³⁰ Pezron, I.; Pezron, E.; Claesson, P. M.; Bergenståhl, B. A. *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *144*, 449-457.

³¹ Carrera Sánchez, C.; Rodríguez Niño, M. R.; Rodríguez Patino, J. M. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **1999**, *12*, 175-192.

³² Rodríguez Patino, J. M.; Martín Martínez, R. M. *J. Colloid Interface Sci.* **1994**, *167*, 150-158.

³³ Jensen, T. R.; Kjær, K.; Howes, P. B.; Svendsen, A.; Balashev, K.; Reitzel, N.; Bjørnholm, T. in: Kokotos, G., and Constantinou-Kokotou, V. (Eds.), *Proceedings of the*

capa es de aproximadamente 13 \AA , donde el espesor de la región de las cadenas acílicas es como de 9.3 \AA . La falta de estructura definida en la monocapa de MO también ha sido observada por medio de estudios de MAB.³⁴ En el estudio realizado en esta tesis, se supuso el hecho de que la fase cúbica formada en exceso de agua está en equilibrio con una pequeña cantidad de monómeros, los que consecuentemente pueden adsorberse en una interfase.

5.3 Procedimiento experimental

5.3.1 Materiales

Octadeciltrietoxisilano (OTE) fue comprado de Lancaster Synthesis Ltd. La monooleína (1-mono(cis-9-octadecenoil) glicerol) fue comprada de Nu-check Prep Inc. (Lot noM-239-JA21-I) y TLL, tipo nativa, fue adquirido de Novozymes A/S Laboratories como una solución de 1 mg/ml en buffer Tris-HCl ($pH \approx 8$). El agua utilizada fue destilada y pasada por un sistema purificador de agua Milli-Q (Millipore Corp.), dando al agua una resistividad final de $18 \text{ M}\Omega/\text{cm}$. Para obtener soluciones libres de partículas el agua fue filtrada a través de un filtro de $0.1 \text{ }\mu\text{m}$ antes de su utilización. Todos los productos químicos y/o reactivos fueron de grado analítico y fueron utilizados sin purificación adicional en caso de no mencionarlo específicamente. La cristalería utilizada fue limpiada con ácido cromosulfúrico caliente y luego enjuagada con una gran cantidad de agua purificada.

Conference "Lipases and Lipids: Structure, function and Biotechnological Applications", Santorini, Greece, May 6-8, 1999., Crete University Press, Crete, 1999, pp. 127-139.

³⁴ Rodríguez Patino, J. M.; Carrera Sánchez, C.; Rodríguez Niño, M. R. *Langmuir* **1999**, *15*, 2484-2492.

5.3.2. Métodos

5.3.2.1. Preparación de las superficies hidrofóbicas

Las superficies hidrofóbicas de OTE sobre mica fueron realizadas de acuerdo al procedimiento explicado en el capítulo cuatro.

5.3.2.2. Medición de fuerzas superficiales

El AFS fue usado para medir la interacción entre capas adsorbidas de MO en superficies hidrofóbicas y también para estudiar la actividad de la lipasa TLL sobre las capas de MO formadas. La técnica y la versión particular del aparato (Mark IV) utilizado en este estudio son descritos con más detalle en el capítulo 3. Los experimentos en el AFS comenzaron con mediciones de la fuerza de interacción entre superficies hidrofóbicas de OTE en agua. Posteriormente, se realizaron mediciones para estudiar el proceso de formación de una capa adsorbida de MO en las superficies de OTE partir de un cristal de MO que se depositó dentro de la cámara del AFS. Finalmente, cuando la adsorción de MO había alcanzado un estado estacionario, una cantidad determinada de lipasa TLL fue inyectada a la cámara del AFS para estudiar su actividad en la capa de MO formada. También, se realizó un experimento de control en donde se midió la fuerza de interacción y la adsorción de lipasa TLL en superficies puras de OTE, *i.e.*, sin la presencia de la capa de MO. Todas las mediciones fueron realizadas a 20 °C.

5.3.2.3. Elipsometría

El proceso de adsorción de MO y la subsecuente acción de la lipasa en superficies de silica hidrofobizadas fue seguido por medio de una técnica elipsométrica. Las superficies fueron preparadas como se describe a continuación. Obleas de silicio pulido (tipo-p, dopadas de boro, resistividad $1 - 20 \Omega\text{cm}$) se oxidaron térmicamente en una atmósfera de oxígeno a 920 °C por ≈ 1 h, seguido de un endurecimiento (templado) y enfriamiento en un flujo de argón. Este procedimiento da como resultado una capa de SiO_2 cuyo espesor es de 300 Å.³⁵ Las obleas oxidadas fueron entonces cortadas en finos pedazos con un

³⁵ Eskilsson, K.; Tiberg, F. *Macromolecules* **1997**, *30*, 6323-6332.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ancho de 12.5 mm y limpiadas de acuerdo con el método RCA.^{35,36} Después, las superficies fueron secadas al vacío, 0.001 mbar, y tratadas en un limpiador de plasma (Harrick Scientific Corporation, model PDC-3XG) durante 5 minutos. Las superficies fueron expuestas a dimetilclorosilano durante aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente según el procedimiento de Eskilsson y Tiberg.³⁵ Las láminas de silicio fueron entonces sonicadas en etanol y tetrahidrofurano repetidamente para remover el exceso de silano y finalmente almacenadas en etanol.

Un elipsómetro automatizado Rudolf Research thin-film null, tipo 43603-200E, como se describió previamente en el capítulo 3, fue usado para este estudio. Las características ópticas del sustrato fueron determinadas al principio de cada experimento por medio de mediciones en diferentes medios como se describe en Tiberg y Landgren.³⁷ Para evitar burbujas de aire en la superficie hidrofóbica, la celda fue llenada primero con etanol el cual posteriormente fue remplazado por medio de un flujo de agua. Todas las mediciones fueron realizadas a $\lambda = 4015 \text{ \AA}$, en una cubeta a temperatura controlada ($25 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$) y bajo agitación con un agitador magnético de 300 rpm aproximadamente.

La adsorción de MO comenzó después de colocar un pequeño cristal de MO en la celda, que contenía 5 ml de agua. Después, la composición de la solución fue modificada por medio de enjuagar con un flujo de agua o por adición de una cantidad determinada de TLL. Los valores registrados Ψ y Δ fueron evaluados utilizando un modelo de 4 capas ópticas, suponiendo un medio isotrópico e interfaces planas.³⁷ El índice de refracción promedio, n_f , y el espesor elipsométrico, d_f , de la capa adsorbida se calcularon usando un procedimiento numérico. La cantidad adsorbida (Γ) fue calculada de, n_f y d_f por medio de la siguiente fórmula derivada por de Feijter et. al.³⁸:

$$\Gamma = \frac{(n_1 - n_0)d_f}{dn/dc} \quad , \quad (5.1)$$

³⁶ Kern, W.; *RCA Eng.* **1993**, *28*, 99-105.

³⁷ Tiberg, F.; Landgren, M. *Langmuir* **1993**, *9*, 927-932.

³⁸ De Feijter, J. A.; Benjamins, J.; Veer, F. A. *Biopolymers* **1978**, *17*, 1759-1772.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

donde n_0 es el índice refractivo del bulto de la solución. El incremento del índice refracción dn/dc , fue tomado como 0.169 g/cm^3 tanto para MO como para TLL.

5.4 Resultados y discusión

5.4.1 Adsorción e interacción de capas de monooleina en superficies hidrofóbicas.

La figura 5.5 muestra los resultados que se obtuvieron al medir elipsométricamente la adsorción de MO en una superficie hidrofóbica. La curva obtenida muestra que MO tiene una fuerte afinidad a las superficies hidrofóbicas y que puede ser adsorbida desde una solución acuosa en equilibrio con un fase líquida cristalina (cúbica) de MO. La adsorción alcanza un valor estable de 1.5 mg/m^2 en aproximadamente 3 horas 30 minutos. La cinética de adsorción es lenta principalmente debido a la baja solubilidad de MO. De hecho, se puede calcular la concentración de monómeros si suponemos un coeficiente de difusión, D , de $2 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ y un capa (zona) sin agitación con un espesor de $100 \mu\text{m}$ como fue determinado por Tiberg et. al.³⁹ Tales cálculos dan como resultado una concentración de monómeros de $\approx 10^{-7} \text{ M}$. Así mismo, se puede ver en la figura 5.5 que el espesor elipsométrico de la capa adsorbida es de aproximadamente 25 \AA . Este valor puede ser comparado con el espesor de 35 \AA de una bicapa de MO en una fase lamelar,²⁹ pero hay que tomar en cuenta que la fase lamelar en el sistema binario agua-MO solo contiene 10% de agua. La cantidad de MO adsorbida en la superficie hidrofóbica, 1.5 mg/m^2 , corresponde a un área por molécula de 39.5 \AA^2 (M_w de MO = 365.55). Este valor es comparable con el área por molécula registrada en isotermas de Langmuir de monocapas de MO, el cual es de 40 \AA^2 a una presión superficial de 25 mN/m .⁴⁰

En la figura 5.6 se muestran las curvas de fuerza entre dos superficies de OTE hasta 96 horas después de haber depositado un cristal de MO dentro de la cámara del AFS. Es de esperarse que la cinética de adsorción en la cámara del AFS sea más lenta que la de la celda elipsométrica puesto que la primera tiene mucho más volumen y no es posible

³⁹ Tiberg, F.; Jönsson, B.; Lindman, B. *Langmuir* **1994**, *10*, 3714-3722.

⁴⁰ Carrera Sánchez, C.; de la Fuente Feria, J.; Rodríguez Patino, J. *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* **1998**, *143*, 477-490.



realizar agitación. Consecuentemente, observamos una formación de la capa de MO significativamente más lenta en el AFS. Las curvas de fuerza obtenidas después de 24 y 48 h fueron similares a las curvas de fuerza medidas antes de la adición de MO (ver figura 4.10) y presentaban una fuerte fuerza repulsiva debajo de los 300 Å. Después de 72 h, la repulsión disminuyó drásticamente y las superficies saltaban a contacto OTE desde una separación de 185 Å. Las curvas medidas a las 48 y 72 horas son las mismas que se discutieron en el capítulo 4, sección 4.5.4.3, ya que las mismas superficies hidrofóbicas de OTE que se usaron para discutir la interacción hidrofóbica fueron utilizadas posteriormente para estudiar la adsorción de MO.

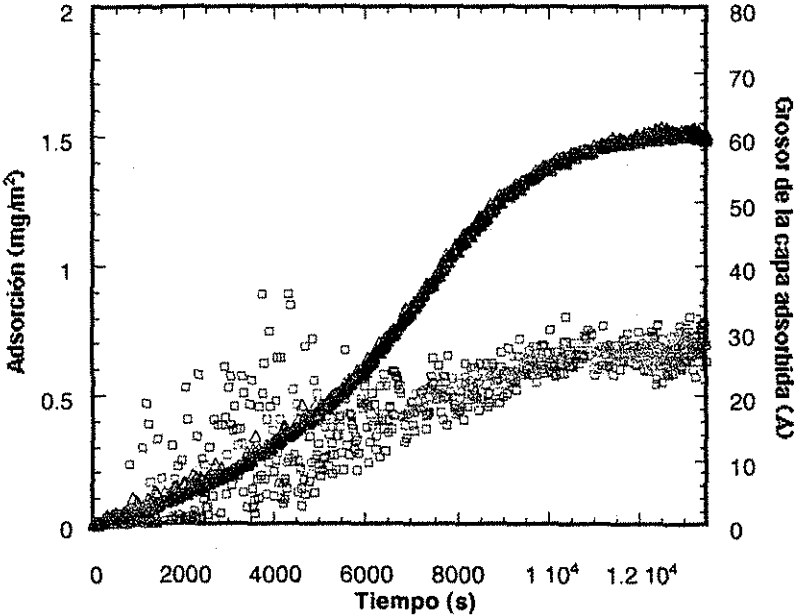


Figura 5.5. Adsorción de MO en una superficie de silica vuelta hidrofóbica a partir de una solución acuosa en la presencia de un cristal de MO. Tiempo=0 indica la adición del cristal. La grafica muestra el cambio en la cantidad adsorbida (Δ) y el grosor (□) mientras son determinados in situ elipsometricamente.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Como se discutió previamente, este proceso apoya la idea de que la presencia de burbujas de aire y/o exceso de material sean el origen de la fuerza repulsiva. La presencia de MO en las superficies reduce la tensión interfacial gas-agua y facilita que el agua moje las superficies hidrofóbicas desestabilizando cualquier burbuja en la superficie. En la curva de fuerza obtenida después de 96 horas, la formación de una capa MO en la superficie OTE se muestra como una acentuada fuerza repulsiva. Si se aplica una fuerza aunque sea débil, se puede exprimir esta capa y sacarla fuera de la zona de contacto y como resultado las superficies brincan como de 160 Å a contacto OTE.

La figura 5.7 muestra las curvas de fuerzas medidas 120 y 144 horas después de añadir un cristal de MO en el AFS, ahí se observa que el intervalo y la magnitud de la fuerza repulsiva se incrementan con el tiempo. En la curva de fuerza medida después de 120 h la interacción repulsiva comienza como a 400 Å. Las superficies pueden ser aproximadas hasta que brincan a una separación entre las superficies como de 59 Å a partir de la distancia de contacto OTE. En este caso, no se observó ninguna fuerza adhesiva cuando las superficies fueron separadas de esta posición de contacto. Tres mediciones consecutivas fueron realizadas en la misma posición de contacto 144 horas después de añadir MO. La curva de fuerza registrada en el primer acercamiento es similar a la que se midió después de 120 h. Esto indica que el sistema se está acercando a un estado de estabilización en términos de la formación de una capa de MO en la superficies de la mica hidrofóbica y de saturación de la fase bulto de MO. La capa parece, sin embargo, ser ligeramente más densa a medida que las superficies se mueven desde una separación grande (110 Å) hasta una posición de contacto de 53 Å. Además, al sistema le tomó 2 h para que las superficies se movieran esa distancia a una fuerza constante de 4.8 mN/m. En el segundo acercamiento, encontramos que las superficies se pueden acercar más antes de que la interacción repulsiva sea notable a una separación de las superficies de 300 Å. En este caso no se observó ningún salto hacia delante antes de que una separación de las superficies de 57 Å fuese alcanzada a una fuerza como de 4.8 – 5.6 mN/m. Ninguna adhesión fue encontrada al separar las superficies después del primer y segundo acercamiento.

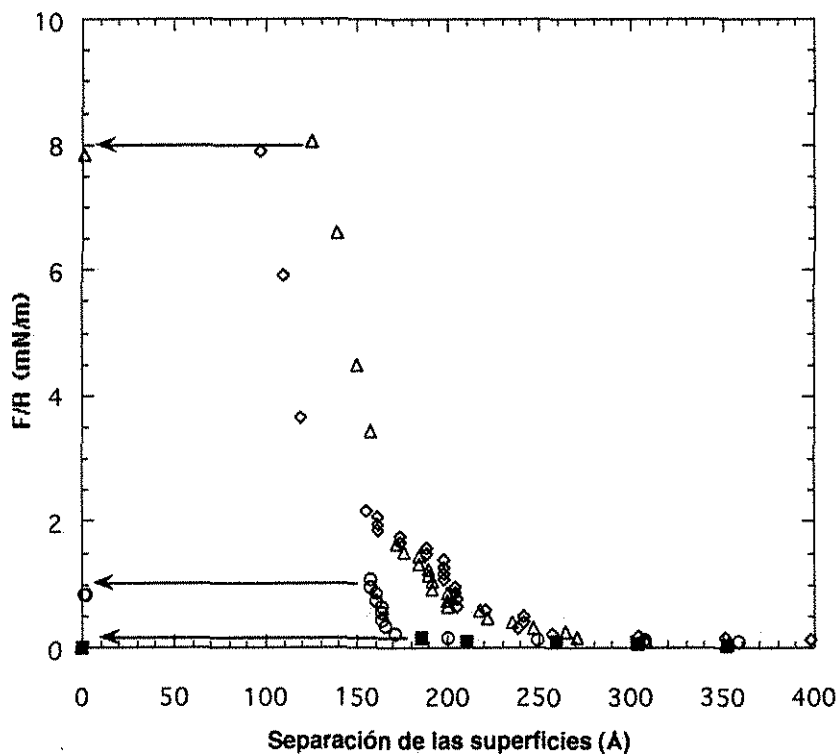


Figura 5.6. Curvas de fuerza, F (normalizadas por el radio de curvatura R), contra distancia para tres acercamientos consecutivos, en la misma posición, de dos superficies de OTE a $T= 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ después de haber agregado un cristal de MO en la cámara del AFS. La curva medida después de 24 h (\diamond) y 48 h (\triangle) son similares a las curvas medidas antes de adicionar MO. Después de 72 h (\blacksquare), se observa una disminución significativa de la fuerza de repulsión y las superficies brincan a contacto OTE-OTE desde una distancia de 185 \AA y a una fuerza de 0.2 mN/m . La adhesión medida al separar las superficies fue de 260 mN/m . En la curva de fuerza medida después de 96 h (\circ), el crecimiento de una capa de MO es aparente en la forma de una pequeña fuerza repulsiva. Al aplicar una fuerza mayor a las superficies estas brincan desde 160 \AA a contacto OTE.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los valores registrados de la separación entre superficies para el contacto MO – MO, 53 – 59 Å, después de 120 y 144 h concuerdan bien (considerando que hay dos superficies en las que se adsorbe MO) con el valor de 25 Å que se determinó por elipsometría. La curva de fuerza registrada en el tercer acercamiento es similar a la curva de fuerza anterior, pero en este caso observamos un salto hacia delante desde los 60 Å hasta el contacto OTE a una fuerza de 5 mN/m y una gran fuerza adhesiva al separar las superficies. Esto indica que se removió completamente la capa de MO de la superficie.

Una fuerza repulsiva de largo alcance no es lo que uno espera entre dos superficies hidrofóbicas que se cubren con monocapas de un lípido no iónico como es MO, pero nuestros experimentos muestran que esta existe y que el intervalo de las fuerzas repulsivas cambia con el tiempo y disminuye si las superficies son llevadas a contacto secuencialmente. Curvas de fuerza similares a las que encontramos en nuestros experimentos fueron reportadas por Pezron et. al.,³⁰ los cuales estudiaron la interacción entre capas de MO depositadas por Langmuir-Blodgett.

Pezron et. al., encontraron que se necesitaba depositar un cristal de MO en la cámara del AFS para obtener monocapas estables en las superficies y que cuando se aplicaba una fuerza demasiado grande la capa de MO era perturbada y las curvas de fuerza registradas después indicaban la formación de agregados en la superficie. Así mismo, ellos sugieren que la formación de estos agregados podía estar relacionada con la inestabilidad de la monocapa de MO, dado que la fase líquida cristalina lamelar en el sistema binario agua-MO es inestable en exceso de agua y fácilmente se transforma a una fase cúbica. En nuestro caso, debemos considerar que la solución entre las superficies eventualmente estará saturada de MO y que entonces el sistema se acercará a la región de dos fases: solución-fase cúbica. Esto significa que cualquier perturbación en el sistema puede ocasionar una transición hacia la fase cúbica. Una transición como esta puede ocurrir en el espacio entre dos superficies, y se le conoce como separación de fase inducida capilarmente (Capillary Induced Phase Separation, CIPS).

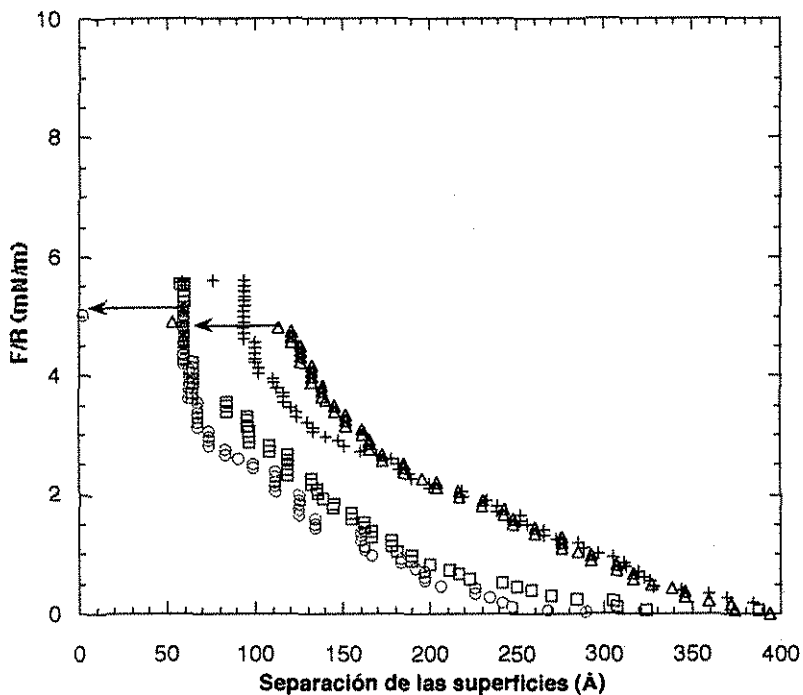


Figura 5.7. Curvas de fuerza medidas 120 y 144 h después de añadir un cristal de MO al AFS, en todas existe una interacción repulsiva debajo de los 400 Å. Después de 120 h (+), la interacción es repulsiva hasta los 94 Å en donde las superficies brincan a una separación de 59 Å a partir del contacto OTE, a una fuerza de 5.6 mN/m. No se encontró adhesión al separar las superficies. Tres mediciones de acercamientos consecutivos se realizaron 144 h después de añadir MO. En el primer acercamiento, (Δ), las superficies se mantuvieron a una fuerza de 4.8 mN/m a una separación de 110 Å y de ahí le tomo a las superficies 2 h moverse hasta 53 Å de separación. En el segundo acercamiento, (\square), no se observó ningún brinco antes de que la separación entre las superficies fuera de 57 Å en un intervalo de fuerzas de 4.8-5.6 mN/m. No se observó ninguna adhesión tanto en el primer como en el segundo acercamiento. Un brinco de los 60 Å hasta contacto OTE se observó en el tercer acercamiento, (\circ), a una fuerza de 5 mN/m. En este caso al separar las superficies se observó una fuerte fuerza adhesiva.

Transiciones de este tipo han sido encontradas en un número de sistemas,^{41,42} esto incluye la formación de un menisco de agua entre dos superficies hidrofílicas rodeadas de una solución de aceite saturada por agua⁴³ o la formación de agua condensada o de una fase lamelar entre dos fases hidrofílicas en una microemulsión bicontinua.⁴⁴ Usualmente estas transiciones dan lugar a una fuerza atractiva de largo alcance pero en nuestro caso observamos una fuerza repulsiva de largo alcance. Sin embargo, aquí hay que tomar en cuenta que la fase cúbica es muy rígida⁴⁵ y esto puede explicar la fuerte fuerza repulsiva que observamos. Así mismo, el tiempo que se necesita para que la fuerza repulsiva se forme después de añadir MO puede entonces deberse al tiempo que se necesita para que la solución entre las superficies se sature de MO. También, esto puede explicar porqué las compresiones realizadas consecutivamente resultan en una remoción (parcial) de la capa superficial, ya que en estos casos no hay tiempo suficiente para que el sistema mantenga equilibrio y se forme de nuevo la fase cúbica.

5.4.2 Interacción de TLL en capas de MO adsorbidas en superficies hidrofóbicas.

La figura 5.8 muestra los resultados obtenidos por elipsometría de la acción de lipasa TLL en MO adsorbido en una superficie hidrofóbica. Tres diferentes concentraciones de lipasa, en tres diferentes experimentos, fueron añadidas a la celda cuando se llegaba a un valor estable en la adsorción de MO (comparar con la figura 5.5) y con el cristal de MO aun presente en la celda. Como se puede observar, la cantidad total en la superficie disminuye relativamente rápido cuando se añade lipasa, pero alcanza una plataforma

⁴¹ Evans, D. F.; Wennerström, H. *The Colloidal Domain. Where Physics, Chemistry, Biology and Technology Meet*, 2nd ed. Wiley, New York, 1999.

⁴² Wennerström, H.; Thuresson, K.; Linse, P.; Freyssingas, E. *Langmuir* 1998, 14, 5664-5666.

⁴³ Christenson, H. K.; Fang, J.; Israelachvili, J. N. *Phys. Rev. B* 1989, 39, 11750-11754.

⁴⁴ Petrov, P.; Olsson, U.; Wennerström, H. *Langmuir* 1997, 13, 3331-3337.

⁴⁵ Pitzalis, P.; Monduzzi, M.; Krog, N.; Larsson, H.; Ljusberg-Wahren, H.; Nylander, T. *Langmuir* 2000, 16, 6358-6365.

antes de los 400 s. La razón de disminución en el exceso superficial, *i.e.* en la cantidad adsorbida de MO, así como las fracciones removidas, se incrementan con la concentración de lipasa. Aquí se debe puntualizar que no podemos separar las contribuciones individuales de MO y TLL de la cantidad total adsorbida. El valor promedio del grosor de la capa adsorbida de MO disminuye de 25 Å a cerca de 20 Å debido a la acción de TLL.

Wannerberger y Arnebrant,^{46,47} han estudiado extensamente la adsorción de lipasa TLL en superficies hidrofóbicas usando eplipsometría. Ellos encontraron que la cinética de adsorción depende mucho de la concentración de lipasa, *pH*, y de las propiedades de la superficie. Cuando utilizaron una solución de 63 nM de TLL, cercana a la máxima concentración que nosotros utilizamos, la adsorción en la superficie hidrofóbica fue bastante lenta y después de 400 s alcanzó un valor de 0.1 mg/m² a *pH*=7 y 1.5 mg/m² a *pH*=5. Los valores correspondientes en una superficie hidrofílica de sílica fueron 0.1 y 0.4 mg/m², respectivamente, utilizando una concentración de TLL cien veces mayor. Ellos también observaron que a una concentración de lipasa de 63 nM, hacer la superficie sólo un poco más hidrofílica, *i.e.* disminuyendo el ángulo de contacto en el agua de 75 a 62°, resultaba en un dramático cambio en la cantidad de TLL adsorbida de 1.7 a 0.2 mg/m². Por lo tanto, queda claro que la lipasa solo dará una pequeña contribución, si no es que nula, a las cantidades adsorbidas bajo las condiciones (*pH* ~ 7) utilizadas en nuestros estudios. Sólo con la mayor concentración de TLL notamos un pequeño incremento en la cantidad adsorbida 200 s después de un brusco decremento en el exceso de la superficie debido a la acción de la lipasa. Podemos entonces, concluir que el decremento observado en el exceso de la superficie es primordialmente una consecuencia de la acción de la lipasa en la capa adsorbida de MO. En cuanto a los productos de la lipólisis: glicerol y ácido oleico, estos tienen una significativa mayor solubilidad acuosa que MO y, por lo tanto, no deberían adsorberse en la superficie.

⁴⁶ Wannerberger, K.; Arnebrant, T. *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, *177*, 316-324.

⁴⁷ Wannerberger, K.; Welin-Klintström, S.; Arnebrant, T. *Langmuir* **1997**, *13*, 784-790.

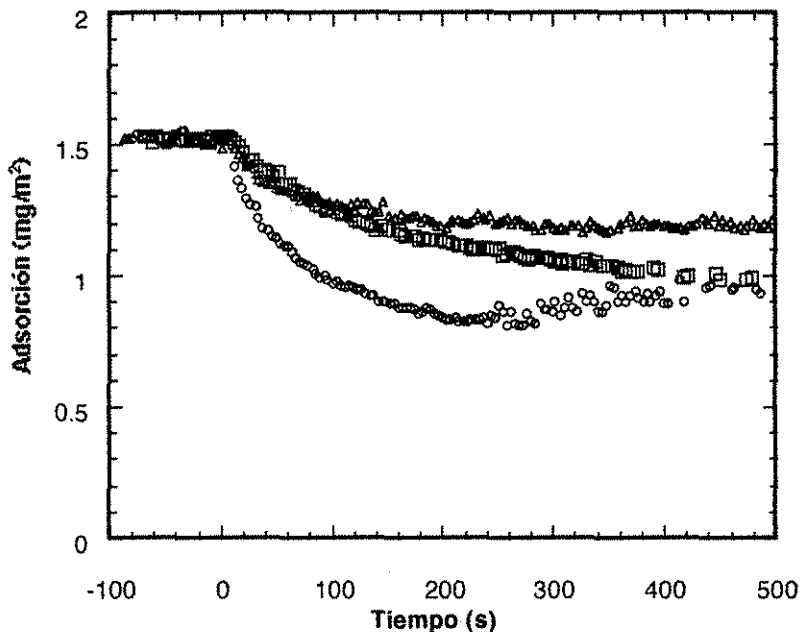


Figura 5.8. Mediciones elipsométricas de la acción de TLL en superficies hidrofóbicas cubiertas con MO a 17 (Δ), 35 (\square) y 70 (\circ) nM de concentración respectivamente. El tiempo cero representa el momento cuando TLL se adiciono al sistema.

La figura 5.9 muestra como la fuerza de interacción cambia como resultado de la adsorción de lipasa en superficies hidrofóbicas de OTE, *i.e.* en un sistema sin MO. En la figura se muestra una curva de fuerza medida entre superficies de OTE antes de inyectar lipasa TLL. Esta curva es similar a las descritas y discutidas en la sección 4.5.4.3. La concentración de la lipasa usada en este caso en el AFS es similar a las que utilizamos en el estudio de elipsometría (50 nM) puesto que queremos trabajar en un intervalo de concentración de lipasa que fuera relevante en la catálisis. Las curvas de fuerza obtenidas después de 22, 43 y 50 h de haber añadido TLL son casi idénticas y aquí se puede considerar que el sistema estaba cerca del equilibrio de adsorción. Las curvas de fuerza obtenidas son repulsivas a una separación de las superficies de 800 Å.

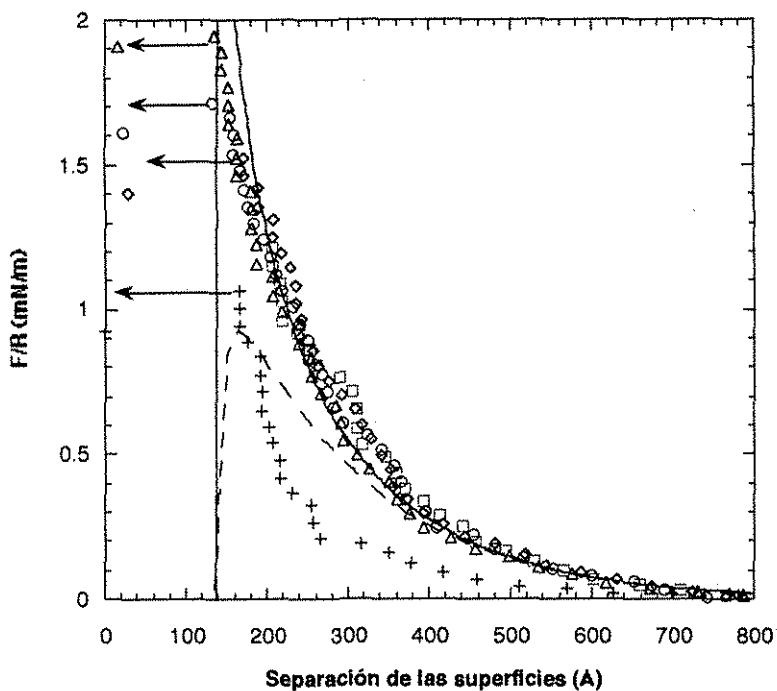


Figura 5.9. Curvas de fuerza, F , (normalizada por el radio de curvatura R) contra la distancia de separación entre dos superficies de OTE en agua a $T=20\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes (+) y 22 h (Δ), 43 h (\diamond), 50 h (\square) y 51 h (\circ) después de inyectar 50 nM de TLL. Dos de estas curvas, (\square) y (\circ), fueron medidas consecutivamente en otra posición de contacto de las superficies. Las curvas presentan una fuerza repulsiva debajo de los 800 Å y bajo compresión las superficies brincan de una separación de 130-150 Å hacia contacto adhesivo. La posición final de contacto varía entre 20-40 Å a partir de la distancia de contacto de OTE con una adhesión de 230 mN/m en todos los casos. La fuerza repulsiva puede ser ajustada a una curva de fuerza DLVO (ver texto para detalles). La curva de línea sólida corresponde a condiciones de carga superficial constante y la de línea punteada a condiciones de potencial superficial constante.

Esta fuerza repulsiva aumenta hasta que la separación de las superficies es de 130 \AA , en donde las superficies saltan a contacto adhesivo. La fuerza repulsiva puede ser ajustada a una fuerza electrostática de doble capa con una longitud de decaimiento, κ^{-1} , $\approx 154 \text{ \AA}$ (correspondiente a una concentración electrolítica 1:1 de 0.4 mM) y un potencial superficial de 60 mV . La atracción de van der Waals se calculó utilizando una constante de Hamaker de $0.5 \times 10^{-20} \text{ J}$. Tanto el plano de la capa difusa como el plano de origen de las fuerzas de dispersión fueron colocados a una separación de 130 \AA . Mediciones en diferentes puntos de contacto dieron curvas de fuerza similares, pero las superficies brincaban a contacto a separaciones de superficies relativamente diferentes. La posición final de contacto variaba entre $20 - 40 \text{ \AA}$ a partir de la separación de contacto de OTE y con una adhesión de 230 mN/m en todos los casos. La presencia de un brinco atractivo y la obtención de valores de adhesión, los cuales son similares a la adhesión entre superficies puras de OTE, indican que la lipasa no cubre completamente las superficies. Esto está de acuerdo con la información de elipsometría para concentraciones bajas de lipasa descrita anteriormente.^{46,47} Así mismo, también se debe considerar que las lipasas pueden ser removidas de las superficies cuando estas son llevadas a contacto. Todo esto indica que existen débiles fuerzas de atracción entre la lipasa y las superficies bajo las condiciones experimentales que se utilizaron.

La figura 5.10 muestra curvas de fuerza obtenidas a diferentes tiempos después de añadir TLL a una concentración de 10 nM al AFS, el cual tenía unas superficies de OTE con una capa (fase cúbica) de MO en equilibrio. La adición de TLL cambia continuamente la interacción de una repulsión de largo alcance no exponencial, obtenidas entre superficies cubiertas de MO (ver figura 5.7), a una fuerza repulsiva que es de menor longitud de alcance y que puede ser ajustada a un solo decaimiento exponencial (no se muestra la información). Con el tiempo, después de añadir TLL la curva de fuerza se desplaza hacia distancias de separación menores y la fuerza repulsiva se vuelve más débil. Además, las superficies no parecen estar completamente cubiertas de MO y/o productos de la hidrólisis porque siempre se observa una fuerza atractiva (brinco hacia contacto) de un intervalo similar a como fue observado entre superficies puras de OTE. La posición final varía y disminuye con cada acercamiento consecutivo.

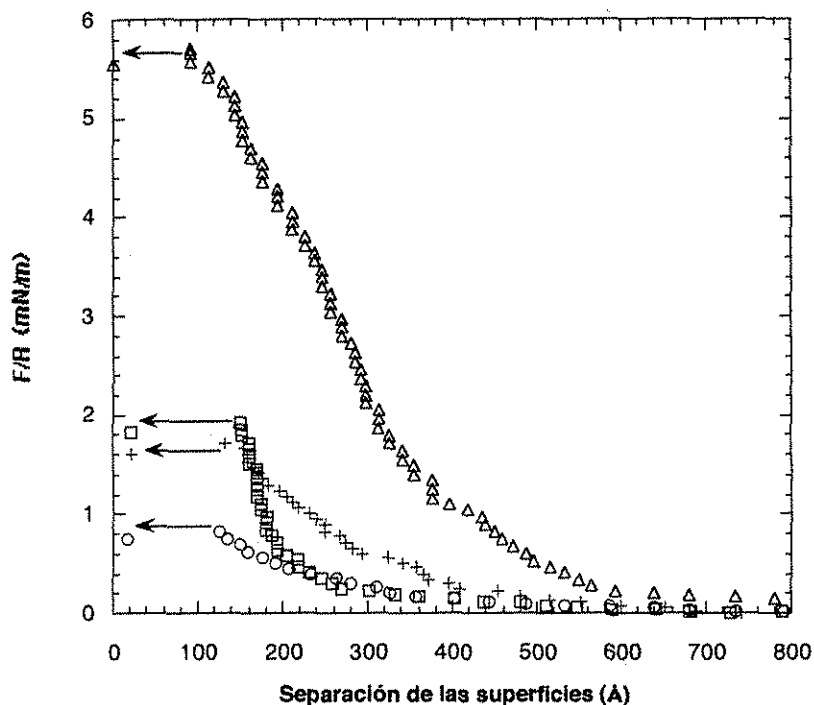


Figura 5.10. Curvas de fuerza vs. distancia de dos superficies de OTE cubiertas de MO y en la presencia de un cristal de MO medidas 18 h (Δ), 74 h (\square), 95 h (\circ) después de agregar 10 nM de TLL. Para comparación también se insertó la curva de fuerza medida entre dos superficies de OTE sin MO y en la presencia de 50 nM de TLL (+). En todos los casos se observa un brinco hacia contacto, después de 18 h el brinco ocurre a una fuerza de 5.6 mN/m y hacia una separación de las superficies de 0 Å, mientras que después de 74 h y 95 h el brinco ocurre a 1.9 y 0.8 mN/m y hacia una separación de 22 y 18 Å, respectivamente.

Estas curvas de fuerza pueden ser interpretadas como una consecuencia de la hidrólisis de la capa de MO, la cual es catalizada por la lipasa. Esto también fue corroborado por la información elipsométrica presentada en la figura 5.8. Como se discutió previamente, el transporte de la enzima a la superficie, así como el transporte de los productos provenientes de la superficie, es significativamente más lento en la cámara del AFS que en la celda elipsométrica, puesto que en la última es posible agitar la solución durante las

mediciones. La aparición de una fuerza repulsiva exponencial indica una carga en la superficie. Esto puede ser ocasionado por uno de los productos de la lipólisis, que es el ácido oléico. El grado de protonación del ácido graso determinarán la carga de la superficie. La carga en la superficie también puede ser debida a la adsorción de lipasa. Sin embargo, para reducir la interferencia en este proceso, la concentración de TLL fue reducida por un factor de 5 comparado con los experimentos de adsorción de TLL en una superficie de OTE, pero no obstante esta baja concentración de TLL, se observa un drástico cambio en la fuerza de interacción entre superficies cubiertas de MO. Por otro lado, la acción catalítica de la lipasa también pueden ocurrir en el cristal de MO que se encuentra en la cámara del AFS, que como consecuencia cambia la composición de la solución, lo que a su vez puede prevenir la separación de fases inducida capilarmente, la cual vimos que aparecía antes de añadir TLL.

5.5 Conclusiones

Es claro que los resultados obtenidos tanto por elipsometría como con el AFS, muestran que MO se adsorbe fácilmente sobre superficies hidrofóbicas, y confirman la suposición de que la fase cúbica formada en exceso de agua está en equilibrio con una pequeña cantidad de monómeros, los que consecuentemente pueden adsorberse en una interfase.

Algo de particular interés, es el hecho de que sea posible formar, a partir de una solución saturada de MO, una fase rígida (posiblemente cúbica) entre las superficies del AFS por medio de una separación de fases inducida capilarmente. Esta información puede ser de gran importancia considerando los potenciales usos que las fases cúbicas pueden tener en diferentes aplicaciones prácticas.

Por otro lado, los resultados muestran una clara actividad de TLL en la estructura cúbica formada por MO y que esta actividad no parece verse disminuida por la presencia de los productos de la hidrólisis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.- Interacciones entre Apolipoproteínas humanas CI adsorbidas en superficies hidrofílicas e hidrofóbicas.

La arterosclerosis es en estos días la principal causa de muerte y disfuncionalidad en la mayoría de los países industrializados. Investigaciones clínicas han demostrado que existe una fuerte correlación entre las enfermedades coronarias y los niveles alterados (no comunes) de las lipoproteínas plasmáticas.¹

Las lipoproteínas plasmáticas son complejos coloidales que están formadas por lípidos (triglicéridos, colesterol, y fosfolípidos) y proteínas, conocidas como apolipoproteínas. De manera general, la estructura de las lipoproteínas consiste de un centro hidrofóbico formado por lípidos no polares (triglicéridos y ésteres de colesterol), rodeado por moléculas más polares y anfífilas, como son el colesterol, los fosfolípidos y las apolipoproteínas (ver figura 6.1). Las lipoproteínas están divididas en diferentes clases y cada clase consiste de un continuo de diferentes partículas de lipoproteínas. Estas clases están caracterizadas por su tamaño, densidad, y composición. Cuatro diferentes clases de acuerdo a su densidad han sido separadas por ultracentrifugación: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad, lipoproteínas de baja densidad y lipoproteínas de alta densidad (HDL, por sus siglas en ingles).

En el diagnóstico de la arterosclerosis, se ha encontrado que generalmente esta enfermedad esta asociada a un bajo nivel de las HDL, junto con, en la mayoría de los casos, la presencia de altos niveles de triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad.¹ La correlación inversa entre las HDL y las enfermedades coronarias cardiacas ha llevado a la conclusión de que las HDL tienen un papel de inhibidoras en el desarrollo y progreso de la arterosclerosis.¹ La principal hipótesis del mecanismo de protección fue propuesta por Glomset² y es conocida como la hipótesis del transporte reverso de colesterol. Esta

¹Gordon, D. J.; Rifkind, B. M. High-Density Lipoprotein- The Clinical Implications of Recent Studies. *N. Engl. J. Med.* **1989**, *321*, 1311-1316.

²Glomset, J. A. The Plasma Lecithin: Cholesterol Acyltransferase Reaction, *J. Lip. Res.* **1968**, *9*, 155-162.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

hipótesis propone que el colesterol que se encuentra en el tejido periférico es transportado por medio de las HDL hacia el hígado para su excreción y reciclado. Otras teorías consideran el hecho de que las HDL puedan tener propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y, posiblemente, antitrombóticas.³

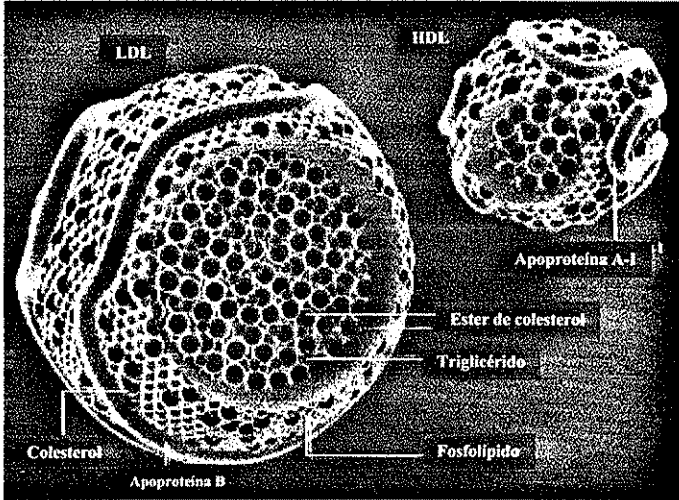


Figura 6.1. Un modelo de la estructura y composición de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de alta densidad (HDL). Adaptada de Libby, P. *Scientific American* 2002, 286, 28-38.

Es claro que para lograr un mayor entendimiento del papel que las HDL tienen como inhibidoras de la arterosclerosis es necesario conocer la relación estructura-función de cada una de las moléculas que las componen. La apolipoproteína humana CI (Apo CI), es una de las proteínas que forman la estructura de las HDL y es conocida por ser una *proteína intercambiable* debido a su capacidad para moverse e intercambiarse entre lipoproteínas.⁴ Sin embargo, aunque este fenómeno está bien documentado, los mecanismos específicos que gobiernan este comportamiento aun no están bien comprendidos. Tomando en cuenta lo anterior, en esta tesis se utilizó el AFS para realizar un estudio de las interacciones entre superficies, hidrofílicas (mica) e hidrofóbicas (mica-OTE), en las que se adsorbió la Apo

³Andersson, L. O.; *Current Opinion in Lipidology* 1997, 8, 225-228.

⁴Gotto, A. M. H.; Pownall, J.; Havel, R. J. *Methods Enzymol.* 1986, 128, 3.

CI. La intención de este estudio es poder dar mayor información sobre la relación estructura-función de esta proteína, a través de las diferentes interacciones y conformaciones encontradas en los experimentos de medición de fuerzas. Esta información es importante para lograr un mayor entendimiento sobre la manera en que las diferentes conformaciones de la proteína están relacionadas con la actividad de la Apo CI en la unión con los lípidos de las lipoproteínas.

A continuación se da una descripción muy general de las HDL, de la Apo CI y se presentan los resultados obtenidos en los experimentos realizados utilizando el AFS.

6.1 Lipoproteínas de alta densidad (HDL)

Las HDL son llamadas “el colesterol bueno”, y su principal función es el transporte del exceso de colesterol del tejido periférico hacia el hígado para su reuso o excreción. Este proceso es llamado el transporte reverso de colesterol² y ocurre en varias etapas. La primera es la emisión del colesterol de las células y su recolección por las nacientes HDL, las cuales son partículas con una forma de disco formadas por una bicapa de fosfolípidos y cubiertas de apolipoproteínas. En la segunda etapa, el colesterol localizado en la bicapa de fosfolípido es esterificado por medio de la acción de la enzima lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT), donde después el ester de colesterol es transferido al centro de la partícula de HDL. Esta es la maduración de la HDL y durante este proceso la partícula se vuelve esférica donde las proteínas, los fosfolípidos y el colesterol no esterificado cubren a las moléculas de ester de colesterol,⁵ (ver figura 6.2).

6.2 Apolipoproteína CI.

La apolipoproteína humana CI (Apo CI) es una proteína plasmática anfifílica formada por 57 residuos de longitud y con una masa molecular de 6.63 KDa. Esta proteína juega un papel importante en la formación de quilomicrones⁶ y en la regulación de la interacción entre la apolipoproteína E y las lipoproteínas de muy baja densidad.⁷

⁵ Gurr, M. I.; Harwood, J. L. *Lipid Biochemistry*, IV ed. 1991, Chapman & Hall.

⁶ Eisenberg, S. *Curr. Opin. Lipidol.* 1990, 1, 205.

⁷ Swaney, J. B.; Weisgraber, K. H. *J. Lipid Res.* 1994, 35, 134.

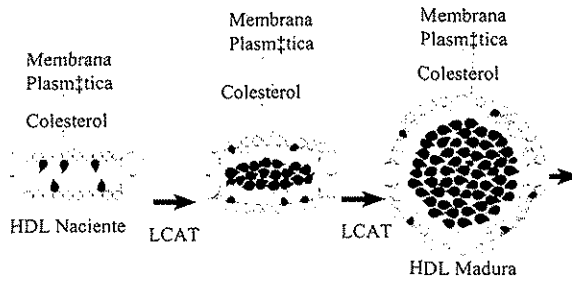


Figura 6.2. Una ilustración de la conversión de una HDL naciente desde una forma discoidal hasta una HDL madura esférica, debido a la acción de la LCAT. El centro de las HDL esta formado por ester de colesterol.
 Adaptada de Brouillette, C. G.; Anantharamaiah, G. M. *Biochimica et Biophysica Acta* **1995**, **109**, 1256.

La relación estructura-función de la apolipoproteínas humanas, incluida la Apo CI, no esta bien comprendida debido a la falta de información acerca de la manera en que las diferentes conformaciones de las proteínas esta relacionadas con la actividad donde se une la proteína a los lípidos. Dos formas cristalinas de la Apo CI han sido reportadas como adecuadas para su análisis por difracción de rayos X de alta resolución.⁸ Sin embargo, su estructura tridimensional aun no ha sido encontrada. Por otro lado, estudios basados en predicciones de estructura secundaria, resonancia magnética nuclear y espectroscopia de dicroísmo circular muestran que la Apo CI tiene un alto contenido de estructura α hélice, y que esta estructura esta distribuida principalmente en dos α -hélices.^{9,10,11,12} La primera α -hélice (residuos 4-30) representa aproximadamente 7.5 periodos (donde un periodo es igual a 3.6 aminoácidos de 5.4 Å de avance por vuelta), y la segunda (residuos 35-53) 5.2 periodos.⁹

⁸ Weisgraber, K. H.; Newhouse, Y. M.; McPherson, A. *J. Mol. Biol.* **1994**, **236**, 382-384.

⁹ Bolaños-García, V. M.; Mas-Oliva, J.; Ramos, S.; Castillo, R. *J. Phys. Chem. B* **1999**, **103**, 6236-6242.

¹⁰ Rozek, A.; Buchko G.W.; Kanda, P.; Cushley, R. *J. Prot. Sci.* **1997**, **6**, 1858-1868.

¹¹ Rozek, A.; Buchko, G. W.; Cushley, R. *Biochemistry* **1995**, **34**, 7401-7408.

¹² Buchko, G. W.; Rozek, A.; Zhong, Q.; Cushley, R. *J. Pept. Res.* **1995**, **8**, 86-94.

El carácter anfifílico de esta proteína esta basado en el hecho de que una cara polar se forma en uno de los lados de la proteína debido al agrupamiento de residuos de aminoácidos cargados, mientras que una superficie hidrofóbica compuesta de residuos no polares se forma en la cara opuesta de la estructura α -hélice,^{9,13} ver figura 6.3. Así mismo, cálculos del momento hidrofóbico confirman el carácter anfifílico de las α -hélices que conforman la Apo CI.^{9,13}

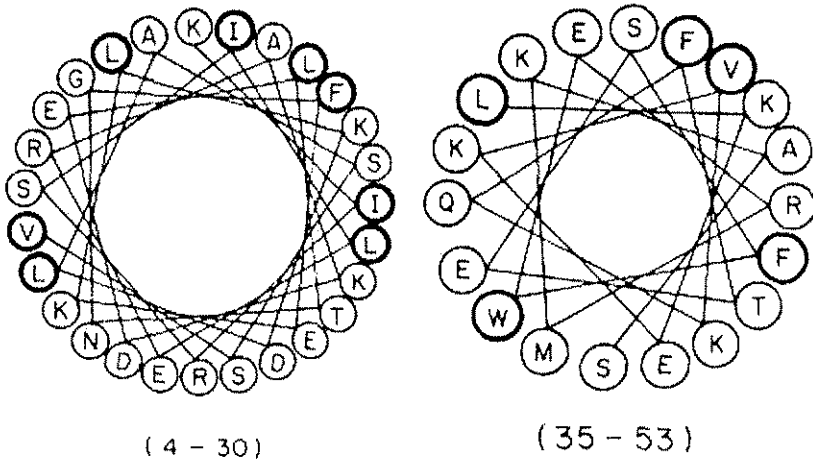


Figura 6.3. Proyecciones helicoidales de las α -hélices que forman la Apo CI. Los números entre paréntesis indican los residuos considerados en cada proyección. Los residuos con círculo de línea oscura son hidrofóbicos.

6.2.1 Estabilidad estructural de la Apo CI.

Una de las principales preocupaciones al utilizar proteínas en un experimento con el AFS, es que algunas proteínas tiene una estabilidad bastante limitada a temperatura ambiente. Dado lo anterior, se utilizó la técnica de dicroísmo circular para averiguar la estabilidad de la Apo CI con el paso del tiempo. La figura 6.4 muestra los resultados obtenidos, en ella se puede observar que aunque existe una pérdida de la estructura secundaria esta es relativamente baja y que los cambios más pronunciados ocurren en las

¹³ Bolaños-García, V. M.; Ramos, S.; Castillo, R.; Xicohtencatl-Cortes, J.; Mas-Oliva, J. J. *Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 5757-5765.

primeras 24 h. Por lo tanto, podemos considerar que la proteína se mantiene estable durante el tiempo en el que se llevaron a cabo las mediciones con el AFS. Sin embargo, hay que considerar que se pueden producir cambios estructurales en la proteína provocados por su adsorción en la superficie. Burkett y Read,¹⁴ realizaron un estudio de adsorción de péptidos con estructura α -hélice en superficies de sílica y encontraron que las interacciones intramoleculares que estabilizan la estructura α -hélice se ven perturbadas por las interacciones intermoleculares establecidas durante la adsorción, provocando un cambio conformacional de los péptidos al adsorberse en la superficie. Sin embargo, en ese mismo estudio se encontró que aunque hay una pérdida de la estructura de los péptidos parte de la estructura α -hélice se mantiene.

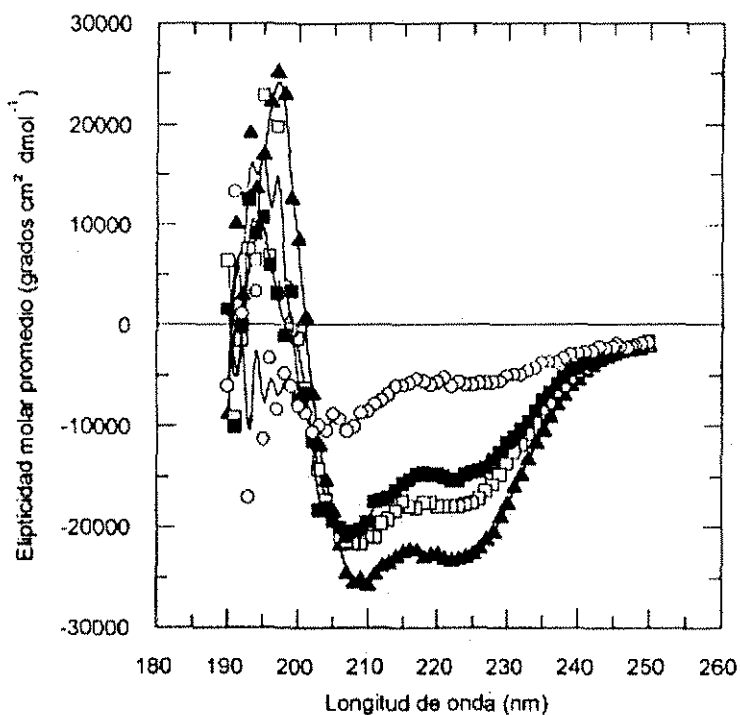


Figura 6.4. Mediciones en el tiempo de la estabilidad de Apo CI utilizando la técnica de dicroísmo circular. Las mediciones se realizaron a las 0 h (\blacktriangle), 24 h (\square), 49 h (\blacksquare) y 75 h (\circ) a una temperatura constante de 21 °C.

¹⁴ Burkett, S. L; Read, M. J. *Langmuir* 2001, 17, 5059-5065.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.2.2 Películas de Langmuir de Apo CI.

Monocapas de Langmuir de la Apo CI han sido estudiadas por Bolaños-García, *et al.* utilizando isotermas de presión-área molecular y microscopía de ángulo de Brewster.⁹ La isoterma que obtuvieron al comprimir la monocapa de Apo CI (ver figura 6.5), presenta dos transiciones de fase de primer orden. La primera es una transición que involucra la coexistencia de una fase fluida condensada (*L*) y una fase donde las moléculas no interactúan, *i.e.*, un fase gaseosa (*G*). La segunda transición de fase corresponde a una transición entre dos fases condensadas, la fase *L* y otra fase más incompresible y rígida, la fase líquido condensado (*LC*). Esta transición de fase ocurre a una presión superficial, Π , de aproximadamente 37 mN/m y un área, *a*, de 1000-1250 Å²/molécula.⁹

Bolaños-García, *et al.*⁹ propusieron un modelo de la proteína en donde la cadena polipeptídica esta formada por dos α -hélices anfífilicas las cuales están unidas por un fragmento pobremente estructurado de unos cuantos aminoácidos. Cuando estas proteínas son depositadas en la interfase aire-agua, las diferentes configuraciones de la proteína en la fase *L* presentan la restricción de estar colocadas acostadas con su eje largo hacia la subfase debido al carácter anfífilico de la proteína, ver figura 6.6.

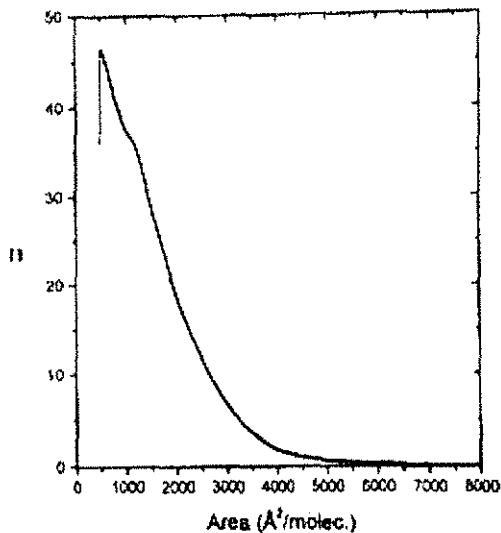


Figura 6.5. Típica isoterma Π vs *a* para Apo CI a 25 °C. Π esta en mN/m.

La transición de fase entre las fases condensadas se explica, en este modelo, como un cambio conformacional de la proteína cuando se aplica una presión lateral a la monocapa y que consiste en la desorción de una de las α -hélices anfifílicas de la subfase. La relevancia de este cambio conformacional puede ser asociado a la función fisiológica de reconocimiento de lípidos de esta familia de proteínas. Recientemente, este modelo fue corroborado por estudios de la naturaleza de las fases *L* y *LC* utilizando difracción de rayos X rasantes en monocapas de Apo CI.¹⁵ En este estudio, se encontró que a una presión superficial debajo de la transición de fase no se detectan ningún pico de difracción para la fase *L*. A una presión superficial arriba de la transición de fase, solo un pico de difracción fue detectado para la fase *LC*, lo cual indica que una de las α -hélices de la proteína se encuentra fuera del plano de la interfase aire-agua.

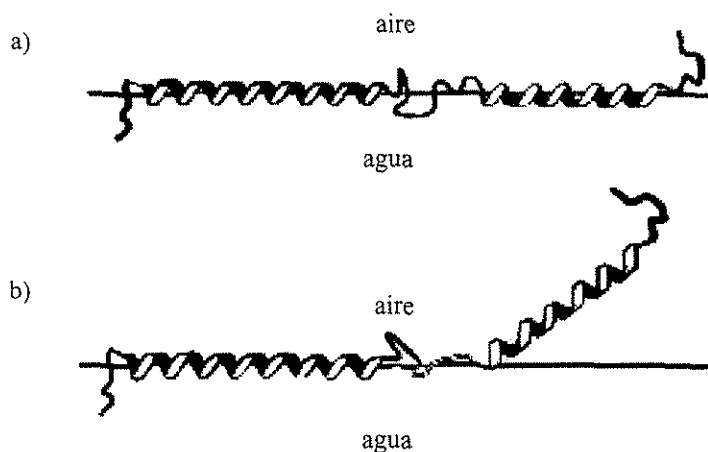


Figura 6.6. Modelo propuesto para la Apo CI en una interfase aire/agua. a) La proteína yace sobre la subfase a Π bajas. b) La proteína yace sobre la subfase con una de las α -hélices saliéndose de la superficie, cuando la presión alcanza la transición de fases *L/LC*.

¹⁵ Ruiz-García, J.; Moreno, A.; Brezesinski, G.; Möhwald, H.; Mas-Oliva, J.; Castillo, R.
Por publicar.

6.2.3 Películas de Langmuir-Blodgett de Apo CI.

Una información importante para lograr una mejor interpretación y comprensión de los resultados que se obtienen en los estudios de fuerzas de interacción, es el conocimiento de la organización y estructura conformacional que las proteínas adquieren cuando están adsorbidas en una superficie. Con el fin de obtener esta información, o al menos parte de ella, y como un estudio complementario a los experimentos del AFS, utilizamos el microscopio de fuerza atómica (MFA) para estudiar películas de Langmuir-Blodgett (LB) de Apo CI en superficies hidrofílicas (mica) e hidrofóbicas (mica-OTE).¹⁶ El propósito de utilizar ambas superficies en el MFA, así como también en el AFS, era poder estudiar el carácter anfifílico de la Apo CI, el cual juega un papel importante en el entendimiento de la manera en que las apolipoproteínas se colocan en las superficies de las lipoproteínas. Las imágenes obtenidas con el MFA permitieron, por primera vez, observar directamente el orden que existe en monocapas de polipéptidos con estructuras α -hélice. Las películas de LB utilizadas fueron transferidas en la fase *L* y en la *LC* para el caso de las superficies hidrofílicas, y solo en la fase *L* en las hidrofóbicas (esta decisión se explica más adelante). Las transferencias fueron realizadas de tal manera que la superficies siempre entraran en contacto con la parte de la proteína en la que se favorecía la adsorción, *e.g.*, superficie hidrofílica con la parte hidrofílica de la proteína.

La figura 6.7 muestra una imagen de MFA (deflexión) obtenida en modo contacto para una película de LB de Apo CI en mica, la cual fue transferida en la fase *L*. Esta imagen muestra líneas semiordenadas con un grosor de *0.4* a *0.9 nm*, el cual corresponde aproximadamente al ancho de una molécula de Apo CI. La longitud de estas líneas no se puede determinar claramente porque no son del todo continuas y derechas. Aun así, uno puede encontrar líneas con una longitud cercana al tamaño de una molécula de Apo CI (~ 8.5 nm) o de las α -hélices que la forman (*4.0* y *2.8 nm*). Dado que estas líneas cambian de dirección continuamente, se puede sugerir que el orden posicional no es de largo alcance. La falta de orden de largo alcance de las películas de LB, la fluidez que se observa con

¹⁶ Xicohtecatl-Cortes, J.; Mas-Oliva, J.; Moreno, A.; Campos-Terán, J.; Castillo, R. Por publicar.

MAB,⁹ y la falta de picos de difracción de rayos X,¹⁵ parecen confirmar la naturaleza líquida bidimensional propuesta para la fase *L*.

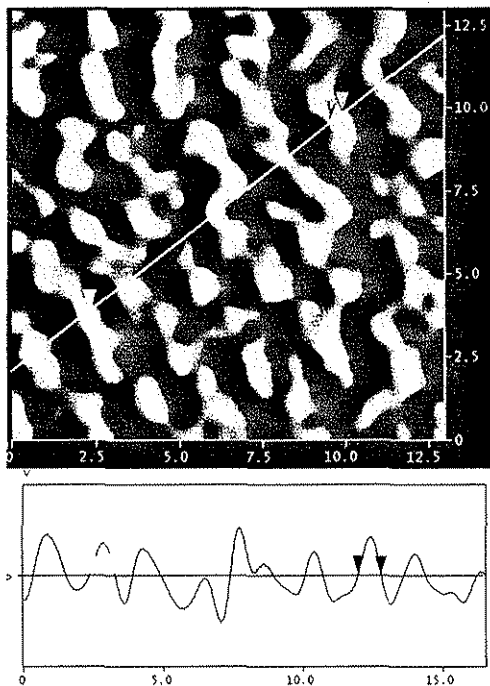
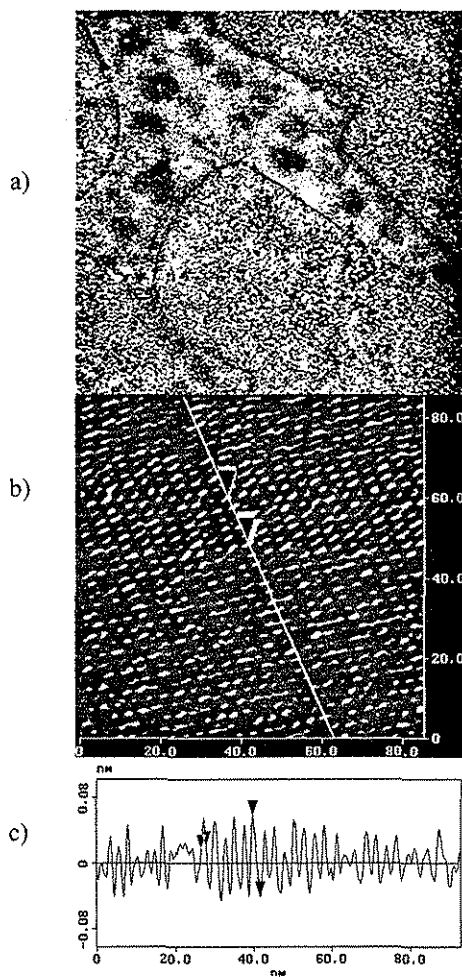


Figura 6.7. Imagen de deflexión de MFA de una monocapa de Apo CI transferida a 25 °C y $\Pi=20$ mN/m (debajo de la transición de fase), y su perfil vertical de voltaje. La distancia horizontal entre las flechas grises es 0.86 nm, y 0.81 nm entre las flechas negras.

Similares resultados se obtuvieron a partir de las imágenes de películas de LB de Apo CI transferidas a partir de la fase *L* a una superficie hidrofóbica de OTE, ver figura 6.8. Aquí, a diferencia de el caso de la superficie hidrofílica, y de acuerdo al modelo propuesto anteriormente, las α -hélices deben estar volteadas boca abajo con respecto a las mostradas en la figura 6.7, *i.e.*, la cara hidrofóbica esta unida a la superficie y la cara hidrofílica esta expuesta al aire. En esta imagen, al igual que en el caso de la superficie hidrofílica, no se observa un ordenamiento posicional de largo alcance y las líneas parecen estar formadas por secuencias alineadas de dos unidades. Cada unidad tiene un grosor de *ca.* 1.3 nm y si se miden ambas unidades juntas la longitud es en promedio de 7.7 nm. Estos valores

corresponden aproximadamente a los valores de grosor y longitud de las dos α -hélices de una molécula de Apo CI. Sin embargo, el valor de grosor de una unidad es mayor al que uno esperaría para una α -hélice (0.7-1.0 nm), esto probablemente se deba a un efecto debido al tamaño de la punta del MFA.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

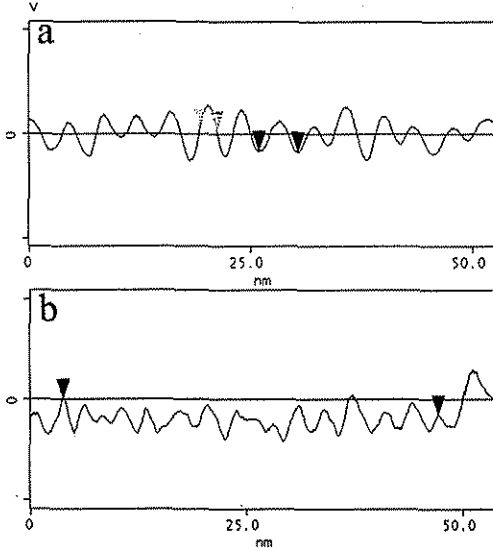
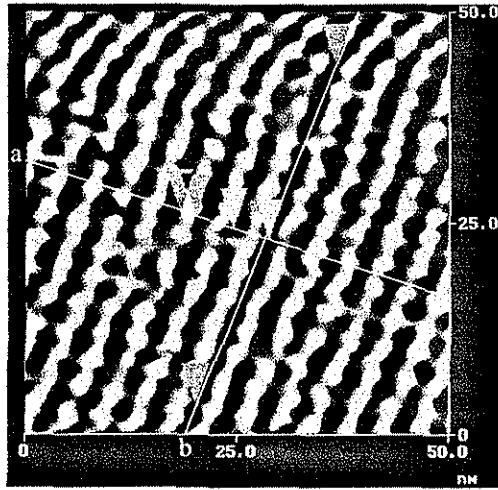
Figura 6.8. a) Imagen de MFA en modo contacto intermitente ($5 \times 5 \mu\text{m}$) de una monocapa de Apo CI transferida en una película de OTE con agregados. b) Imagen de altura de MFA de una monocapa de Apo CI transferida sobre mica hidrofóbica a $\Pi = 20 \text{ mN/m}$, i.e., debajo de la transición L-LC (esta imagen no está relacionada con la imagen (a)). Aquí las proteínas se encuentran al revés de cómo están en la figura 6.7. c) Perfil de altura a lo largo de la línea que cruza (b). La distancia horizontal entre las flechas grises es ca. 1.3 nm . La distancia vertical entre las flechas negras es 0.1 nm y la distancia horizontal entre ellas es ca. 1.8 nm .

Con estos dos resultados descritos anteriormente, se puede proponer un modelo, similar al de Bolaños-García, et. al.,⁹ en donde las moléculas de Apo CI, en la fase *L* y a las presiones laterales de transferencia, se encuentran dispuestas de manera paralela, sin un orden de largo alcance, con las α -hélices colocadas con su eje largo paralelo a la superficie de agua, y con la cara hidrofóbica expuesta al aire.

La figura 6.9 muestra una imagen de MFA (deflexión) obtenida en modo contacto de una monocapa de Apo CI transferida en mica a partir de la fase *LC*. Aquí, se observan líneas brillantes separadas por líneas oscuras; estas líneas no están al mismo nivel de altura puesto que presentan diferentes valores de brillo. Las líneas brillantes presentan un grosor entre 1.5 y 2.0 nm, y parecen estar formadas por objetos que se encuentran relativamente cercanos entre sí, porque forman una línea casi continua a la resolución del MFA, aunque si se realiza un corte a través de esta línea brillante (no se muestra) se observa un perfil con picos dispuestos de una manera irregular con una distancia promedio de 1.8 nm. La distancia promedio centro a centro entre las líneas oscuras es de 4.5 nm, la cual concuerda con la longitud del segmento de α -hélice más grande de la Apo CI. Estas líneas oscuras no son planas y presentan pequeños bultos con un grosor cercano al de una α -hélice. Esta imagen concuerda con el modelo propuesto por Bolaños-García *et al.* en el que, en la fase *LC*, la α -hélice más larga de la Apo CI se encuentra probablemente asociada a la superficie de agua, mientras que la más pequeña, que forma las líneas brillantes, se encuentran desorbida de la superficie, ver figura 6.10. Esta propuesta también concuerda con el hecho de que la α -hélice más larga es la que mayor momento hidrofóbico tiene,⁹ y por lo tanto está más propensa a unirse a la superficie hidrofóbica.

No se realizaron transferencias de la monocapa de Apo CI en la fase *LC* a una superficie hidrofóbica porque, de acuerdo al modelo propuesto para la fase *LC*, el proceso de depósito destruiría la conformación doblada de la proteína debido a la fuerte interacción hidrofóbica entre las caras hidrofóbicas de las α -hélices y la superficie.

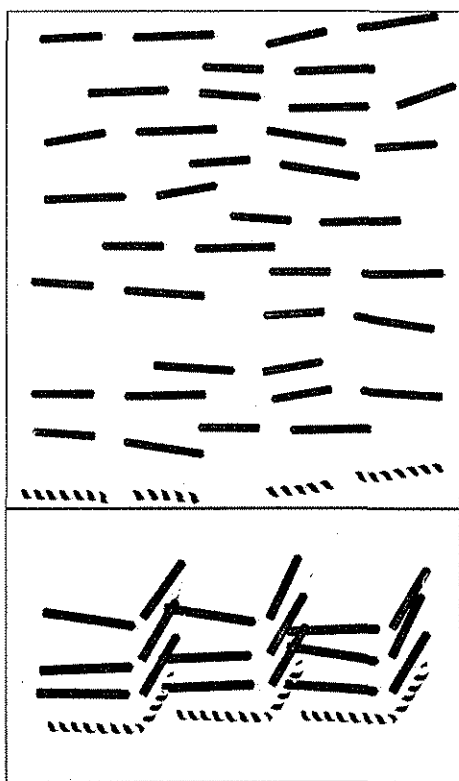
Es importante mencionar aquí, que las transferencias realizadas en superficies hidrofóbicas (mica-OTE) fueron más fáciles de trabajar que las realizadas en mica, *i.e.*, en general se observó una mejor y mayor adsorción de Apo CI en las superficies de mica-OTE que en mica pura. Como se explicó en el capítulo 3, las películas de LB son formadas al transferir una monocapa de Langmuir a una superficie



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 6.9. Imagen de deflexión de MFA de una monocapa de Apo CI transferida en micas a $\Pi = 43 \text{ mN/m}$ (arriba de la transición L-LC). Perfiles de voltaje verticales: a) la distancia horizontal entre las flechas grises es 2.0 nm ; la distancia horizontal entre las flechas negras es 4.4 nm . b) la distancia horizontal entre las flechas negras es 43.4 nm .

En el caso de las películas de LB de Apo CI transferidas en mica y mica-OTE, estas presentaban pequeños cristales de KCL a lo largo de la superficie (ver figura 6.8a), los cuales provenían de la subfase en las que se encontraba la monocapa (grandes cantidades de KCL se usan para lograr que la Apo CI se coloque en la en la interfase aire/agua y forme la monocapa). Para lograr hacer los barridos en el MFA era necesario remover estos cristales, entonces, se procedió a “lavar” con agua ultra pura las superficies. Desafortunadamente, en el caso de las superficies de mica, no solo se removieron los cristales de KCL sino también gran parte de la proteína depositada, lo cual no ocurría con las superficies hidrofóbicas. Este hecho, sugiere que las interacciones electrostáticas proteína-superficie son más débiles que las interacciones hidrofóbicas proteína-superficie.



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 6.10. Modelo para la monocapa de Apo CI sugerido por las imágenes de MFA. a) Disposición de las Apo CI en la fase L. b) Disposición de las Apo CI en la fase LC.

6.3 Procedimiento experimental.

6.3.1 Materiales.

Apolipoproteína humana CI liofilizada (99 %, 1 mg/ml, PerImmune Incorporation) y solubilizada en una solución con un buffer a $pH=8$, fue filtrada a través de un filtro con una membrana de $0.02 \mu m$ y posteriormente fue inyectada en la cámara del AFS o depositada directamente sobre las superficies del AFS. OTE fue adquirido de Lancaster Synthesis. El agua utilizada fue destilada y pasada por un sistema purificador de agua Milli-Q (Millipore Corp.), dando al agua una resistividad final de $18 M\Omega/cm$. Para obtener soluciones libres de partículas, el agua fue filtrada a través de un filtro de $0.1 \mu m$ antes de su utilización.

6.3.2 Método de medición de fuerzas con el AFS.

El AFS fue usado para medir la interacción entre capas adsorbidas de Apo CI en superficies hidrofílicas (mica) e hidrofóbicas (mica-OTE). Las superficies hidrofóbicas de OTE sobre mica fueron realizadas de acuerdo al procedimiento explicado en el capítulo cuatro. La técnica y la versión particular del aparato (Mark IV) utilizado en este estudio fueron descritos con más detalle en el capítulo 3. Para el caso de los experimentos con superficies hidrofílicas se realizaron dos diferentes formas de adsorción de la proteína. En el primer tipo, el experimento se inició llenando la cámara del AFS con agua y posteriormente se midió la fuerza de interacción entre las superficies de mica. Una vez que se encontraba que la fuerza medida estaba de acuerdo a la reportada para dos superficies de mica en agua, se procedió a inyectar una cantidad de Apo CI en el agua que rodeaba a las superficies en el AFS, para que a partir de esta se realizará la adsorción de la proteína en las superficies. En el otro tipo de experimento con superficies hidrofílicas, la adsorción de la proteína se realizó colocando una gota de una solución de $0.2 mg/ml$ de Apo CI entre las superficies de mica del AFS y posteriormente se diluyó esta solución al llenar la cámara del AFS ($400 ml$) con agua.

Para el caso de superficies hidrofóbicas los experimentos empezaron con la medición de la interacción de las superficies de OTE en agua y una vez que se encontraba una posición limpia, aunque presentara burbujas, se inyectaba una cantidad Apo CI en el agua que se encontraba rodeando a las superficies. En todos los casos, las superficies se dejaron separadas $1-2 mm$ por más de $12 h$ antes de realizar la medición de las fuerzas de

interacción entre superficies con capas de Apo CI, esto con el fin de que se alcanzara el equilibrio tanto en el sistema como en el proceso de adsorción de la Apo CI. Todas las mediciones fueron realizadas entre 20 y 21 °C.

6.4 Resultados y discusión.

6.4.1 Interacciones entre Apo CI adsorbida en superficies hidrofílicas.

A continuación se describen los resultados obtenidos en el primer tipo de experimento con superficies hidrofílicas. Aquí la adsorción de Apo CI en las superficies de mica fue a partir de la solución que rodeaba a estas. En la figura 6.11 se muestra, en el recuadro, la curva de fuerza medida en agua pura (sin proteína) como función de la distancia de separación entre las superficies. En esta curva se observa una fuerza repulsiva de largo alcance la cual es consistente con las que se han medido en estudios previos.¹⁷ Una fuerte adhesión se observó en este caso cuando las superficies se separaron. La figura 6.11 también muestra dos curvas de fuerza medidas consecutivamente entre dos superficies de mica adsorbidas con Apo CI a partir de la solución. Estas curvas se midieron 17 h después de que se inyectó una cantidad de Apo CI en el AFS para dar una concentración final de $1.5 \times 10^{-8} M$ de Apo CI a un $pH \sim 7$. El propósito de utilizar este valor de concentración de proteína era evitar un exceso de capas de proteína puesto que lo que se deseaba es que solo hubiera una capa adsorbida en cada superficie. La curva medida 17 h después de haber inyectado Apo CI no presenta fuerzas hasta los 600 Å, en donde se observa una muy pequeña fuerza repulsiva. Esta fuerza repulsiva aumenta de magnitud hasta que llega a un valor de distancia final de separación de las superficies de 14 Å. La curva de fuerza medida inmediatamente después de la anterior, presenta una pequeña fuerza repulsiva debajo de los 1000 Å la cual aumenta de magnitud hasta encontrar una barrera estérica alrededor de los 40 Å. El valor final de distancia de separación en este caso fue de 16 Å. En ambos casos, se observó una fuerza adhesiva al separar las superficies similar a la que se encontró en el caso de mica en agua pura.

¹⁷ Israelachvili, J. N., *Intermolecular and Surface Forces*, 2ª. ed., Academic Press: London, 1991.

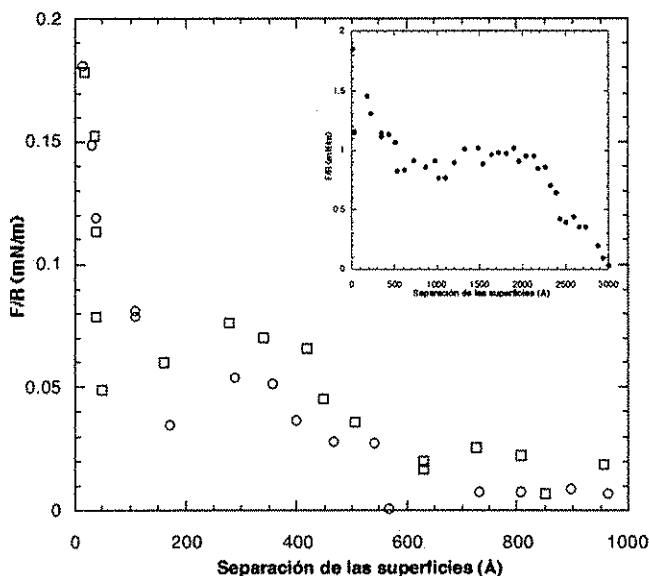
Como se puede observar al comparar las curvas medidas antes y después de la inyección de Apo CI en la cámara del AFS, la presencia de ésta en la solución reduce ampliamente la fuerza repulsiva existente entre las superficies de mica sumergidas en agua, aun considerando la baja concentración de proteína a la que se encuentra el sistema. Dado que la Apo CI tiene una carga positiva¹⁸ neta a las condiciones del experimento, es de esperarse que, debido a las fuerzas electrostáticas, se favorezca la adsorción de esta proteína en una superficie de mica cargada negativamente. El hecho de que se observe una reducción en la fuerza repulsiva después inyectar Apo CI en el agua que rodea a las superficies confirma esta suposición. Sin embargo, la pequeña fuerza repulsiva que se observa después de inyectar Apo CI, así como la presencia de una fuerte adhesión sugieren que hasta ese momento no se ha cubierto completamente la superficie de mica con la proteína. A partir de los valores finales de distancia de separación obtenidos, 14 y 16 Å, y considerando que el diámetro de una alfa hélice es de 5-7 Å, podemos suponer que la proteína se encuentra adsorbida, en cada superficie, con su eje largo sobre la superficie.

La presencia de una barrera estérica en el segundo acercamiento puede tener varias explicaciones, una es que existan varias capas de Apo CI adsorbidas sobre la superficie y que conforme se acercan las superficies estas capas son removidas del área de contacto produciendo una fuerza repulsiva estérica. La formación de multicapas en las superficies es posible puesto que con ello se favorece el ocultamiento de la parte hidrofóbica de la Apo CI de la solución acuosa. Por otro lado, se puede pensar que (de acuerdo al modelo explicado en las secciones 6.2.2 y 6.2.3) existan un cierto número de proteínas que tengan una alfa hélice desorbida de la superficie y que cuando las superficies se acercan estas entran en contacto y se produce una fuerza repulsiva.

La figura 6.12 muestra dos curvas de fuerza medidas 88 h y 89 h después de haber inyectado Apo CI en la cámara del AFS. La curva de fuerza medida a las 88 h, es similar a las que se mostraron en la figura anterior pero en este caso además de la pequeña fuerza repulsiva debajo de los 600 Å se observó una fuerza atractiva que provocó que las superficies se movieran espontáneamente desde una separación de 105 Å hasta una distancia final de 6 Å. La curva medida 89 h después de la inyección no presenta ninguna fuerza hasta los 131 Å de separación de las superficies en donde estas brincan hasta una

¹⁸ Comunicación personal del Dr. Jaime Mas Oliva.

distancia de 24 Å. La distancia final medida en este caso fue de 5 Å. En ambos casos, una fuerza de adhesión de 38 mN/m se midió al separar las superficies.



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 6.11. Curvas de fuerza, F (normalizadas por el radio de curvatura, R), contra distancia para dos mediciones consecutivas, en la misma posición, de dos superficies de mica adsorbidas con Apo CI a partir de la solución que rodea a las superficies. La curva medida 17 h después de la inyección muestra una fuerza repulsiva debajo de los 600 Å. La distancia final de separación en este caso es de 14 Å. La curva de fuerza medida inmediatamente después de la anterior (♦) presenta una fuerza repulsiva debajo de los 1000 Å que cambia a una fuerza repulsiva estérica aproximadamente a 40 Å de separación. Aquí la distancia final es de 16 Å. Para comparación, también se muestra la curva medida entre dos superficies de mica en agua (○).

Los brincos atractivos que se presenta en esas curvas pueden explicarse si se considera que puede existir un puente (bridging) entre las superficies, debido a que existen ciertos segmentos de la proteína, que está adsorbida en una superficie, que sienten una fuerza atractiva electrostática de largo alcance por la superficie opuesta. Se ha comprobado que para el caso de polieléctrolitos, es suficiente con estar cerca, pero no necesariamente unido, a ambas superficies para provocar una atracción,¹⁹ y esto también puede ocurrir en nuestro

¹⁹ Åkesson, T.; Woodward, C. E.; Jönsson, B. *J. Chem. Phys.* **1989**, *91*, 2461.

caso. Este tipo de brincos atractivos han sido observados anteriormente entre superficies cubiertas con β -caseína,²⁰ la cual es una proteína con una estructura flexible no globular. Algo peculiar, es el hecho de no medir ninguna fuerza en la curva medida a las 89 h. En este caso uno puede considerar que con el acercamiento de las superficies se provocó una adsorción de las proteínas con una conformación tal que logró neutralizar la carga de las superficies de mica. En estas dos mediciones, el hecho de observar una menor adhesión, que la que se observó en la curvas medidas a las 17 h de inyección, sugiere una mayor adsorción de Apo CI en las superficies. El valor de distancia final en ambos casos parece indicar lo contrario, pero lo más seguro es que con los brincos atractivos lo que ocurra es que se comprime la capa de proteína adsorbida.

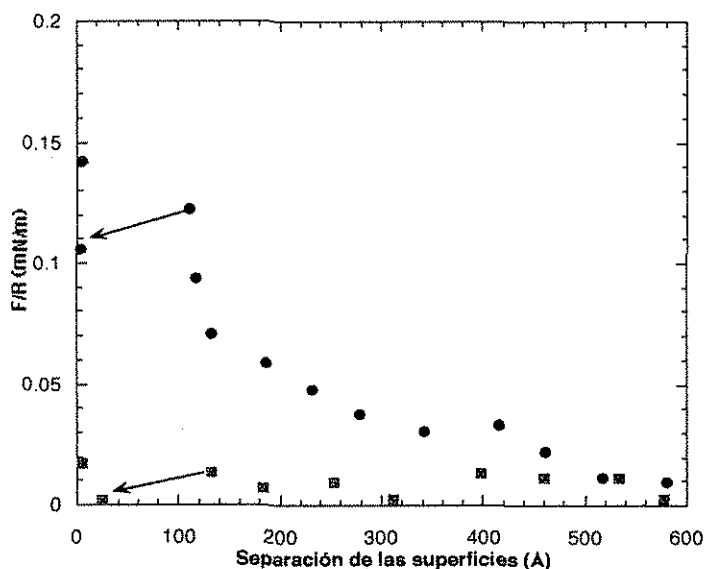


Figura 6.12. Curvas de fuerza, F (normalizadas por el radio de curvatura, R), contra distancia medidas 88 h (●) y 89 h (■) después de que se inyectó Apo CI. La curva medida a las 88 h se observó una fuerza repulsiva debajo de los 600 Å y un brinco atractivo espontáneo desde 105 hasta 5 Å de separación de las superficies. La curva de fuerza medida a las 89 h no presenta ninguna fuerza hasta que un brinco atractivo se presenta a una distancia de 131 Å. La distancia final en este caso es de 5 Å. Las flechas son simplemente una guía de la dirección de los brincos atractivos.

²⁰ Wahlgren, M.; Nylander, T. *Langmuir* 1997, 13, 6219-6225.

6.4.2 Interacciones entre Apo CI depositadas directamente en superficies hidrofílicas.

En la figura 6.13 se presentan las curvas de fuerza obtenidas después de más de 24 h de que se realizó un depósito directo de Apo CI sobre las superficies de mica, y posteriormente diluir la cantidad de proteína adsorbida sobre estas al llenar la cámara del AFS con agua. Las superficies estuvieron separadas 1 o 2 mm antes de realizar las mediciones. Las curvas son mediciones consecutivas con un tiempo de espera entre cada una de ellas. En la curva medida 24 h después del depósito de la proteína, no se observa una fuerza hasta debajo de los 200 Å de distancia de separación (aunque aparece un poco de deriva (drift), quizás debido a que las superficies no estaban en verdadero equilibrio durante la medición). A partir de ahí se empieza a observar una fuerza repulsiva de carácter estérico con un aparente movimiento oscilatorio de las superficies, *i.e.*, las superficies se acercan y separan espontáneamente durante la medición. La distancia final a una fuerza de 2.5 mN/m es de 93 Å. En la segunda medición, 26 h después del depósito y dilución, se observa una fuerza repulsiva debajo de los 1000 Å similar a las que se obtienen entre superficies cargadas, sin embargo, no fue posible ajustar la curva por medio de la teoría DLVO. Alrededor de los 100 Å se observa un cambio en la fuerza repulsiva hacia una de tipo estérico. La tercera medición, 26 h 30 min después del depósito, presenta también una fuerza repulsiva de largo alcance pero de menor magnitud que la anterior y, en este caso, la pared estérica se encontró alrededor de los 50 Å. Al separar las superficies, en los tres casos, se encontró una fuerza adhesiva de 5.58 mN/m.

La figura 6.14 muestra dos curvas de fuerza medidas de manera consecutiva 41 h y 42 h después de realizar el depósito directo de Apo CI sobre las superficies de mica y de haber diluido este depósito al llenar la cámara del AFS con agua. En este caso las superficies estuvieron separadas menos de una micra antes de la medición. En el primer acercamiento no se observa ninguna fuerza hasta debajo de los 200 Å, a partir de ahí se observa una fuerza repulsiva de carácter estérico. Aquí, al igual que en el caso de la curva medida 24 h después del depósito, se observa un claro movimiento oscilatorio de las superficies. El intervalo de oscilación es de unos 60 Å centrado alrededor de los 70 Å de separación de las superficies. En esta medición los últimos puntos de la curva se midieron sin acercar las superficies y dando un tiempo de espera de 1-3 min entre cada valor tomado.

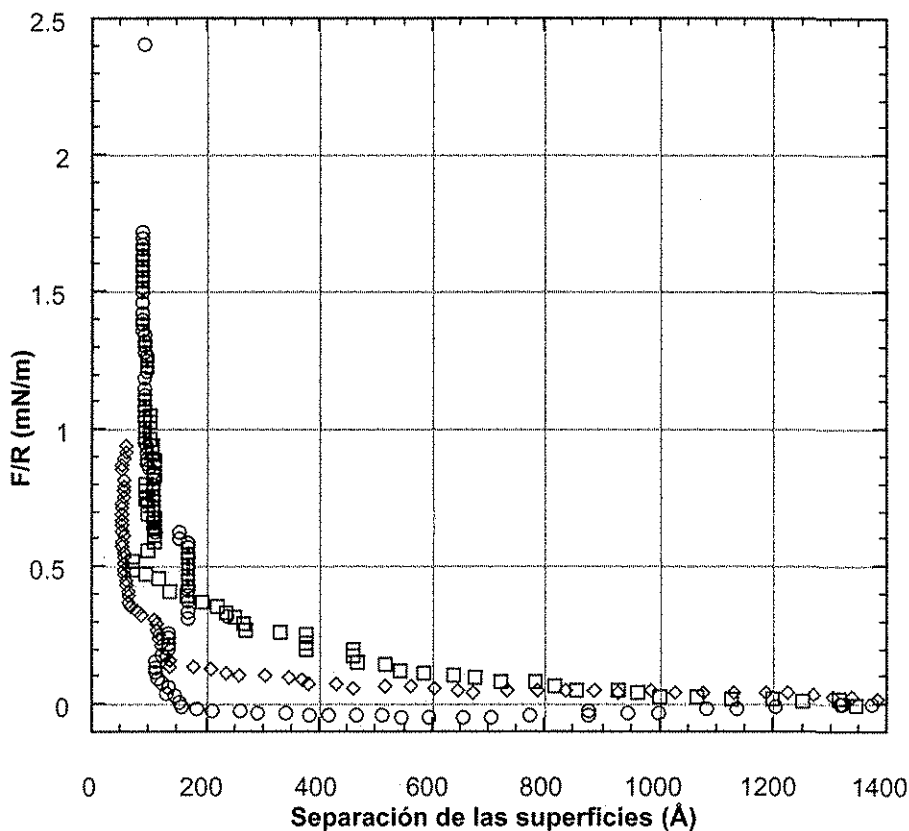


Figura. 6.13. Curvas de fuerza (normalizadas por el radio de curvatura R) vs. distancia de separación de dos superficies de mica en las que se depositó Apo C-I. En la primera medición (○), 24 h después del depósito y dilución, no se observa ninguna fuerza hasta debajo de los 200 Å, en donde se encontró una barrera estérica alrededor de los 90 Å. También, ahí se observa un movimiento oscilatorio de las superficies. En la segunda (□) y tercera (◇) medición, 26 h y 26 h 30 min después del depósito respectivamente, se observa una fuerza repulsiva de largo alcance. De la segunda a la tercera medición la barrera estérica se movió de una separación de aproximadamente 100 Å a alrededor de 50 Å.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Como se puede ver en la curva, las superficies se mueven hacia un valor de distancia de separación de equilibrio de aproximadamente 45 \AA . En este caso, si se intentaba acercar las superficies a partir de esta posición de equilibrio, las superficies se separaban y se podía volver a observar el movimiento oscilatorio en las superficies. La curva medida 42 h después del depósito presenta una pequeña fuerza repulsiva de largo alcance hasta una distancia de separación de 185 \AA en donde se observa una clara fuerza atractiva que llevó a las superficies hasta un valor de 57 \AA de separación. Al acercar más las superficies (comprimir la capa de proteína) se encontró una barrera repulsiva con un valor constante de 40 \AA . En las dos mediciones al separar las superficies estas casi no cambiaban su valor de distancia hasta que brincaban hacia grandes distancias de separación. En ambos casos se obtuvo un valor de adhesión de 5.58 mN/m . Si las superficies se dejaban separadas unos 3000 o 4000 \AA por aproximadamente 18 h , el mismo ciclo de fuerzas se volvía a medir, *i.e.*, en el primer acercamiento no se encontraban fuerzas y en el segundo se observaba una fuerza repulsiva.

Para darnos una idea de la conformación y estructura de las proteínas adsorbidas sobre las superficies de mica, se realizó un experimento equivalente en otras superficies de mica con las cuales se obtuvieron imágenes de MFA de las superficies. Como se puede ver en la figura 6.15, existe una alta cantidad de proteínas adsorbidas sobre la superficie (ver escala de altura), sin embargo, al parecer la proteína, en general, parece estar adsorbida con su eje sobre la superficie. Aquí, hay que tomar en cuenta que la proteína se encuentra expuesta al aire y no a una solución.

Teniendo en cuenta esta imagen, una posible explicación a la curvas medidas es la siguiente. Dada la manera y la cantidad de proteína que se depositó en las superficies de mica y considerando que las Apo CI tiene una carga neta positiva a las condiciones del experimento, no es de extrañarse que la proteína que se adsorbió en las superficies consiga neutralizar completamente la carga superficial de la mica. Un proceso similar se ha observado en estudios realizados en el AFS con la proteína lizosima²¹.

²¹ Blomberg, E.; Claesson, P. M.; Fröberg, J. C.; Tilton, R. D. *Langmuir* 1994, 10, 2325-2334.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

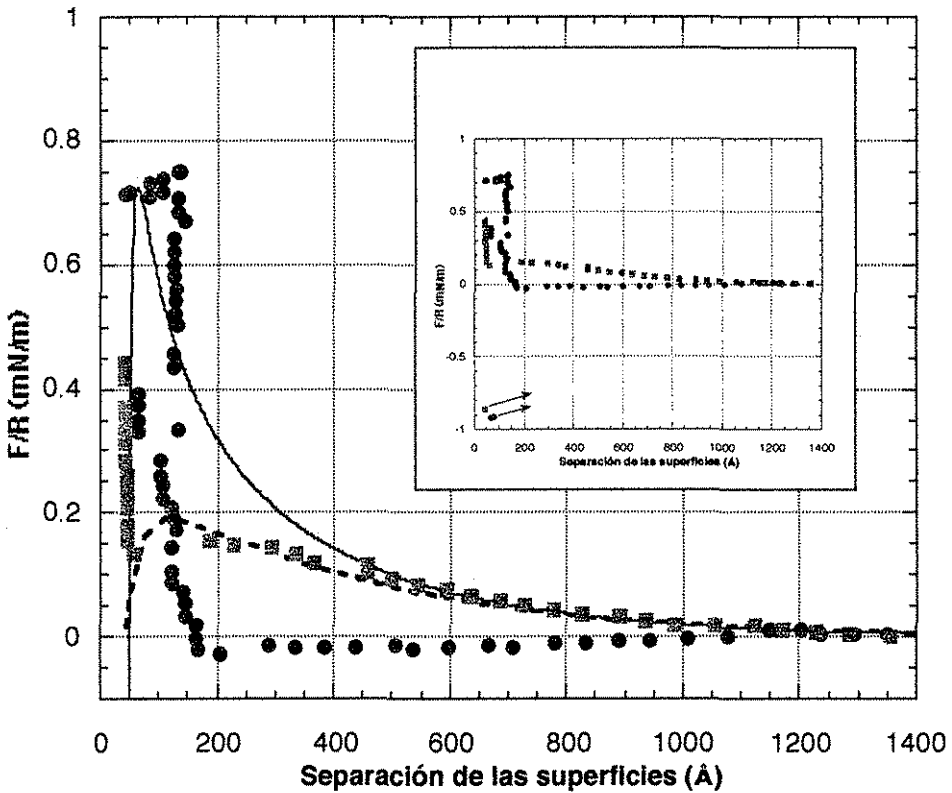
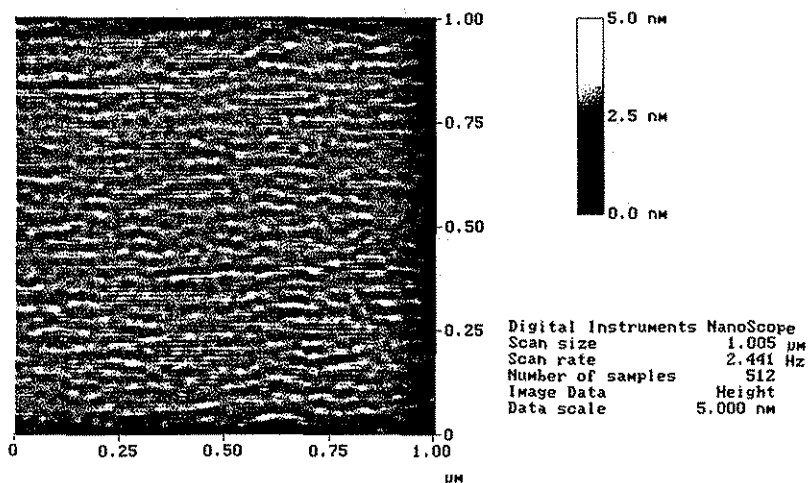


Figura 6.14. Curvas de fuerza (normalizadas por el radio de curvatura R) vs. distancia de separación de dos superficies de mica en las que se depositó directamente sobre las superficies Apo C-I, medidas 41 h (○) y 42 h (□) después del depósito. Al igual que en las curvas de la figura 6.12 en el primer acercamiento no hay fuerzas hasta que se observó una pared repulsiva debajo de los 200 \AA . En el segundo acercamiento, también se observa una fuerza repulsiva pero a diferencia de las curvas de la fig. 6.12 aquí se observa un brinco de las superficies desde 185 \AA hasta 57 \AA de separación de las superficies. El valor final de distancia de separación es 40 \AA . La curva de línea sólida representa el ajuste por DLVO a condiciones de carga superficial constante y la de línea punteada a condiciones de potencial de superficie constante (ver texto para detalles). En el recuadro se observa como existe una adhesión que mantiene unidas las superficies, cuando se intenta separarlas, hasta que al llegar a un valor de fuerza estas brincan hacia grandes distancias de separación

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



06261212.002

Figura 6.15. Imagen de MFA, modo contacto (1 X 1 μm), de Apo CI depositada directamente, a partir de una gota de 0.2 mg/ml de Apo CI, sobre una superficie de mica. Antes de realizar el barrido, se dejo que la gota se evaporara.

En nuestro caso, así como en el de la lisozima, no se observa una recarga de la superficie (de signo contrario a la original), y esto puede deberse a diferentes causas. Por un lado, las superficies siempre se mantuvieron cerca una de otra (menos de 1 micra) con lo que no se facilita el transporte de la poca cantidad de proteína que pudiera encontrarse en la solución que rodea a las superficies. También, la adsorción de la proteína es seguida por un intercambio iónico, en donde protones y algunos iones que se encuentren en la solución son desplazados de la superficie de la mica.^{22,23} Así mismo, la Apo CI se adsorbe con la mayor parte de sus cargas positivas hacia la superficie de la mica, con lo que los grupos ionizables son transferidos hacia una región de constante dieléctrica baja (escondidas de la solución), provocando un cambio en el equilibrio ácido-base hacia un estado sin carga.

²² Herder, P. C.; Claesson, P. M.; Herder, C. E. *J. Colloid Interface Sci.* **1987**, *119*, 155.

²³ Rutland, M. W.; Waltermo, Å.; Claesson, P. M. *Langmuir* **1992**, *8*, 176.

En los primeros acercamientos, se puede observar que cuando las superficies llegan a una distancia cercana al doble del tamaño de la Apo CI, 140 \AA , las proteínas entran en contacto y empiezan a interactuar entre ellas de una manera repulsiva. Al acercar más las superficies las proteínas se ven forzadas a una mayor interacción entre ellas y a organizarse en el espacio disponible entre las superficies, lo que se manifiesta en la forma de un movimiento oscilatorio de la posición de las superficies (ver figura 6.16). Estas oscilaciones fueron disminuyendo en subsecuentes mediciones, posiblemente porque se eliminó de manera permanente a las capas en exceso o porque hay una mayor organización de las capas. Como se vio en los valores tomados sin mover las superficies, estas llegan a una posición de equilibrio siempre y cuando no se perturbe al sistema durante un tiempo suficiente. Las oscilaciones que se observan en la pared repulsiva y los valores de distancia final que se obtienen sugieren que la proteína interactúa con toda su longitud, 70 \AA , a través de las superficies (ver figura 6.16). Este tipo de movimiento oscilatorio se ha observado en superficies que no están completamente cubiertas con poliestireno²⁴ (i.e. tipo cepillo polimérico), y también en insulina adsorbida en mica.²⁵ En nuestro caso, lo más probable es que este movimiento de las superficies se deba a que se da un rearrreglo de las proteínas o se remueven las capas en exceso que se encuentran sobre las superficies y a que entre cada paso de acercamiento de las superficies no se dio el tiempo suficiente ($10-15 \text{ s}$) para que las superficies llegaran a una distancia de separación de equilibrio.

La repulsión que se observa en las mediciones siguientes al primer acercamiento pueden deberse al hecho de que al separar las superficies se perturba la capa, o capas, que puedan estar adsorbidas. Esta perturbación puede provocar que se desorba la totalidad, o solo una parte, de algunas de las proteínas que se encontraban adsorbidas, las cuales actuarían como una partícula cargada entre las superficies. Esta fuerza repulsiva es claramente de tipo electrostático y puede ser ajustada utilizando la teoría de DLVO, colocando el plano de origen de la fuerza a 40 \AA de la posición de contacto mica-mica. La longitud de decaimiento que se obtiene con el ajuste es de 320 \AA (correspondiente a una concentración electrolítica 1:1 de $9 \times 10^{-5} \text{ M}$) y un potencial de superficie de -40 mV .

²⁴ Ruths, M. Tesis de la Universidad de California, Santa Barbara, CA, EUA, 1996.

²⁵ Nylander, T.; Kekicheff, P.; Ninham, B. W. *J. Colloid. Interface Sci.* **1994**, *164*, 136-150.

El brinco atractivo que se observa en el segundo acercamiento de las superficies sugiere la formación de puentes entre las superficies (como se observó también en las mediciones descritas en la sección anterior), y apoya la idea de que las proteínas, o parte de ellas, se desorben de las superficies en el primer acercamiento y que estas presentan una fuerte atracción hacia la superficie opuesta (ver figura 6.16). Sin embargo, en este caso, a diferencia de los puentes descritos en la sección anterior, lo más probable es que los puentes se formen por la atracción que existe entre la misma Apo CI y no por las superficies en sí, ya que por la forma en la que se realizó el depósito de la proteína es poco probable que existan áreas expuestas de la mica. La distancia final, 40 \AA en este caso, parece indicar que en efecto parte de la proteína está adsorbida en la superficie y parte se encuentra proyectada hacia la solución, lo que concuerda de alguna manera con el modelo de la proteína en una interfase propuesto por Bolaños-García, et. al.⁹

El hecho de que exista una adhesión de 5.58 mN/m sugiere la existencia de una fuerte interacción entre las capas adsorbidas de Apo CI (que sin embargo es menor a la medida en el experimento en el que se adsorbe la proteína desde la solución que es de 38 mN/m). Esta interacción lo más probable es que se de principalmente entre las partes hidrofóbicas de la Apo CI, no solo porque esta parte es la que se esperaría que estuviera expuesta a la solución sino porque lo más probable es que las proteínas se unan por su parte hidrofóbica puesto que de esa manera se remueve a los grupos hidrofóbicos de la solución acuosa. De estas curvas, también se puede observar que la Apo CI presentan una alta estabilidad conformacional, ya que no se observa un cambio en la distancia durante las compresiones de las capas de proteína (ver paredes estéricas), ni tampoco cuando las superficies son separadas.

En subsecuentes mediciones de fuerzas y en mediciones en otros puntos de contacto de las superficies se observaron las mismas características descritas anteriormente en las fuerzas medidas, confirmando una adsorción homogénea en las superficies.

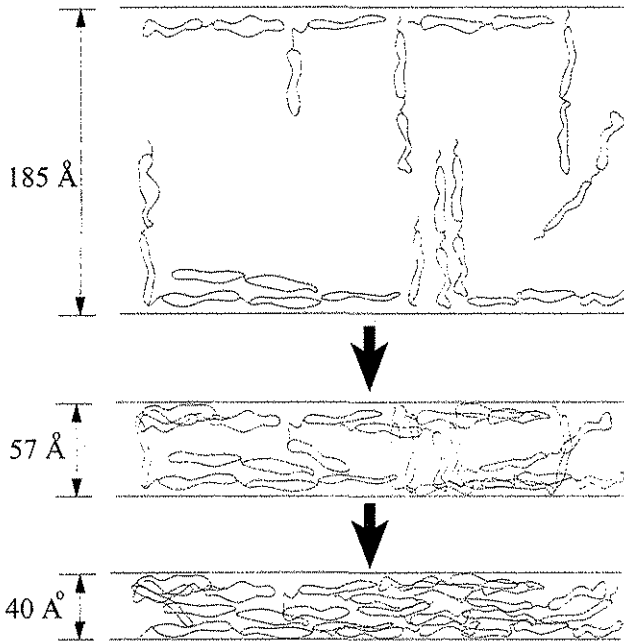


Figura 6.16. Modelo de las posibles configuraciones e interacciones entre dos superficies que tienen adsorbidas una gran cantidad de moléculas de Apo CI. a) A una distancia de separación de las superficies cercana al doble del tamaño de una molécula de Apo CI, *i.e.* 185 Å, las proteínas pueden presentar fuerte interacciones entre ellas provocando la formación de puentes, los cuales se observan en las curvas de fuerza como brinco atractivos. A esta distancia son posibles todas las configuraciones de la proteína. b) La posición final del brinco atractivo, 57 Å, sugiere que la proteína se organiza con una parte adsorbida a la superficie y otra hacia la solución. c) Si se comprime más la capa de proteína se llega aun valor de distancia de 40 Å, este valor es cercano al tamaño de una de las α -hélices que forman la Apo CI.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.4.3 Interacciones entre Apo CI adsorbida en superficies hidrofóbicas.

Previamente a la medición de las curvas de fuerza entre superficies hidrofóbicas de OTE en la presencia de Apo CI, se midieron las fuerzas entre las superficies de OTE en agua. Las curvas obtenidas fueron similares a las descritas en el capítulo 4, en donde se presentaba una fuerte fuerza repulsiva debido a la presencia de burbujas. Aquí, al igual que en el caso de MO, la presencia de Apo CI logró eliminar las burbujas presentes y permitió la posterior medición de la interacción entre las superficies hidrofóbicas adsorbidas con Apo CI.

La figura 6.17 muestra dos curvas medidas consecutivamente 6 h después de que se inyectó Apo CI en la cámara del AFS para dar una concentración final de $3 \times 10^{-8} M$. Nótese, que aquí la distancia de separación de 0 \AA representa la posición en la cual se encontraba el contacto entre las capas de OTE, *i.e.*, 42 \AA a partir del contacto mica-mica. La curva medida en el primer acercamiento presenta una fuerza repulsiva de largo alcance, muy probablemente de un origen electrostático dada la forma de la curva y el hecho de saber que existen partículas (las proteínas) cargadas entre las superficies. Al acercar las superficies estas llegan hasta un valor de 65 \AA , en donde si se comprimía más no se observaba ningún cambio apreciable en la separación de las superficies. La curva de fuerza medida al separar las superficies muestra que el contacto es ligeramente adhesivo y el hecho de que no haya un fuerte cambio en la distancia de separación antes de separarse las superficies indica que las capas formadas son bastante incompresibles. En el segundo acercamiento, las superficies dan esencialmente la misma curva de fuerza que la medida anteriormente, con excepción de la distancia final que en este caso fue de 55 \AA .

La figura 6.18 muestra las curvas medidas de manera consecutiva entre superficies de OTE, 31 h después de que se inyectó Apo CI en el AFS. Las curvas son esencialmente las mismas que se describieron en la figura anterior con una importante diferencia, aquí la distancia final de las superficies es significativamente menor a la observada anteriormente. Las distancias finales fueron 24 y 14 \AA para el primero y segundo acercamiento, respectivamente. Así mismo, en esta figura se muestra como estas curvas pueden ser ajustadas por medio de la teoría DLVO colocando el plano de origen de las fuerza a 18 \AA de la posición de contacto mica-mica y utilizando una constante de Hamaker de $0.5 \times 10^{-20} J$. En este caso la longitud de decaimiento que se obtiene con el ajuste es de 155 \AA

(correspondiente a una concentración electrolítica 1:1 de $3.9 \times 10^{-4} M$) y un potencial de superficie de $-50 mV$.

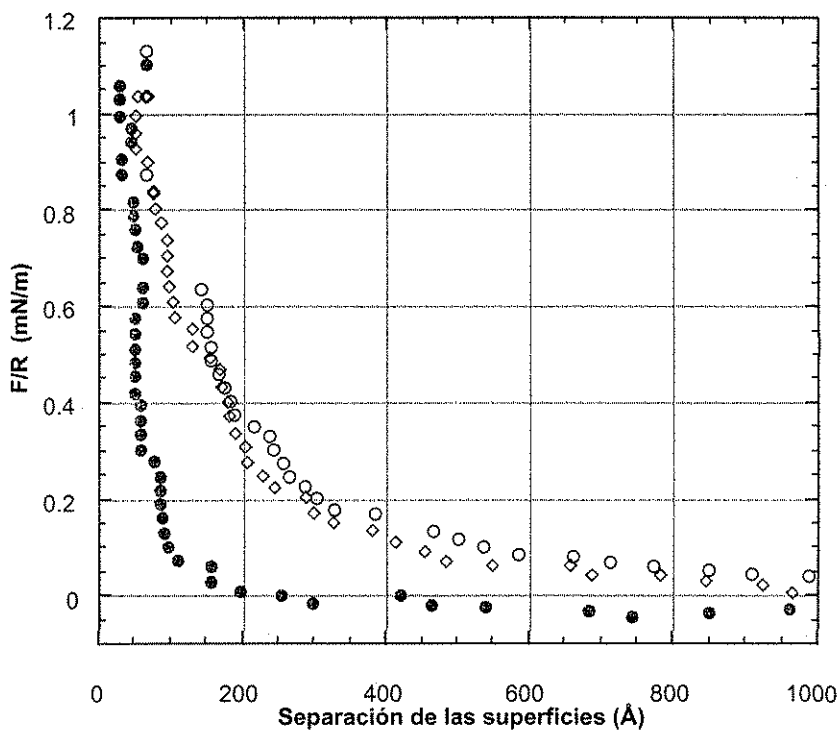


Figura 6.17. Curvas de fuerza, F (normalizadas por el radio de curvatura R), vs. distancia de separación de dos superficies hidrofóbicas de OTE en las que se adsorbió Apo C-I, medidas de manera consecutiva $6 h$ después de que se inyectó la proteína en el AFS. La curva medida en el primer acercamiento (\circ), muestra una repulsión de largo alcance debajo de los 1000 Å , el valor final de distancia en este caso es de 65 Å . La curva medida al separar las superficies (\bullet), muestra una muy pequeña adhesión. La curva medida en el segundo acercamiento (\diamond) es similar a la del primero, aquí la distancia final es de 55 Å .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En general, se sabe que las proteínas se adsorben en una mayor cantidad en superficies hidrofóbicas.²⁶ Esto parece corroborarse en el caso de la Apo CI, ya que se observa una fuerte adsorción solo 6 h después de haber inyectado la proteína. La adsorción de Apo CI en una superficie hidrofóbica era de esperarse dado el carácter anfifílico de esta proteína. Las curvas de fuerza electrostáticas obtenidas, indican que las proteínas se adsorben preferentemente con su lado hidrofóbico hacia la superficie (removiéndose de la no favorable fase acuosa) y dejando el lado con residuos cargados expuesto a la solución acuosa. Tanto estos segmentos cargados de las proteínas que están adsorbidas, como las proteínas que muy probablemente se encuentren entre las superficies, forman una doble capa electrostática que se observa en las curvas medidas como una clara fuerza repulsiva. La disminución de la adhesión, comparada con la que se presenta entre las superficies de OTE en agua, sugiere que la Apo CI cubre completamente la superficies de OTE. Así mismo, la disminución del grosor de la capa adsorbida entre mediciones consecutivas, como el hecho de que casi no haya una adhesión entre las capas de Apo CI, parece indicar que en este caso las conformaciones producidas por la adsorción de la Apo CI no favorecen las interacciones entre las proteínas mismas. El hecho de que no se observe una fuerte adhesión apoya la idea de que la proteína se adsorbe mostrando su lado con residuos cargados, ya que uno no espera que la adhesión producida por interacciones electrostáticas sea de una gran magnitud. Por lo menos no más grande que la que existiría entre superficies que tiene expuestos grupos hidrofóbicos y que interaccionan a través de estos (que es el efecto que se observó en los experimentos con superficies de mica).

Algo interesante en el caso de la adsorción de Apo CI en superficies hidrofóbicas, es que no se observan los puentes que se observaban en las superficies hidrofílicas. Una explicación posible a esto, es que la interacción de la proteína con la superficie es más fuerte y difícilmente segmentos de esta pueden desorberse de la proteína. La fuerte adhesión de la Apo CI en superficies hidrofóbicas se comprobó en los experimentos que se realizaron con películas de LB de Apo CI. Además, para que ocurra un puente es necesario que exista una fuerte afinidad de largo alcance entre los segmentos de la Apo CI y las

²⁶ Claesson, P. M.; Blomberg, E.; Fröberg, J. C.; Nylander, T.; Arnebrant, T. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1995**, *57*, 161-227.



superficies, lo que parece que no ocurre en este caso quizás debido a la conformación que obtiene la proteína en estas superficies.

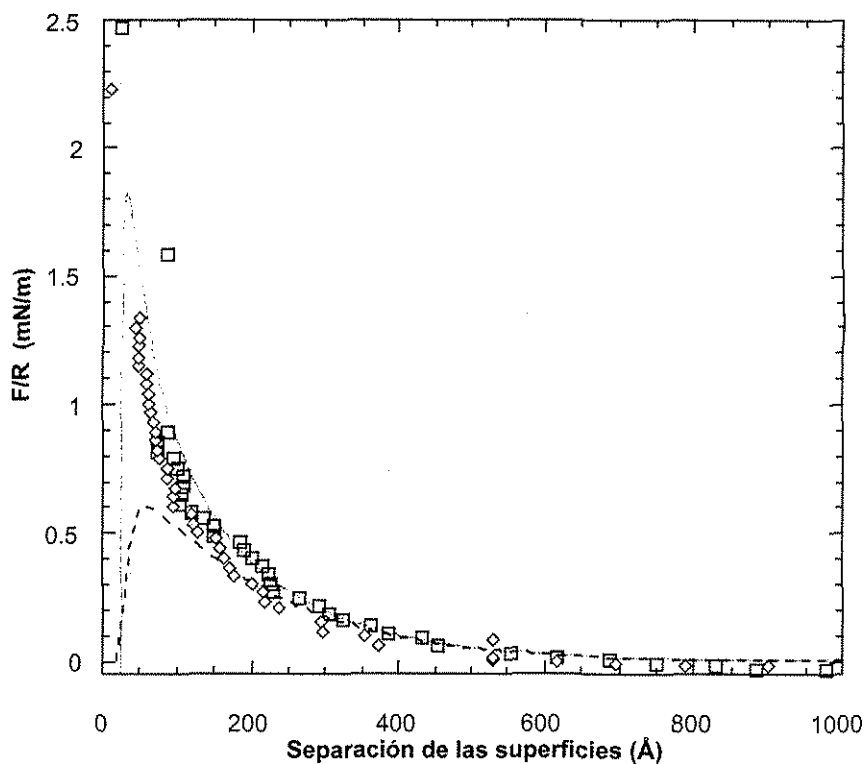


Figura 6.18. Curvas de fuerza, F (normalizadas por el radio de curvatura R), vs. distancia de separación de dos superficies hidrofóbicas de OTE en las que se adsorbió Apo C-I, medidas de manera consecutiva $31 h$ después de que se inyectó la proteína en el AFS. La curva medida en el primer acercamiento (\square), muestra una repulsión de largo alcance debajo de los 1000 \AA , el valor final de distancia en este caso es de 24 \AA . La curva medida en el segundo acercamiento (\diamond) es similar a la del primero, aquí la distancia final es de 12 \AA . Estas fuerzas repulsivas pueden ser ajustadas a una curva de fuerza DLVO (ver texto para detalles). La curva de línea sólida corresponde a condiciones de carga superficial constante y la de línea punteada a condiciones de potencial de superficie constante.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.5 Conclusiones.

Las fuerzas de interacción entre capas de Apo CI en mica y en mica-OTE están formadas principalmente por fuerzas electrostáticas de doble capa a grandes distancias de separación de las superficies y por fuerzas repulsivas estéricas a distancias de separación pequeñas. En algunos casos, no se logró medir ninguna fuerza antes de llegar a una pared estérica, lo que sugiere una completa neutralización de la carga superficial a través de la adsorción de la proteína.

Los experimentos tanto en mica como en mica-OTE muestran una adsorción de Apo CI sobre las superficies, pero es claro que está más favorecida en superficies hidrofóbicas (esto no considerando el caso del depósito directo de Apo CI en mica), en donde el tiempo necesario para lograr que la Apo CI se adsorbiera en la superficie fue menor y se obtuvieron valores más grandes de grosor de capa adsorbida. Este hecho corrobora lo que se observó en los experimentos que se realizaron con películas de LB de Apo CI.

En el caso de las capas de Apo CI adsorbidas en mica a partir de una solución, las moléculas de Apo CI parecen adsorberse con su eje largo sobre la superficie, formando una capa de entre 6 y 8 Å. Cuando se depósito un exceso de proteínas en las superficies, las proteínas parecen adsorberse en diferentes conformaciones, pero el valor final de distancia de separación sugiere que se adsorbe con una parte sobre la superficie y una expuesta hacia la solución. En el caso de la adsorción en mica-OTE, varias capas de Apo CI parecen adsorberse sobre las superficies pero estas pueden ser removidas con los diferentes acercamientos que se realizaron para medir las fuerzas. La capa que se encuentra adsorbida en la superficie parece tener a las moléculas de Apo CI con su eje largo sobre la superficie. La adhesión obtenida tanto en los experimentos con mica, como con los de mica-OTE, indican que las interacciones entre las capas de Apo CI que se llevan a cabo con la cara hidrofóbica de la proteína son más fuertes que las que se llevan a cabo con la cara hidrofílica.

Toda esta información nos permite dar una imagen sobre la organización e interacción entre las Apo CI adsorbidas en superficies. Por un lado, los resultados demuestran que la interacción hidrofóbica dirige la adsorción y conformación de la Apo CI en las superficies, tanto en la hidrofílica (formación de puentes y mayor adhesión entre las capas) como en la hidrofóbica (mayor adsorción y mayor adhesión con la superficie). En general, la proteína

intentará esconder la parte hidrofóbica de las α -hélices de la solución. De particular interés es el hecho de que se observen “puentes”, brincos atractivos, entre superficies hidrofílicas (mica) adsorbidas con Apo CI, pues esto pueden tener implicaciones sobre la forma en la que las Apo CI se mueven entre las lipoproteínas. Por un lado, las distancias de interacción, en los brincos atractivos, muestran que no es estrictamente necesario que estén en contacto las moléculas para que exista una fuerza atractiva entre las proteínas. No es fácil discernir cual interacción es la que provoca estos puentes, si la interacción proteína-proteína o la interacción proteína superficie. Sin embargo, el hecho de que no se presenten brincos atractivos en las mediciones realizadas con superficies hidrofóbicas, parece sugerir que la interacción predominante es la que existe entre las partes hidrofóbicas de la proteína. Es importante hacer notar aquí, que la magnitud de las fuerzas medidas en todos los experimentos son inusualmente pequeñas, menores a 2.5 mN/m , y esto también puede ser un factor importante durante el intercambio de las Apo CI.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Conclusiones generales.

Se logró producir y caracterizar una monocapa de OTE en la interfase aire/agua y el depósito de esta monocapa sobre mica, para producir una superficie hidrofóbica. Los experimentos realizados en esta tesis demuestran que esta monocapa produce superficies planas, estables, sin polímero fuera del plano de la superficie y que además no presentan fuerzas de largo alcance, propiedades que son excelentes para una superficie que se piense usar en mediciones de fuerzas de interacción con el AFS. Así mismo, nuestros resultados indican que las interacciones “hidrofóbicas” de largo alcance que se suelen medir, son resultado de que exista material en exceso o nano burbujas sobre las superficies. De tal forma que, en mi opinión, es necesario desarrollar una extensa caracterización de las superficies hidrofóbicas antes de utilizarlas, para evitar confusiones en las interpretaciones de los resultados de las fuerzas de interacción.

Una clara actividad de la lipasa TLL sobre una capa de MO se observó en los experimentos realizados en el AFS y elipsometría. Un cambio de una fuerza estérica de largo alcance a una fuerza repulsiva de tipo electrostático se observó en el AFS al adicionar la lipasa TLL a una capa adsorbida de MO en una superficie hidrofóbica. En las condiciones de los experimentos realizados no se observó una adsorción de la TLL en las superficies hidrofóbicas. La rigidez y el tamaño de las capas de MO formadas en el AFS indican que, muy probablemente, la estructura autoensamblada formada tenga una fase cúbica. La formación de esta fase, a través de una separación de fases inducida capilarmente, es de gran importancia por sus posibles aplicaciones prácticas.

En el curso de este trabajo aprendimos que la Apo CI es una proteína anfifílica con dos α -hélices unidas con una región no estructurada que funciona como bisagra, que al colocarla en una monocapa y ejercerle una presión se obtiene un cambio conformacional de esta proteína. De igual forma, se ha avanzado en el entendimiento de la forma en la que interactúa esta proteína cuando esta adsorbida en una superficie. La Apo CI adsorbida en superficies hidrofílicas e hidrofóbicas interactúan por medio de una fuerza electrostática de doble capa a grandes distancias de separación entre las superficies y por fuerzas repulsivas estéricas a distancias de separación pequeñas. Así mismo, se

puede observar un proceso de carga y descarga de las superficies de mica debido a la desorción y adsorción, respectivamente, de la Apo CI. Es claro que el proceso de adsorción, tanto en superficies hidrofílicas como hidrofóbicas, está dirigido por las interacciones hidrofóbicas entre las proteínas y de las proteínas con las superficies.

Estos resultados sugieren que a ciertas presiones laterales los cambios conformacionales que ocurren en las monocapas, junto con las pequeñas magnitudes de las fuerzas medidas y la presencia de fuerzas atractivas a distancias cercanas al tamaño de las moléculas de Apo CI, pueden tener implicaciones biológicas, si visualizamos los cambios conformacionales como parte de un mecanismo de disparo sensible a los cambios en la presión lateral que pudieran ocurrir en las superficies de las lipoproteínas durante su recorrido por el plasma sanguíneo.

Apéndice 1.

A continuación se describe el método desarrollado por Chan, Pashley y White¹ para calcular la interacción electrostática de un electrolito 1:1 entre dos superficies idénticas, planas, cargadas y paralelas. Se utiliza la misma notación que la que se usó en el capítulo 2. La ecuación de Poisson-Boltzmann para el caso de un plano con un potencial escalado Y ($e\psi/kT$), en una solución de un electrolito 1:1 con concentración n es:

$$\frac{d^2Y}{dX^2} = \sinh Y, \quad (1)$$

donde X (κx) es la distancia escalada medida en el plano medio entre las superficies y

$$\kappa^2 = \frac{8\pi n e^2}{\epsilon kT} \quad (2)$$

Si se integra la ecuación 1 se obtiene:

$$\frac{dY}{dX} = Q \operatorname{Sgn}(Y_m), \quad (3)$$

donde se define a la variable Q por

$$Q = (2(\cosh Y - \cosh Y_m))^{1/2}, \quad (4)$$

donde Y_m es el potencial escalado en el plano medio entre las superficies. La ecuación 3 satisface la condición de frontera en $X = 0$, donde Y debe ser un mínimo. Podemos notar que

$$\begin{aligned} \frac{dQ}{dY} &= \frac{\sinh Y}{Q} \\ &= \frac{\operatorname{Sgn}(Y_m)}{Q} \left[\left(\frac{Q^2}{2} + \cosh Y_m \right)^2 - 1 \right]^{1/2}. \end{aligned} \quad (5)$$

De las ecuaciones 3 y 5 se puede derivar la ecuación diferencial

$$\frac{dX}{dQ} = \left[\left(\frac{Q^2}{2} + \cosh Y_m \right)^2 - 1 \right]^{1/2}. \quad (6)$$

¹ Chan, D. Y. C., Pashley, R. M., White, L. R. *J. Colloid Interface Sci.* **1980**, *77*, 283-285.

El plano medio, en función de estas variables, es el punto en donde $Q=0$ y $X=0$. Si se conoce el valor de Q ($=Q_s$) que corresponde a la carga superficial, entonces para un valor del potencial reducido en el plano medio Y_m , se puede resolver la ecuación 6 desde $Q=0$ hasta $Q=Q_s$ a través de una técnica numérica (e.g., un método de Runge-Kutta de cuarto orden). De esta forma, también se determina $X_s = \kappa L/2$, que es la distancia normalizada desde el plano medio hasta la superficie cargada, y que corresponde a un valor dado de Y_m . Si se repite este proceso para un grupo de valores de Y_m escogidos adecuadamente, se obtienen el grupo correspondiente de valores de $\kappa L/2$.

La presión electrostática para cada valor de L , que es la distancia de separación entre las superficies, es simplemente calculada a partir del correspondiente valor de Y_m por

$$P(L) = 2nkT(\cosh Y_m - 1) \quad (7)$$

El valor de Q , viz., Q_s se determina dependiendo de las condiciones de frontera que se utilicen:

- a) Potencial de superficie constante.

En este caso, Q_s , se calcula directamente de la ecuación 4 con $Y= Y_s$,

$$Q_s = [2(\cosh Y_s - \cosh Y_m)]^{1/2} \quad (8)$$

- b) Carga superficial constante, σ .

Si en la superficie se tiene la condición de frontera de que

$$\frac{dY}{dX} = \frac{4\pi e}{ekT} \sigma \quad (9)$$

A partir de la ecuación 3, podemos ver que

$$Q_s = \frac{4\pi e}{ekT} |\sigma| \quad (10)$$