

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO



REOLOGÍA INTERFACIAL DE MEMBRANAS LIPÍDICAS E INTERACCIONES ENTRE LÍPIDOS Y NANOPARTÍCULAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

DOCTOR EN CIENCIAS EN EL ÁREA DE FÍSICA

PRESENTA

M. C. ALBERTO SÁNCHEZ LUVIANO

ASESOR: DR. GABRIEL ESPINOSA PÉREZ

COASESOR: DR. JOSÉ CAMPOS TERÁN

MORELIA, MICHOACÁN

ENERO

DE 2020

DEDICATORIA

A mi madre que siempre me ha apoyado en TODO.

A mi feita que me ha dado todo el apoyo del mundo en las buenas y
malas.

A toda mi familia.

Agradecimientos

Agradezco al Instituto de Física y Matemáticas, UMSNH; al Departamento de Procesos y Tecnología, UAM-C; a la Facultad de Química, UNAM; a CONACyT por el apoyo que me han brindado y a todas las personas con las que compartimos conocimientos. Ha sido una gran lección de vida.

Agradezco a mi asesor Dr. Gabriel Espinosa Pérez por orientarme durante este camino y por el conocimiento que me brindó. A los integrantes de mi comité doctoral: al Dr. Gonzalo Viramontes, por los consejos y los regaños que creo, surgieron efecto; al Dr. Pablo Martínez por siempre estar disponible cuando se necesitaba; al Dr. José Antonio González por su apoyo y aquellas cascaritas que jugamos hace ya unos años; y en especial al Dr. José Campos por brindarme la oportunidad de continuar este camino cuando mis opciones parecían esfumarse.

Agradezco a mis compañeros durante el doctorado, Maricela Rodríguez y Luis Montes de Oca, su colaboración hizo estos momentos más amenos. A todos los compañeros que conocí en mis estancias, Diego, Diana, Karem gracias por su aporte en todos los sentidos.

Agradezco a la Dra. Izlia Jazheel Arroyo Maya, Dra. Maribel Hernández Guerrero por su apoyo dentro del laboratorio de superficies en la UAM-Cuajimalpa. En especial a la Dra. María de los Dolores Reyes Duarte la cual me ofreció la oportunidad de colaborar en el proyecto terminal de María del Carmen Romero Saavedra de forma directa. Agradezco al Dr. Rolando Castillo por abrirnos las puertas de su laboratorio para terminar

mis experimentos de microscopia. Agradezco a Salvador Ramos por todo el apoyo en las mediciones de microscopia de ángulo de Brewster, sus años de experiencia fueron de gran ayuda. Agradezco al Dr. Jaime Ruíz, en su laboratorio fue donde hice mis primeros experimentos de monocapas.

Índice general

| | |
|--|-------------|
| Resumen | IX |
| Abstract | XI |
| Colaboraciones | XIII |
| Introducción | XV |
| 1. Membranas biológicas | 1 |
| 1.1. Membrana celular | 1 |
| 1.2. La bicapa lipídica | 2 |
| 1.2.1. Composición lipídica | 2 |
| 1.2.2. Fosfoglicéridos | 3 |
| 1.2.3. Esfingolípidos | 5 |
| 1.2.4. Colesterol | 6 |
| 1.3. Proteínas de membrana | 6 |
| 1.4. Microdominios en la membrana | 8 |
| 1.5. Modelos de membranas | 10 |
| 1.5.1. Micelas | 11 |
| 1.5.2. Fases lamelares | 12 |
| 1.5.3. Liposomas | 14 |
| 1.5.4. Fases cúbicas | 16 |
| 1.5.5. Fases hexagonales | 17 |
| 1.5.6. Monocapas de Langmuir | 17 |
| 1.6. Importancia de los lípidos en las membranas | 19 |
| 1.6.1. Lípidos en las células pulmonares | 19 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1.6.2. | Lípidos en el líquido lagrimal | 20 |
| 2. | Conceptos fundamentales | 21 |
| 2.1. | Tensión superficial y energía libre superficial | 21 |
| 2.1.1. | Presión superficial | 25 |
| 2.2. | Isotermas bidimensionales | 26 |
| 2.2.1. | Compresibilidad | 28 |
| 2.2.2. | Diagramas de fase | 30 |
| 2.2.3. | Teoría de medio efectivo | 35 |
| 2.3. | Termodinámica bidimensional | 36 |
| 2.3.1. | Mezcla en monocapas | 37 |
| 2.4. | Interacciones moleculares | 45 |
| 2.4.1. | Dependencia de la cola hidrofóbica | 45 |
| 2.4.2. | Dependencia de la insaturación en la cola hidrofóbica | 46 |
| 2.4.3. | Dependencia del grupo polar | 47 |
| 2.5. | Monocapas como modelos biológicos | 47 |
| 2.5.1. | Bicapas | 48 |
| 2.5.2. | Monocapas | 50 |
| 2.5.3. | Correspondencia bicapa-monocapa | 51 |
| 3. | Reología interfacial | 53 |
| 3.1. | Esfuerzo y deformación | 55 |
| 3.1.1. | Tensor de deformación | 57 |
| 3.1.2. | Tensor de esfuerzo | 60 |
| 3.2. | Deformación en sólidos elásticos | 63 |
| 3.3. | Tasa de deformación y fluidos viscosos | 65 |
| 3.4. | Fluidos complejos y viscoelasticidad | 66 |
| 3.4.1. | Viscoelasticidad | 66 |
| 3.4.2. | Respuestas reológicas | 71 |
| 3.5. | Modelos viscoelásticos | 75 |
| 3.5.1. | Modelo de Kelvin-Voigt | 77 |
| 3.5.2. | Modelo de Maxwell | 78 |
| 4. | Materiales y métodos experimentales | 83 |
| 4.1. | Materiales | 83 |
| 4.2. | Métodos experimentales | 85 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 4.2.1. | Deposición y formación de las monocapas | 85 |
| 4.2.2. | Determinación de la presión superficial | 86 |
| 4.2.3. | Isotermas y compresibilidad | 89 |
| 4.2.4. | Microscopia de ángulo de Brewster | 93 |
| 4.2.5. | Reología de compresión oscilatoria | 95 |
| 4.2.6. | Reología de cizallamiento oscilatoria | 99 |
| 5. | Resultados | 105 |
| 5.1. | Efecto de la cola hidrofóbica | 105 |
| 5.2. | Efecto de la cabeza hidrofílica | 108 |
| 5.3. | Mezcla de lípidos | 110 |
| 5.3.1. | DSPC-POPE | 111 |
| 5.3.2. | DPPC-POPE | 112 |
| 5.3.3. | DPPC y nanopartículas | 132 |
| 6. | Conclusiones | 137 |
| 7. | Perspectivas de este trabajo a futuro | 141 |
| A. | Números adimensionales | 143 |
| A.1. | Número de Deborah | 143 |
| A.2. | Número de Péclet | 144 |
| A.3. | Número de Weissenberg | 146 |
| A.4. | Número de Boussinesq | 147 |
| B. | Métodos numéricos | 151 |
| B.1. | Derivación: Módulos de compresibilidad | 151 |
| B.2. | Integración: Energías de mezclado | 152 |
| C. | Cálculo de áreas condensadas | 157 |
| C.1. | Cálculo de Errores | 157 |
| D. | Imágenes de BAM | 163 |

| | |
|--------------------------|------------|
| Bibliografía | 173 |
| Índice de figuras | 187 |
| Índice de cuadros | 191 |

Resumen

Las propiedades termodinámicas y mecánicas de las monocapas formadas por lípidos juegan un papel importante en procesos tales como la respiración y el parpádeo. Estudiamos esas propiedades usando monocapas de Langmuir. Realizamos experimentos de compresión isotérmica y deformaciones oscilatorias de cizallamiento en mezclas de lípidos. También observamos diferentes fases con microscopia de ángulo de Brewster y en algunas de ellas apareció un cambio de forma en los dominios. Encontramos que las propiedades mecánicas son afectadas por la miscibilidad de los lípidos en las mezclas. En la región de dos fases, el módulo elástico de compresión incrementa con la cantidad de fase líquido-condensado (LC), pero en general está no sigue las predicciones del modelo de medio efectivo. Las discrepancias surgen del hecho de que al comprimir, los dominios crecen a una velocidad mayor que la velocidad de compresión, pero esta no es suficiente para alcanzar el equilibrio termodinámico. Antes de alcanzar la fase LC, fue observada la percolación de los dominios en la cual los módulos de compresión y cizallamiento son iguales a los de la fase LC pura. En el rango de frecuencias investigado, la mayoría de las monocapas se comportan como fluidos viscoelásticos.

Palabras clave. Materia blanda, Tensoactivos, Tensión Superficial, Biofísica, Termodinámica.

Abstract

The thermodynamical and mechanical properties of lipid monolayers and their mixtures with nanoparticles play an important role in processes such as breathing and eye blinking. We studied those properties using Langmuir monolayers. We performed isothermal compressions and sinusoidal shear deformations of these mixed monolayers. Also, the different phases were observed with Brewster angle microscopy and a shape change was observed in some mixtures. We found that the mechanical properties are affected by the miscibility of lipids mixture. In the two-phase region, the compression elastic modulus increases with the amount of the liquid-condensed (LC) phase but in general does not follow the predictions of a simple effective medium model. The discrepancies arise from the fact that, upon compression, the domains grow at a rate faster than the compression rate but not fast enough to reach thermodynamic equilibrium. Before reaching the LC phase, domain percolation was observed and compression and shear moduli become equal to those of the pure LC phase. Most of the monolayers behave as viscoelastic fluids at the investigated frequencies.

Colaboraciones

La mayor parte experimental de esta tesis no podría haberse llevado a cabo sin la ayuda de valiosas colaboraciones en diferentes instituciones, a sus profesores y estudiantes encargados.

1. **Universidad Autónoma de San Luis Potosí.** Mi agradecimiento al profesor Jaime Ruiz Garcia ya que en su laboratorio realicé mis primeros experimentos de esta tesis.
2. **Universidad Autónoma Metropolitana Campus Cuajimalpa.** Mi agradecimiento al profesor José Campos Terán por su apoyo incondicional en la prestación de las instalaciones, también por el apoyo continuo durante y después de la realización de esta tesis. A Diego Gómez por la síntesis de nanopartículas de oro usadas en esta tesis.
3. **Universidad Nacional Autónoma de México.** Mi agradecimiento al profesor Rolando Crisóstomo Castillo Caballero, por su experiencia en el estudio de monocapas en la intercara aire-agua y a Salvador Ramos por su apoyo en las mediciones experimentales y el uso del microscopio de ángulo de Brewster.
4. **Université Paris Sud IX.** Mi agradecimiento a la profesora Dominique Langevin por sus ideas en la interpretación de los datos obtenidos.

Introducción

Las membranas son una de las principales características del mundo biológico, todos los microorganismos dependen de una u otra forma de las membranas. Ellas envuelven las células y separan los contenidos celulares del ambiente externo, incluso forman compartimientos especiales dentro del citoplasma que separa los diferentes procesos celulares. Sin las membranas, la vida como la conocemos probablemente no existiría.

Hoy en día se conoce mucha información sobre las membranas, pero no siempre fue así. La historia de como empezó el estudio de las membranas, no fue por medio de la biología, sino con la físico-química y el estudio de lípidos (es decir, aceites) y su interacción con el agua.

Desde la antigüedad, la inmiscibilidad entre el agua y el aceite han sido de gran interés para la humanidad. Uno de los primeros científicos que escribió sobre estos efectos fue Pliny (the Elder 29-73 d.C.) en su enciclopedia “Natural History” donde hizo una importante observación que sería usada durante varios siglos, “...*sea water is made smooth by oil, and so divers sprinkle oil on their face because it calms the rough element...*” [1].

Fue hasta 1774 cuando se documentaron los primeros experimentos llevados a cabo por Benjamín Franklin (1706-1790), que por asuntos de Estado se encontraba en Londres. Las observaciones de sus experimentos fueron enviadas a la Royal Society, “...*But recollecting what I had formerly read in Pliny, I resolved to make some experiment of the effect of oil on water, when I should have the opportunity...At length being at Clapham where there is, on the common, a large pond, which I observed to be one day very*

rough with the wind, I fetched out a cruet of oil, and dropt a little of it on the water. I saw it spread itself with surprizing swiftness upon the surface; but the effect of smoothing the wave was not produced; for I had applied it first on the leeward side of the pond, where the waves were largest, and the wind drove my oil back upon the shore. I then went to the windward side, where they began to form; and there the oil, though not more than a tea spoonful, produced an instant calm over a space several yard square, which spread amazingly, and extended itself gradually till it reached the lee side, making all the quarter of the pong, perhaps an acre as smooth as a looking glass. After this, I contrived to take with me, whenever I went into the country, a little oil in the upper hollow joint on my bamboo cane, with which I might repeat the experiment as opportunity should offer; and I found it constantly to succeed. In these experiments, one circumstance struck me with particular surprize. This was the sudden, wide, and forcible spreading of a drop oil on the face of the water, which I do not know that any body has hitherto considered. If a drop of oil is put on a polished marble table, or on a looking glass that lies horizontally; the drop remains in its place, spreading very little. But when put on water it spreads instantly many feet round, becoming so thin as to produce the prismatic colours, for a considerable space, and beyond them so much thinner as to be invisible, except in its effect of smoothing the waves at a much greater distance...” [3] De estas



Figura 1: Estanque de Clapham, Londres, antes (izquierda) y después (derecha) de dispersar aceite en la superficie (Fotografías tomadas por el profesor Charles Giles [2] casi doscientos años después de los experimentos de Benjamin Franklin).

observaciones (Figura 1), Benjamin Franklin pudo hacer algunos cálculos cuantitativos. Si una cucharada de aceite de aproximadamente $2ml$ se difunde en 0.2 hectáreas (0.5 acres) de agua, la película resultante debe tener un espesor de menos de $2nm$. Sin embargo, aún cuando el experimento fue de gran importancia para el estudio de superficies en la actualidad, la comunidad científica de su época no se dio cuenta de su relevancia.

Casi cien años después, en 1890, Lord Rayleigh (John William Strutt) (1842-1912) continuó con los experimentos de Benjamin Franklin, de donde estableció que las películas de aceite formadas sobre el agua deberían tener una molécula de espesor, cerca de 1 o 2 nanómetros [4]. A pesar de que los resultados fueron publicados por la Royal Society, pocos científicos tuvieron interés. Casi al mismo tiempo una mujer alemana llamada Agnes Pockels (1862-1935) desarrolló una palangana rudimentaria en el lavabo de su cocina, el cual usó para determinar la contaminación superficial como función del área de la superficie para diferentes aceites [5], también logró medir los primeros diagramas de presión-área en monocapas de ácidos grasos [6], lo cual fue fundamental para establecer las bases de la ciencia de superficies, que describe las propiedades de superficies sólidas y líquidas. Así comenzó el estudio sobre monocapas de ácidos grasos, alcoholes, éteres, etc.

El uso del concepto *membrana biológica* se atribuye al botánico alemán Wilhelm Friedrich Philipp Pfeffer (1845-1920) que en el año de 1877, realizaba algunos estudios sobre las propiedades osmóticas en las células vegetales, donde identifica semejanzas entre éstas y las membranas obtenidas al precipitar ferrocianuro cúprico sobre las paredes porosas de la cerámica. Los estudios permitieron que Pfeffer desarrollara la hipótesis en la cual admitía la existencia alrededor de la célula de una capa de protoplasma con un espesor fino e invisible, que podría tener propiedades osmóticas [7].

De los estudios de propiedades osmóticas de las células y su relación con el estudio del comportamiento de los lípidos en superficies, Charles Ernest Overton (1865-1933), botánico especializado en fisiología celular y farmacología, realizaba su trabajo doctoral en la Universidad de Zurich, descubrió accidentalmente algunas propiedades importantes de las membranas. Su

trabajo estaba relacionado con los procesos hereditarios en plantas y para poder completar sus estudios necesitaba encontrar sustancias que se pudieran absorber fácilmente en las células de las plantas. Encontró que para que una sustancia pudiera pasar a través de la membrana debía tener cierta naturaleza química. Overton descubrió que las sustancias no polares podían pasar rápidamente a través de la membrana hacia la célula. Este descubrimiento era muy diferente a la idea de que la membrana era impermeable a casi todo excepto al agua [8]. Basado en como algunas moléculas pasaban a través de la membrana, Overton publicó una hipótesis preliminar en la cual proponía que:

- Hay ciertas similitudes entre las membranas celulares y los lípidos como el aceite de oliva.
- Ciertas moléculas (lípidos) pasan a través de las membranas al “*dissolve*” en el interior lipídico de la membrana.

Aún cuando hoy en día estas características son bien conocidas, en ese tiempo había muchas ideas opuestas a las de Overton.

A finales de la década de 1910 y principios de 1920, Irving Langmuir (1881-1957), empleado de los laboratorios de General Electric cuyo trabajo sobre la adsorción superficial de gases en metales (motivado por entender las propiedades de los alambres de tungsteno en bulbos llenos de gases) lo condujo a interesarse en la química de películas de aceite. Fue capaz de medir de forma precisa el efecto de varios compuestos sobre la tensión superficial del agua al inventar una palangana similar al diseño que décadas antes había hecho Agnes Pockels, pero con la adición de un dispositivo para medir la presión superficial [9]. Sus estudios alcanzaron alto reconocimiento cuando recibió el premio Nobel de Química en 1932. Langmuir propuso que las moléculas de ácidos grasos forman una monocapa orientada por sí misma hacia arriba con las cadenas hidrocarbonadas lejos del agua y el grupo carboxilo en contacto con la superficie del agua, esto resultó ser una pieza clave para el entendimiento de las bicapas lipídicas así como de las membranas.

Probablemente los primeros en estudiar los lípidos encontrados en membranas celulares fueron Evert Gorter (1881-1954), y su asistente Francois Grendel. En su experimento clásico, Gorter y Grendel extrajeron lípidos de células de la sangre (eritrocitos) humana, de conejo, perro, conejillo de indias, oveja y cabra, con acetona y otros solventes orgánicos. Usando una palangana modificada, similar a la de Langmuir, pudieron demostrar que las moléculas lipídicas podían formar una doble capa, o bicapa, tanto como una monocapa. Más aún, pudieron mostrar que el área superficial de los lípidos extraídos de los eritrocitos eran el doble del área de las propias células aún cuando hay una gran diferencia entre los tamaños de las especies sobre las cuales se tomó la muestra. Basados en estas dos observaciones, Gorter y Grendel concluyeron que las membranas estudiadas estaban compuestas por una capa de lípidos de dos moléculas de espesor [11]. Aunque no se pensó en un *modelo* de membrana celular como tal, Gorter y Grendel sí describieron una posible estructura para la membrana (Figura 2).

Siete años más tarde al modelo de Gorter-Grendel, el biofísico Kenneth Stewart Cole (1900-1984), hoy reconocido como el padre de la biofísica debido a sus estudios de las propiedades eléctricas de las células vivas, concluyó que la membrana celular tenía que estar formada por otros componentes

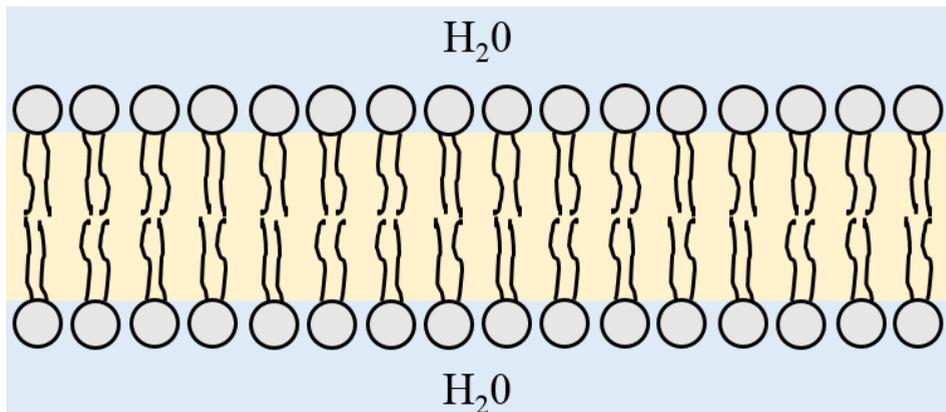


Figura 2: Modelo de membrana celular propuesto por Gorter y Grendel en 1925. Figura adaptada de [10].

además de lípidos.

El primer modelo aceptado por la mayoría de los científicos fue propuesto por Danielli y Davson en 1935 que predominó hasta 1972. James F. Danielli (1911-1984) fue físico-químico, aunque mucho de su trabajo estaba relacionado con la biología. Su trabajo doctoral fue sobre las propiedades superficiales de los lípidos, después trabajó en la Universidad de Princeton (1933-1935) con E. Newton Harvey (1887-1959), un experto en el área de estudios en superficies celulares. Trabajando en el laboratorio encontró que las proteínas podían ser adsorbidas por gotas de aceite obtenidas de huevos de verdol, una clase de pez. Estos hallazgos se convertirían en una característica principal del modelo de membrana propuesto por Danielli y Davson (Figura 3).

En 1935 Danielli regresó al University College en Londres donde Hugh Davson (1909-1996), un fisiólogo, estaba trabajando. La asociación de los dos originó el primer modelo de membrana. El modelo propuesto era básicamente un *sandwich* de lípidos cubierto en ambos lados con proteínas [12].

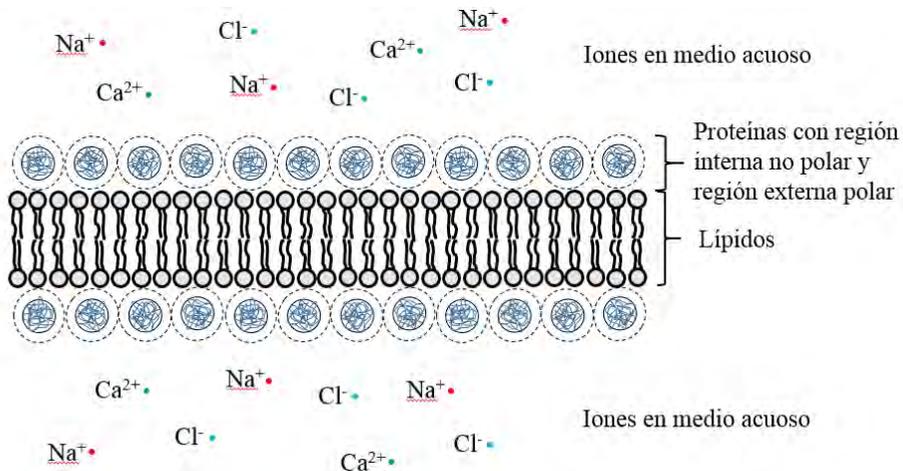


Figura 3: Modelo de membrana celular propuesto por Danielli y Davson en 1935. Figura adaptada de [10].

El modelo de Danielli y Davson fue el modelo básico de la estructura de la membrana aceptado durante muchos años por los biólogos. Sin embargo, explicaba de forma inadecuada muchos de los hallazgos encontrados en investigaciones posteriores. En 1957 J. David Robertson (1923-1995) propuso una modificación al modelo de membrana, basado principalmente en estudio de microscopia electrónica, que él llamo *the unit membrane* [13]. Durante la magnificación debida a la microscopia electrónica, las membranas tenían una apariencia trilaminar que consistía en dos líneas oscuras y una región interior blanca. De acuerdo al modelo de Robertson, las dos líneas oscuras eran las capas de proteínas y la región interna la bicapa

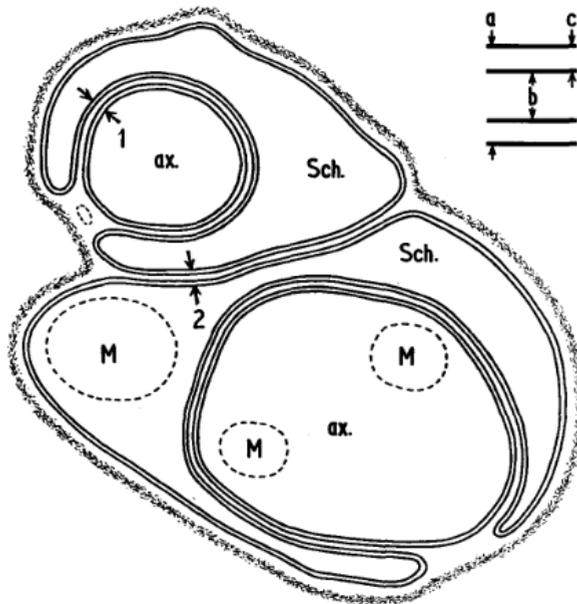


Figura 4: Trazo de dos células Schwann (Sch.) del sistema nervioso periférico que parcialmente envuelven un axón (ax.) cada una, también se muestran 3 mitocondria (M). Las membranas de Sch. y ax. tienen dos pares de líneas cercanamente espaciados y cada par de líneas está separada por una región que tiene siempre la misma distancia de separación (Imagen tomada de [13]).

lipídica (Figura 4). Durante la década de 1960 y principios de 1970, los libros de texto generalmente incluían una micrografía electrónica ilustrando *the unit membrane* como un sandwich de lípidos y proteínas.

El modelo de Robertson fue eventualmente reemplazado a principios de la década de 1970 por el modelo actual de membrana. Este modelo, conocido como el modelo de mosaico fluido, propuesto por los bioquímicos Seymour Jonathan Singer (1924-2017) y Garth L. Nicolson (1943-) [14]. El modelo aún tenía la estructura básica de una bicapa de lípidos propuesta por Gorter-Grendel y modificada por Danielli-Davson y Robertson. Sin embargo, las proteínas eran globulares y flotaban dentro de la bicapa lipídica en lugar de formar capas tipo sandwich. Las colas hidrofóbicas de los fosfolípidos, el mayor componente lipídico de la membrana, apunta en dirección opuesta al agua. Las cabezas hidrofílicas de los fosfolípidos apuntan al exterior donde interactúan con las moléculas de agua en el ambiente exterior e interior de la célula. Las proteínas se encuentran flotando en esta bicapa, algunas de las cuales se expanden sobre toda la bicapa pudiendo formar canales, o poros, para permitir el paso de moléculas o iones a través de la membrana (Figura 5). La membrana en si es fluida (los lípidos se mueven en las capas al igual que las proteínas). La naturaleza de estas proteínas de membrana fue estudiada por Nigel Unwin (1942-) y Richard Henderson (1945-) en 1984 [15], ellos encontraron que la porción de la proteína que se expandía dentro de la bicapa era de naturaleza hidrofóbica, es decir, similar a la parte interior de la bicapa de lípidos y a menudo tenía forma de una hélice alfa.

En el año de 1988 Kai Simons (1938-) y Gerrit van Meer (1953-), proponen el modelo de microdominios lipídicos [16], conocido actualmente como *balsas lipídicas*. Sin embargo, este no es tomado como un modelo en si, sino una adecuación extra al modelo de Singer-Nicolson. Simons y van Meer plantean que los complejos glicosfingolípidos-colesterol se mantienen estrechamente empaquetados y se comportan como unidades de balsas en la monocapa externa de la membrana plasmática. Posteriormente, en la década de los noventa se demuestra que esta situación también ocurre en la monocapa interna, es decir, la que está en contacto con el citoplasma. Sin embargo su estructura y sus propiedades todavía no eran claras para

los investigadores. Actualmente se conocen dos tipos de balsas lipídicas:

1. Balsas planas, son continuas con el plano de la membrana plasmática y no tienen características morfológicas distinguibles.
2. Balsas caveolas, que son invaginaciones de la membrana plasmática que contienen proteínas caveolin (proteínas integrales de membrana) y son fácilmente observables.

Hoy en día a las balsas lipídicas se les adjudica un papel importante en la coordinación de la transducción de señales extracelulares, apoptosis, infecciones provocadas por virus, endocitosis y exocitosis. También se sabe que la desestabilización de las mismas podría afectar la expresión y la actividad de algunas proteínas de membrana.

Los principales indicadores en la evolución del modelo de membrana plasmática iniciaron muchos años antes de su visualización en el microscopio, desde los estudios de la interacción de los lípidos con el agua, esos conocimientos han sido usados para la comprensión de las propiedades de la membrana plasmática, sus características estructurales y finalmente el desarrollo de los aspectos dinámicos de la membrana.

En cuanto a la parte mecánica de las superficies la primera contribución importante la hizo Joseph Plateau [17] en una serie de artículos publicados

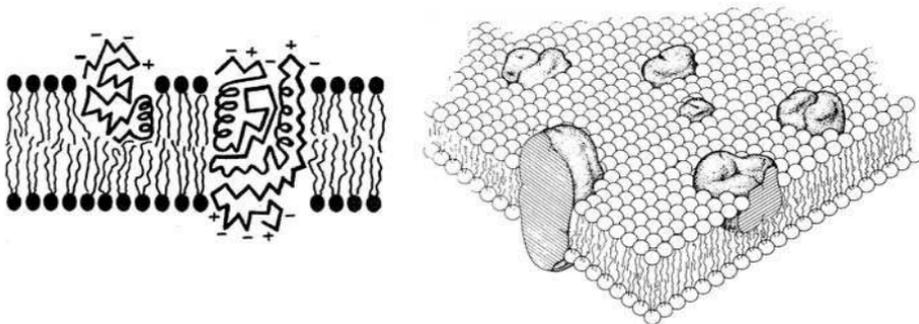


Figura 5: Modelo de membrana celular propuesto por Singer y Nicolson en 1972 (Imagen tomada de [14]).

en 1873. Él fue el primero en probar experimentalmente que fuerzas moleculares actúan en una delgada parte de la superficie de un fluido y en proclamar la existencia de la viscosidad superficial. Lo hizo al comparar el amortiguamiento de una aguja magnética en una superficie con y libre de surfactante [17]. Sin embargo, como Marangoni hizo notar [18], la aguja giratoria barre la intercara creando un gradiente de concentración. Por esta razón Marangoni propuso un dispositivo modificado con un disco de latón sólido con lo cual no fue posible detectar cambios significativos en la viscosidad superficial entre una superficie con y sin surfactante. Para resolver este problema, Lord Rayleigh [19] diseñó un experimento con un anillo, lo cual nos enseñó la importancia de reducir el área de contacto de la geometría con la superficie y así evitar gradientes de concentración. Además de estos problemas, cuando se mide en la superficie, la subfase juega un papel importante sobre la geometría colocada. Boussinesq introdujo los cálculos matemáticos para conocer que tanto se mide la contribución de la superficie con respecto a la intercara [20].

Recientemente algunos de los equipos y métodos más usados para estudiar el comportamiento reológico de las membranas son:

- Reómetro con el método de la doble pared con anillo de Du Noüy o con geometrías biconicas. Con el cual se ha estudiado la capacidad de la membrana a fluir bajo un esfuerzo de cizallamiento [21, 22].
- Reómetro de bobinas magnéticas con nanobotones o rodillos magnéticos adsorbidos en la superficie. Con el cual se han encontrado crecimientos exponenciales de la viscosidad con respecto a la presión superficial, en las regiones donde la monocapa está en un estado de alta compacticidad [23].
- Reología por medio del rastreo de partículas. Con el cual se ha observado un decrecimiento en el coeficiente de difusión cuando la monocapa es comprimida [24].

Aún cuando se tiene mucho conocimiento de las membranas lipídicas desde el punto de vista termodinámico y biológico, para el comportamiento mecánico de estos sistemas bidimensionales no existen suficientes modelos matemáticos que lo caractericen por completo. La presente tesis se enfoca

en estudiar algunos modelos matemáticos para mejorar la caracterización de estos sistemas.

En el primer capítulo se lleva a cabo una revisión desde el punto de vista de la bioquímica sobre los componentes de las membranas biológicas; el favorecimiento a la formación de los dominios lipídicos en base a su carácter anfífilico; el tipo y forma de las estructuras que se pueden formar dependiendo de las condiciones del sistema. El segundo capítulo abarca los conceptos fundamentales de físico-química para las membranas biológicas, partiendo del concepto de tensión superficial hasta las interacciones de las moléculas anfífilicas en agua, pasando por la termodinámica que lo caracteriza. De este capítulo se hace énfasis en la correspondencia entre monocapas y bicapas debido a que las células tienen bicapas, pero los experimentos se hacen con monocapas. El tercer capítulo se encarga de explicar el estudio reológico en general, sus modelos matemáticos más representativos y una explicación breve de sus implicaciones.

Una vez explicada la teoría, el capítulo cuatro muestra los métodos experimentales utilizados en el estudio de los sistemas bidimensionales, desde la preparación de las muestras hasta la matemática de los experimentos reológicos. El capítulo cinco muestra los resultados encontrados para los diferentes sistemas estudiados, en el capítulo seis se concluye sobre dichos resultados.

Objetivo general

Estudiar la físico-química de varios sistemas fosfolípidicos, algunos de ellos con la inclusión de nanopartículas.

Objetivos específicos

1. Aprender y entender los métodos experimentales usados en este tipo de sistemas.
2. Estudiar la termodinámica de los sistemas bidimensionales en analogía con los tridimensionales ampliamente estudiados.

3. Entender las interacciones de las moléculas anfifílicas que se presentan en estos sistemas.
4. Estudiar la mecánica de estos sistemas mediante diferentes métodos.
5. Obtener imágenes de microscopía que ayuden al entendimiento de los resultados.

Capítulo 1

Membranas biológicas

Con el fin de establecer el contexto biofísico apropiado que nos permita identificar las características principales en nuestros modelos físicos, en este capítulo se presentan las bases biológicas de los sistemas de estudio en esta tesis.

1.1. Membrana celular

Las membranas celulares representan un elemento esencial en el desarrollo de los organismos vivos. Constituyen la frontera de la célula, separando su interior del ambiente externo. Las membranas también encierran los orgánulos y componentes que forman la unidad básica de la vida. Sin embargo, la funcionalidad de la membrana no está limitada a un simple papel estructural, también son responsables de la interacción de las células con sus vecinas. Estas interacciones están mediadas por cierto tipo de proteínas transmembranales que coordinan las señales de la célula, habilitando las respuestas de la célula a las condiciones del ambiente. Además la membrana mantiene los gradientes iónicos que permiten la síntesis de ATP, la molécula básica de energía celular. La membrana plasmática es la más importante de la célula, pero otras membranas están presentes en los orgánulos como el núcleo, el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico y la mitocondria. Considerando todas las membranas de la célula, concentran alrededor del 30 % de la actividad proteica total [25].

Todas las membranas biológicas comparten una estructura y composición similar a pesar de ser parte de diferentes orgánulos, e independientemente de su función. El componente principal de las membranas es una molécula conocida como lípido, y están formadas por millones de estas moléculas que, dado su carácter anfifílico, se ensamblan formando bicapas. Las bicapas lipídicas son selectivamente permeables a moléculas polares y contienen una gran cantidad de proteínas transmembranales, que esencialmente definen la funcionalidad de cada membrana. Los lípidos están enlazados entre sí débilmente, por interacciones no-covalentes que permiten un rápido intercambio de posiciones entre ellos, llevando a una gran difusión superficial sobre el plano de la membrana. Típicamente, un lípido intercambia lugar con sus vecinos unas 10^7 veces por segundo, pudiendo explorar así, toda la superficie de la célula en unos pocos segundos. Los lípidos prácticamente se comportan como fluidos en el plano de la membrana, una propiedad con importantes implicaciones para la actividad celular. Las proteínas transmembranales se encuentran insertadas en la bicapa [14], y al ser una bicapa fluida, pueden difundirse lateralmente. La membrana está conectada con el citoesqueleto, una malla tridimensional formada por filamentos de actina que provee ordenamiento estructural y determina la forma de la célula, que además depende del tipo de célula y de sus funciones. En algunas células existe un citoesqueleto exterior, y se conecta con células vecinas para facilitar y coordinar la respuesta del tejido. El frágil equilibrio de la membrana está controlado por varios procesos activos, incluyendo el reacomodo de las diferentes especies de lípidos de la bicapa, remodelamiento del citoesqueleto, o el balance en la densidad de lípidos durante los procesos vesiculares (por ejemplo, durante la endo y exocitosis), que es logrado gracias a los depósitos de lípidos en el interior de la célula.

1.2. La bicapa lipídica

1.2.1. Composición lipídica

Las membranas contienen una amplia diversidad de lípidos, los cuales poseen una propiedad anfifílica; esto es, contienen regiones tanto hidrofóbicas como hidrofílicas. El término anfifilo, que en griego significa *both lover*,

proviene de antiguas observaciones en que las moléculas anfífilas se organizaban en la intercara entre el aceite y el agua, orientando sus cabezas a la región acuosa y su cola a la región oleíca [26].

La mayoría de los lípidos muestran propiedades quirales, es decir, no se pueden superponer con su imagen especular. En general el centro quiral lipídico es el carbono central del glicerol. En monocapas formadas por este tipo de lípidos, la quiralidad conlleva a la formación de dominios con cierta dirección preferencial que pueden ser vistos por medio de microscopia de fluorescencia [10].

1.2.2. Fosfoglicéridos

La mayor parte de los lípidos de la membrana contienen un grupo fosfato, que los convierte en fosfolípidos. Ya que la mayoría de fosfolípidos están contruidos con una columna de glicerol, son conocidos como fosfoglicéridos. A diferencia de los triglicéridos, los cuales tienen tres ácidos grasos y no son anfífilos, los glicéridos de la membrana son diglicéridos (sólo dos de los grupos hidroxilos del glicerol están esterificados por ácidos grasos); el tercero contiene un grupo fosfato [10].

Composición de la cabeza polar

Sin ninguna adición extra después del grupo fosfato, la molécula se denomina *ácido fosfatídico*, que está prácticamente ausente en la mayoría de las membranas. En su lugar, los fosfogliceridos tienen un grupo adicional vinculado al fosfato, los más comunes son la *colina* (formando *fosfatidilcolina*, PC), *etanolamina* (formando *fosfatidiletanolamina*, PE), *serina* (formando *fosfatidilserina*, PS), o *inositol* (formando *fosfatidilinositol*, PI) (Figura 1.1). Cada uno de estos grupos es pequeño e hidrofílico y, junto con el fosfato negativamente cargado al cual esta ligado, forma un dominio altamente soluble en agua en un extremo de la molécula, llamado grupo polar o cabeza del lípido. A pH fisiológico, el grupo polar de la PS y PI tiene un carga total negativa, mientras que el PC y el PE son neutros (*zwitteriónicos*), en la naturaleza no existen cabezas polares positivamente cargadas, aunque si

son sintetizados con propósitos médicos ya que se adhieren al ADN y otras moléculas negativamente cargadas [27].

Composición de la cadena hidrocarbonada

En contraste, las cadenas de ácidos grasos unidas al glicerol son hidrofóbicas. Compuestas por una gran variedad de hidrocarburos en cadenas lineales y en su grado de saturación. Un ácido graso de estas moléculas puede estar completamente saturado (es decir, sin enlaces dobles entre carbonos), monoinsaturada (es decir, posee un enlace doble), o poliinsaturada (es decir, posee más de un enlace doble). Los ácidos grasos más abundantes en las colas de los lípidos de membrana se muestran en la Figura 1.2 y algunos nombres correspondientes se muestran en el Cuadro 1.1. Una cadena con 18:0 denota una cadena con 18 carbonos sin enlaces dobles, mientras que 18:1 denota una cadena de 18 carbonos con un enlace doble. Así, con cadenas de ácidos grasos en un extremo y una cabeza polar del otro, los fosfolípidos presentan un carácter anfifílico.

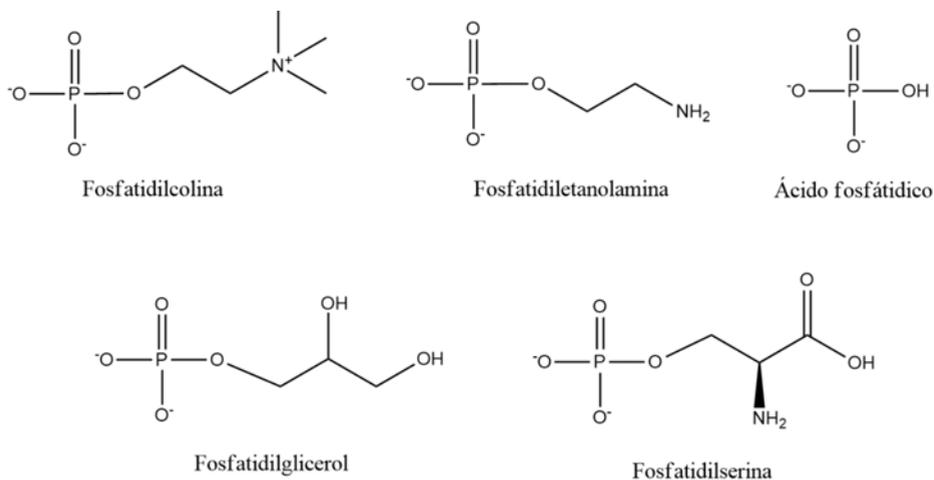


Figura 1.1: Estructura de las cabezas polares de los fosfolípidos más comunes: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilserina (PS), ácido fosfático (PA).

1.2.3. Esfingolípidos

Una clase menos abundante de lípidos de membrana, es conocida como esfingolípidos, son derivados de la esfingosina (Figura 1.3), un amino-alcohol que contienen una larga cadena hidrocarbonada. Los esfingolípidos que consisten de esfingosina unida a un ácido graso en su grupo amino son conocidos como *ceramidas* que tienen un papel importante en la apoptosis celular [28]. Otros lípidos basados en esfingosina tienen grupos adicionales esterificados al alcohol. Si la sustitución es una fosforilcolina, la molécula es *esfingomiélna*, la cual es el único fosfolípido de la membrana que no está construido con una columna de glicerol. Si la sustitución es un carbohidrato, la molécula es un *glicolípidos*. Si el carbohidrato es un azúcar simple, el glicolípidos es una *cerebrosida*, si es un oligosacárido, el glicolípidos es una *gangliosida*. Ya que todos los esfingolípidos tienen dos grandes cadenas hidrocarbonadas en un extremo y una región hidrofílica en el otro, también son anfífilicos y básicamente similares en estructura a los fosfoglicéridos (algunos de ellos se muestran en la Figura 1.3).

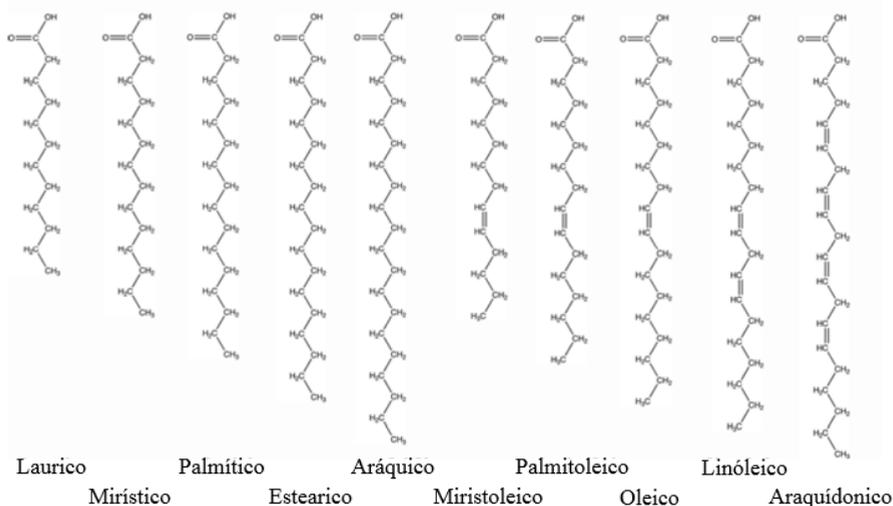


Figura 1.2: Selección de cadenas de ácidos grasos saturadas e insaturadas que forman la parte hidrofóbica de los lípidos (Imagen adaptada de [10]).

| Nombre trivial | Longitud de la cadena: número de dobles enlaces | Posición de insaturación |
|----------------|--|------------------------------|
| Laurico | 12:0 | |
| Mirístico | 14:0 | |
| Miristoleico | 14:1 | |
| Palmítico | 16:0 | |
| Palmitoleico | 16:1 | 9-cis |
| Estearico | 18:0 | |
| Oleico | 18:1 | 9:cis |
| Linoleico | 18:3 | 6-cis, 9-cis, 12-cis |
| Aráquico | 20:0 | |
| Araquidónico | 20:4 | 5-cis, 8-cis, 11-cis, 14-cis |

Cuadro 1.1: Nombres triviales de algunas colas hidrocarbonadas (Cuadro adaptado de [10])

1.2.4. Colesterol

Otro componente importante de ciertas membranas es el colesterol (derivado del esterol), considerado como un lípido no polar. En ciertas células animales pueden constituir hasta el 50 % de lípidos en el plasma de membrana. Sin embargo, en células de plantas y bacterias está ausente. El colesterol es más pequeño que otros lípidos y menos anfifílico, ya que tiene un pequeño grupo hidroxilo (hidrofílico) tal como se observa en la Figura 1.3. A diferencia de los otros lípidos que contiene cadenas lineales hidrocarbonadas, el colesterol contiene anillos esteroides que contiene una pequeña cola hidrocarbonada al final, con esta estructura, el colesterol interfiere con el movimiento de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos [29].

1.3. Proteínas de membrana

Aún cuando las proteínas incrustadas en la membrana celular son mucho menores en número comparadas con los lípidos, constituyen aproximadamente la mitad del peso de la membrana, y son responsables de los principales procesos que ocurren en la membrana y por lo tanto definen su

funcionalidad [25]. Pueden clasificarse en dos tipos, proteínas integrales y proteínas periféricas (Figura 1.4).

- Proteínas integrales. Penetran completamente la membrana y solo pueden extraerse al romper la membrana a su alrededor, una forma de hacerlo es disolverla en detergentes.
- Proteínas periféricas. No penetran completamente la membrana, usualmente forman enlaces iónicos o se unen a la membrana por efectos hidrofóbicos-hidrofílicos, éstas pueden removerse de la membrana con procesos más suaves como la agitación con soluciones salinas.

Dependiendo de la membrana, las proteínas representan del 25 al 74 %

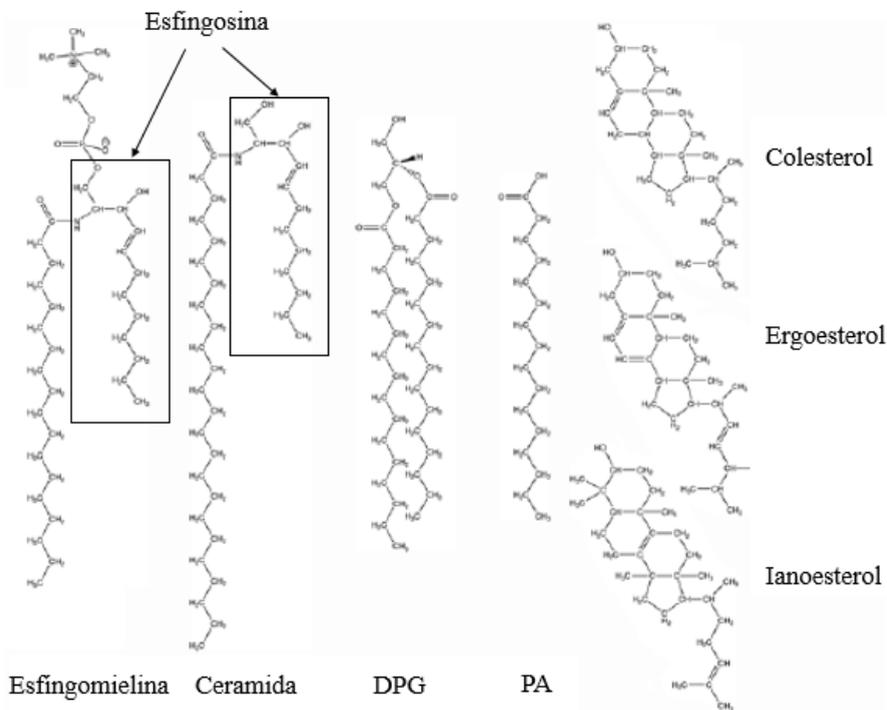


Figura 1.3: Lípidos basados en esfingosina y esterol. Dipalmitoilglicerol (DPG) y ácido palmítico (PA) (Imagen adaptada de [10]).

de la masa total de la membrana. Algunas membranas tales como las de la *E. Coli*, son caracterizadas por su baja actividad protéica, además de tener concentraciones de proteína menores a 20 %. Sin embargo, en la membrana interna de las mitocondrias en células eucariotas, las proteínas representan casi el 80 % del total de la masa, reflejado en la alta concentración de gradientes iónicos y su actividad catalítica [30]. Las proteínas transmembranales también son anfifílicas y orientan sus grupos polares hacia el ambiente acuoso, mientras que los grupos hidrofóbicos interactúan con las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos. La funcionalidad de las proteínas está directamente relacionada con la composición de las membranas, ya que necesitan moverse a través de ellas para llegar a los lugares indicados para ejercer sus funciones.

1.4. Microdominios en la membrana

Usualmente las moléculas lipídicas están mezcladas aleatoriamente en las capas de la membrana celular. Cuando los lípidos presentan colas largas e

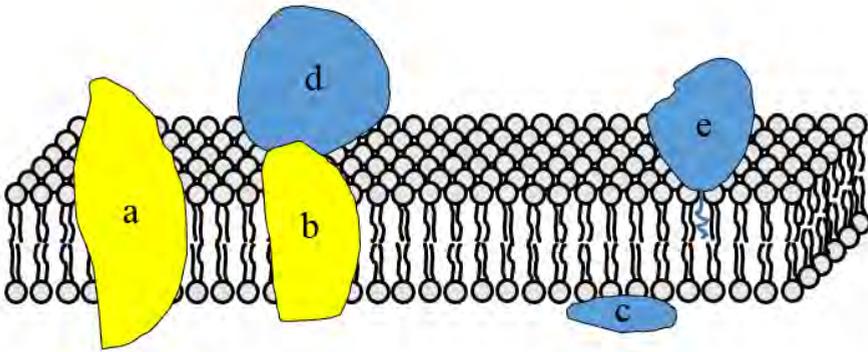


Figura 1.4: Proteínas integrales (a y b) y proteínas periféricas (c, d y e) sobre una bicapa de lípidos.

insaturadas pueden formar agregados en la membrana. Estos agregados o microdominios son relevantes para la organización de las proteínas en la membrana (Figura 1.5) y han sido estudiados en los últimos años [31, 32].

Este modelo que involucra microdominios sugiere que las proteínas y lípidos muestran interacciones con energía libre positiva debida a las variaciones en la longitud de las cadenas hidrofóbicas de las moléculas. El espesor típico de una bicapa es de 5nm. Si la parte hidrofóbica de una proteína de membrana es más larga o más corta que el espesor de la membrana, un grupo hidrofóbico ya sea de la proteína o de los lípidos quedará expuesto al agua, o la membrana lipídica debe deformarse para compensar la interacción hidrofóbica desfavorable; este efecto es conocido como *acoplamiento hidrofóbico*. Este acoplamiento da origen a tensiones interfaciales entre lípidos y proteínas, los cuales pueden llevar a la acumulación de ciertas especies de lípidos alrededor de algunas proteínas, y en atracción entre proteínas debido a fuerzas capilares, formando agregados de proteínas.

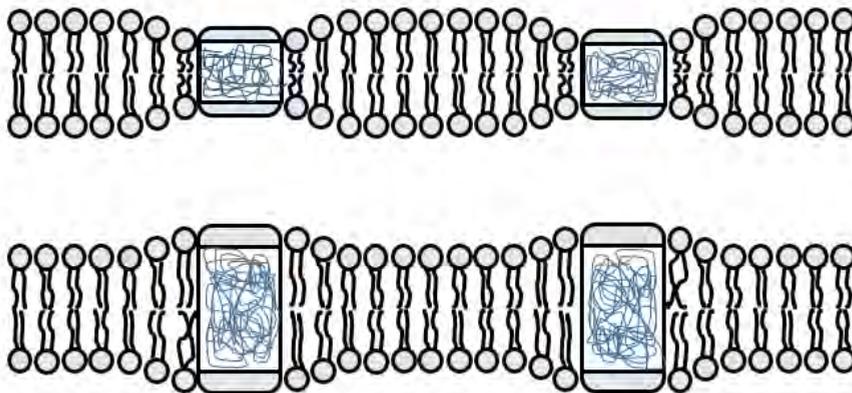


Figura 1.5: Arreglos entre proteínas y lípidos para cubrir los núcleos hidrofóbicos de las proteínas.

1.5. Modelos de membranas

La cadena hidrocarbonada de los lípidos es insoluble en agua, así en medios acuosos, aún a bajas concentraciones se autoensamblan en diferentes agregados los cuales exponen sus cabezas hidrofílicas al medio, y esconden sus colas hidrofóbicas. Si no fuese por este efecto de hidrofobicidad, la entropía favorecería que los lípidos estuvieran bien disueltos en la fa-

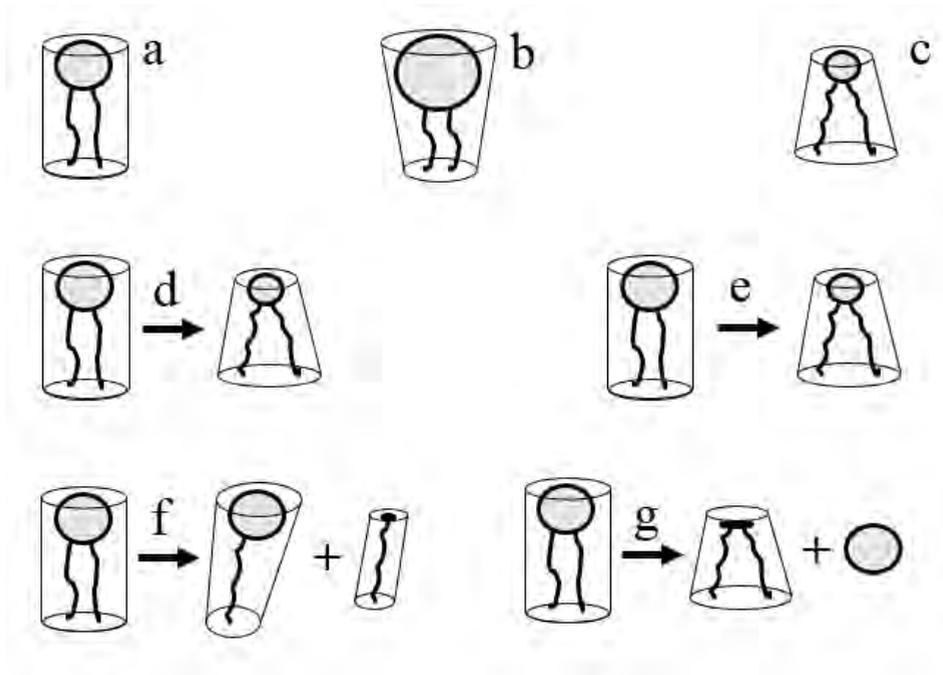


Figura 1.6: Posibles formas de las moléculas lipídicas. a) Forma cilíndrica: tamaño similar en la cabeza y la cola. b) Cono: cabeza ancha y cola delgada. c) Cono invertido: Cabeza pequeña y cola amplia. d) Se vuelve cónica al incrementar la temperatura. e) Se vuelve cónica al cambiar el tamaño efectivo de la cabeza, es decir, cambiando el grado de hidratación o la carga efectiva de un grupo iónico. f) Se vuelve cónica al cortar un ácido graso, es decir, por acción de una fosfolipasa. g) Se vuelve cónica al cortar la cabeza polar, por acción de una fosfolipasa.

se acuosa. Así, exponer la cola hidrocarbonada causa cambios energéticos desfavorables debido a su incapacidad de formar enlaces hidrógeno con las moléculas de agua y estas deben reacomodarse a su alrededor, efecto contrario al que sucede con la cabeza polar, la cual sí forma enlaces hidrógeno con las moléculas de agua sin perturbar considerablemente su estructura [33] (este fenómeno es conocido como efecto hidrofóbico).

Los agregados formados por las mezclas de fosfolípidos dependen principalmente de la geometría del lípido (Figura 1.6), su concentración y su temperatura, y pueden ir desde pequeñas micelas hasta fases lamelares, liposomas, fases hexagonales, y diferentes fases cúbicas. Además de las micelas que constan de una sola capa de moléculas, también están las monocapas de Langmuir que se forman en la intercara de dos fluidos inmiscibles, la formación de estas estructuras es propiciada principalmente por el efecto hidrofóbico.

Las membranas están compuestas de una variedad de lípidos cuyas propiedades intrínsecas inducen cierta curvatura. Más aún, las estructuras geométricas de los lípidos producen curvaturas positivas, negativas o cero dependiendo del tamaño de la cabeza polar y de la longitud de la cola hidrocarbonada del lípido (Figura 1.7). Para membranas celulares, las curvaturas positivas o negativas están determinadas por la direccionalidad de la curva hacia afuera o hacia adentro relativa al compartimiento o volumen contenido por la membrana. Las curvaturas positivas producen esferas mientras que las negativas producen compartimentos tipo cuello.

1.5.1. Micelas

El carácter de afinidad dual de los lípidos es responsable de su comportamiento en presencia de agua. Consideremos un sistema formado de agua y una pequeña cantidad de lípidos a muy bajas concentraciones los lípidos estarán creando interacciones energéticamente desfavorables para el sistema debido a que sus partes hidrofóbicas deben romper enlaces hidrógeno. Sin embargo, arriba de cierta concentración los lípidos se agregan en estructuras conocidas como micelas. Estas estructuras se forman ya que las regiones hidrofílicas se exponen formando enlaces H con las moléculas de

agua y protegen las regiones hidrofóbicas. Las estructuras pueden tomar formas esféricas, tubulares y tipo gusano (Figura 1.8 derecha). Esta concentración es conocida como concentración micelar crítica (CMC) y a partir de esta todos los lípidos agregados se unen al sistema mediante la formación de nuevas micelas, arriba de la CMC la tensión superficial del sistema permanece relativamente constante [35].

La formación de micelas es un proceso cooperativo que es espontáneo y reversible [36, 37]. Las micelas son especies termodinámicamente estables que están en equilibrio con lípidos que no componen otras micelas (libres). Las micelas puede utilizarse como encapsuladoras de compuestos insolubles en agua [38, 39].

1.5.2. Fases lamelares

Al aumentar la concentración de lípidos por encima de la CMC, las micelas crecen en fases bidimensionales extendidas, llamadas bicapas (Figura 1.8

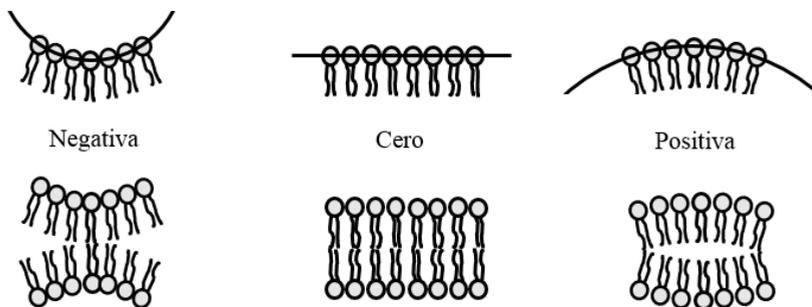


Figura 1.7: Desestabilización de las membranas lipídicas debido a la forma cónica o cónica invertida de los lípidos que promueve una tendencia a curvar las capas de la membrana (Imagen adaptada de [34]).

derecha). Las bicapas pueden existir en diferentes estados dependiendo de la temperatura a la que se encuentre, como se muestra en la Figura 1.9:

- Fase cristalina L_c con orden en 3 dimensiones. Los lípidos forman una capa sobre otra capa donde en la parte intermedia no se permite el acceso de agua por efectos hidrofóbicos ya mencionados.
- Fase gel L_β , los lípidos ordenados en bicapa usualmente presentan una inclinación de su cola hidrocarbonada con respecto a la normal a la intercara. Las fosfatidilcolinas muestran una inclinación de 30° , mientras que las fosfatidiletanolaminas no muestran inclinación principalmente por los tamaños de sus cabezas en comparación con la sección transversal de sus colas [41].
- Fase ondulada $P_{\beta'}$ que muestra periodicidad unidimensional de sus ondas [42]. En esta fase, usualmente (dependiendo del lípido) hay muy poco ordenamiento en las colas hidrocarbonadas de los lípidos.
- Fase fluida L_α , en la cual las cadenas hidrocarbonadas están desordenadas casi en su totalidad, también se le conoce como fase líquido desordenado ya que además de la pérdida del orden en las colas, también se pierde el orden orientacional de largo alcance de la red trian-

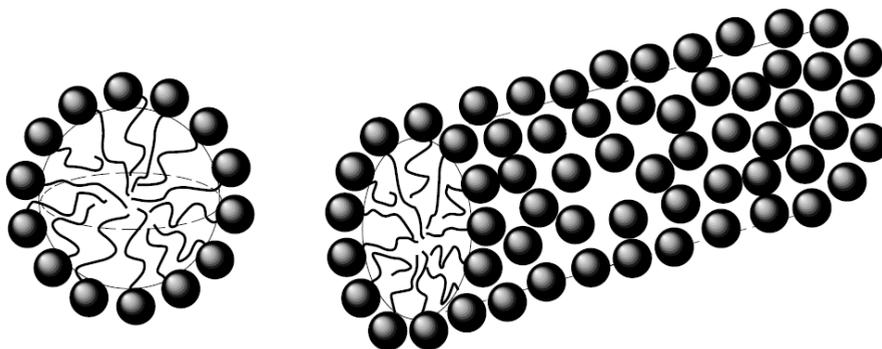


Figura 1.8: Izquierda. Micela esférica típica. Derecha: Micelas tubular, mucho menor en tamaño con respecto a una micela de gusano las cuales pueden formar redes micelares (Imagen adaptada de [40]).

gular observado en fases anteriores. Esta fase ocurre a temperaturas por encima de la temperatura de fusión del lípido.

1.5.3. Liposomas

Los fosfolípidos forman fases lamelares al aumentar la concentración de moléculas se pueden formar estructuras más complejas llamadas liposomas que tienen geometría una esférica hueca formada por una bicapa, y son las más parecidas a las membranas celulares. Aún cuando son las estructuras lamelares más estables, pueden no ser termodinámicamente estables como las micelas [43], debido a que una monocapa toma la curvatura preferida por la geometría de la molécula, cuyo valor depende de la estructura química del lípido y la interacción entre ellos. Basado en consideraciones

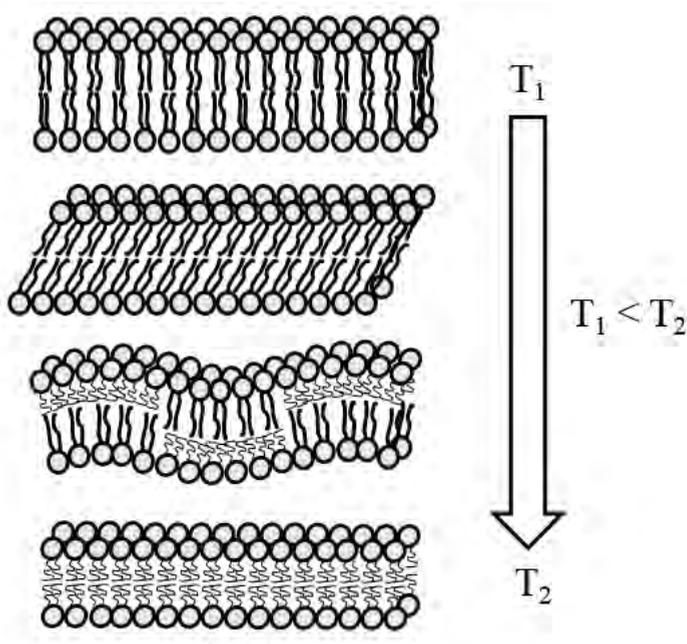


Figura 1.9: Fases de una membrana lipídica formada por dos capas, al incrementar la temperatura muestra un decrecimiento en el orden de las cadenas hidrocarbonadas.

de la energía de doblamiento (bending) de una monocapa de lípidos se puede llegar fácilmente a la conclusión de que sólo bicapas planas (curvatura cero) pueden ser termodinámicamente estables, y además, que las vesículas (bicapas con curvatura diferente de cero) formadas de una sola especie de tensoactivo o fosfolípido no pueden ser termodinámicamente estables [43]. En cambio, si las capas tanto interna como externa de un liposoma son formadas por diferentes especies de moléculas, tales que sus geometrías produzcan una curvatura en la bicapa se favorecerá la estabilidad de los liposomas [44]. En todos estos casos, las cabezas polares están orientadas hacia la parte interior y hacia la parte exterior en donde se encuentra el medio acuoso, protegiendo así su parte hidrofóbica en una región intermedia. La figura 1.10 muestra un liposoma típico.

Las vesículas están comúnmente compuestas por fosfolípidos. Existen diferentes métodos para preparar vesículas [45]. Aún cuando estas estructuras muestran estabilidad en tiempos largos, las vesículas formadas con tensoactivos o fosfolípidos de una sola cadena hidrocarbonada son inesta-

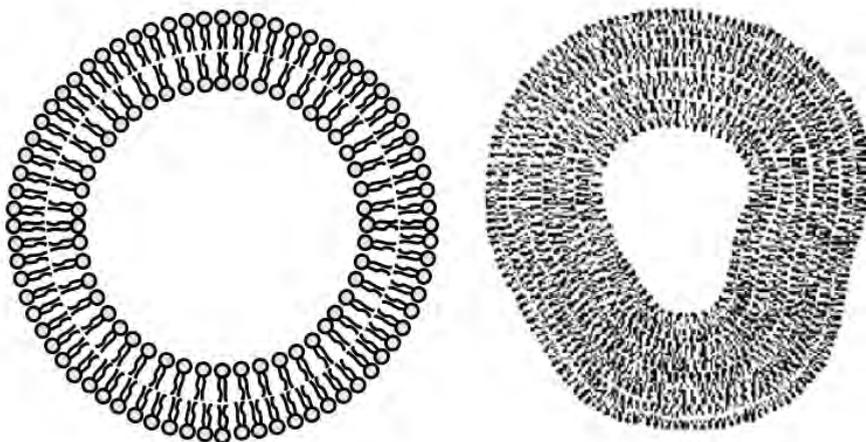


Figura 1.10: Izquierda: Esquema de un liposoma formado por una bicapa de lípidos. Derecha: Liposoma formado por muchas capas de lípidos.

bles y generalmente cambian su estructura en poco tiempo (fases lamelares, en la mayoría de los casos).

1.5.4. Fases cúbicas

Las fases cúbicas son en su mayoría formadas por bicapas bicontinuas con periodicidad tridimensional [46]. Hay, en principio, 36 posibles grupos de fases cúbicas, pero experimentalmente solo se han encontrado seis de ellas mediante pruebas cristalográficas sobre membranas lipídicas. Una de las posibles formas se muestra en la Figura 1.11 (izquierda).

Las estructuras cúbicas son mucho más complejas que las estructuras lamelares. Al decir que son bicontinuas queremos decir que el agua está dividida en dos regiones no conectadas, una en cada lado de la bicapa, la cual está curvada en todos lados. Aún cuando las estructuras cúbicas parecen exóticas, están relacionadas a funciones biológicas. En contexto matemático, estas estructuras se forman siguiendo teorías de superficies mínimas [47].

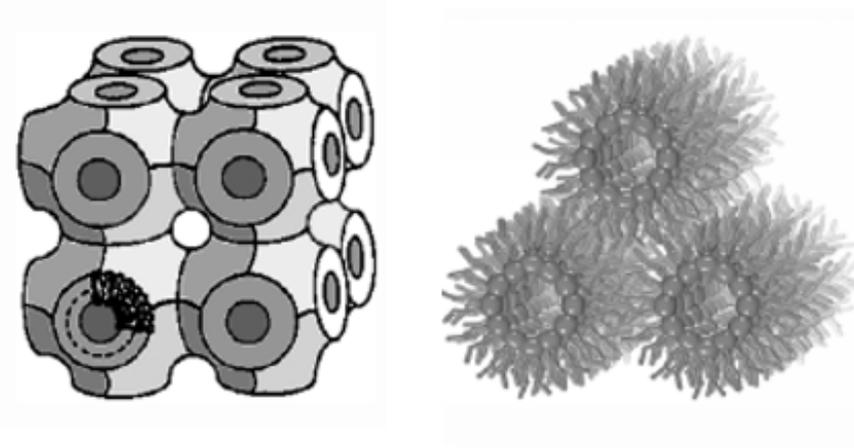


Figura 1.11: Izquierda: Esquema de una fase cúbica. Derecha: Formación de una fase hexagonal inversa (Imagen adaptada de [10]).

1.5.5. Fases hexagonales

Otra fase no lamelar es la fase hexagonal inversa, es una fase lipídica que se forma a temperaturas suficientemente altas con respecto a la temperatura de fusión del lípido [48]. Debido al incremento de la entropía el volumen de la cadena se incrementa y los lípidos forman cilindros con cadenas dirigidas hacia afuera. Ya que las cadenas hidrocarbonadas quieren evitar el contacto con el agua se ordenan en estructuras hexagonales bidimensionales [49]. La figura 1.11 (derecha) muestra una fase hexagonal invertida. Aunque estas fases se han encontrado en membranas de fosfolípidos puros, no se han observado en membranas biológicas. Se cree que tiene un papel importante en la fusión y división celular [50].

Usualmente estas fases se forman con fosfolípidos de grupo polar pequeño, tales como las fosfatidiletanolaminas, y cadenas hidrocarbonadas insaturadas que dan como resultado lípidos con forma cónica invertida que favorece una curvatura negativa de la membrana (Figura 1.6).

1.5.6. Monocapas de Langmuir

Las capas formadas por las moléculas anfifílicas al esparcirse en la intercara aire-agua son conocidas como monocapas de Langmuir (insolubles en

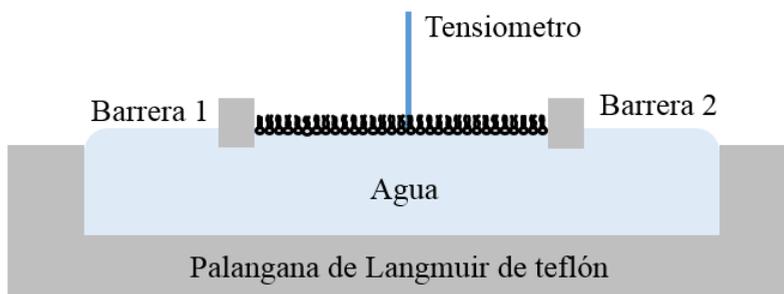


Figura 1.12: Monocapa de Langmuir de moléculas anfifílicas dispersadas en la intercara aire-agua en una palangana de Langmuir.

agua). Estas monocapas son llamadas así en honor a Irving Langmuir unos de los primeros en investigar su comportamiento. En la formación de las monocapas, los lípidos se ordenan tal que su parte hidrofóbica no quede en contacto con el agua, así, las cabezas polares están sumergidas en el agua y las colas hidrocarbonadas apuntan hacia el aire, la inclinación de las colas depende de las condiciones a las que se encuentre la monocapa debido a la interacción entre moléculas y al área disponible por molécula (Figura 1.12).

Una observación notable hecha por Irving Langmuir hace cien años fue que las películas mono-moleculares pueden ser comprimidas para formar versiones bidimensionales en analogía de los estados conocidos de la materia tridimensional: gas, líquido y sólido. Para las dos fases bidimensionales, el área de la monocapa (A) y la presión superficial (Π) juegan los papeles análogos al volumen (V) y la presión hidrostática (P) en tres dimensiones. Estos comportamientos de fases bidimensionales y sus transiciones pueden ser investigados al encontrar las áreas y las presiones superficiales para diferentes temperaturas, tal como se hace en el caso tridimensional.

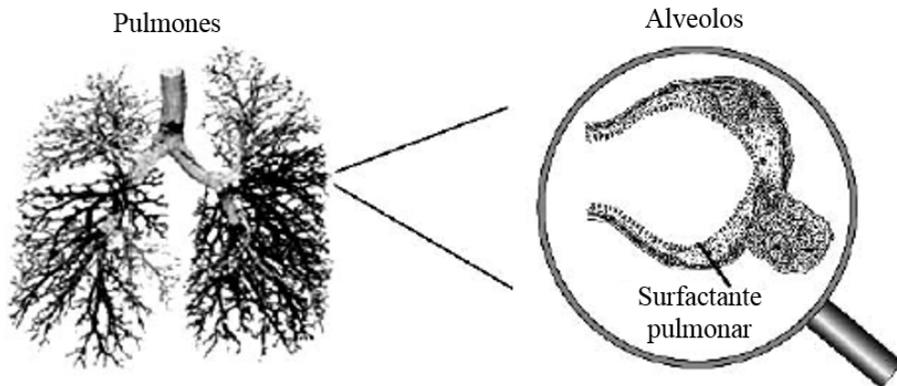


Figura 1.13: Imagen ilustrando la estructura de los pulmones y acercamiento (derecha) a una de sus células mostrando una cavidad llena de aire rodeada de epitelio pulmonar (Imagen tomada de [10]).

1.6. Importancia de los lípidos en las membranas

Los lípidos juegan papeles muy variados, su papel principal es formar la barrera permeable de la célula y de sus organelos, al formar una bicapa lipídica con su región hidrofóbica orientada hacia adentro de la bicapa protegiéndola del agua y su región hidrofílica expuesta al medio acuoso extra e intracelular. Esta bicapa sirve como una matriz y soporte para un vasto arreglo de proteínas involucradas en muchas funciones celulares importantes, tales como trasducción energética, transducción de señales, transporte de solutos, replicación de ADN, direccionamiento proteico, reconocimiento extracelular, y más. Además de que los lípidos juegan un papel activo en estos procesos que influyen las propiedades de las proteínas asociadas a la membrana y sirven como precursores para algunos componentes celulares importantes.

1.6.1. Lípidos en las células pulmonares

Los lípidos en las membranas celulares de los pulmones tienen una función crítica para su funcionamiento. Sus diferentes formas de estructurarse y sus transiciones de fase, juegan un papel importante para evitar el colapso de las células durante la exhalación reduciendo la cantidad de trabajo que se necesita para respirar.

El pulmón es una red ramificada de canales llenos de aire que terminan en un gran número de cavidades pequeñas llamadas alvéolos (Figura 1.13). Durante la inhalación el alvéolo se expande para tomar oxígeno, el cual subsecuentemente es intercambiado por dióxido de carbono al exhalar, cuando se reduce el tamaño del alvéolo nuevamente. La superficie interna del sistema pulmonar es muy grande, casi como el tamaño de una cancha de badminton ($81.74m^2$).

Los recién nacidos por debajo de la semana 34 son susceptibles a presentar déficit del tensoactivo pulmonar, lo que constituye el origen de la enfermedad de membrana hialina. La consecuencia del déficit es el colapso alveolar produciendo distrés respiratorio, hipoxemia e hipercapnia. Para

contrarestar esta falta, se utilizan mezclas de tensoactivo del cual un 70% de su parte lipídica está compuesta de fosfatidilcolina, además de una mezcla de proteínas. Su función principal es disminuir la tensión superficial en la intercara aire-líquido del alvéolo, evitando el colapso pulmonar durante la respiración. El tratamiento respiratorio con esta mezcla tensoactiva ha revolucionado el cuidado respiratorio de estos pacientes desde su introducción en 1980.

1.6.2. Lípidos en el líquido lagrimal

El líquido lagrimal es un fluido único en el cuerpo producido por las glándulas del Meibomio (situadas en los párpados superior e inferior), este tiene múltiples funciones que incluyen la protección de la córnea y las superficies oculares de infecciones, al proveer nutrientes y oxígeno, al acarrear desechos celulares y manteniendo un fluido claro para lubricar y humedecer las superficies oculares. El líquido lagrimal es una capa dinámica, no uniforme, y que cambia su espesor con y entre cada pestañeo [51].

Uno de los problemas más recurrentes en el ojo es el síndrome del ojo seco, que de acuerdo a la *International Worksop on Meibomiam Gland Dysfunction* llevada a cabo en 2011, se cree que la causa más recurrente del síndrome es una disfunción de la glándula del Meibomio. Por lo tanto es importante conocer la contribución de la capa lipídica, así como sus propiedades de flujo ante los esfuerzos provocados por el párpadeo.

Aún cuando se conoce mucho sobre este líquido, su composición aun continua en debate. Mientras que en la parte no-polar se han reportado componentes como el colesterol y mono, di y triglicéridos, la parte polar la cual forma la intercara entre las regiones hidrofóbica e hidrofílica está compuesta principalmente de fosfolípidos, las fosfatidilcolinas y las fosfatidiletanolaminas componen el 60% de este líquido.

Capítulo 2

Conceptos fundamentales

2.1. Tensión superficial y energía libre superficial

De la termodinámica sabemos que cuando un gas está confinado en un volumen definido, este tiende a ocupar todo el espacio disponible [52]. Si en el mismo volumen hay dos especies diferentes de gases separadas sólo por una barrera impermeable, cada uno ocupará sólo la parte en la que estaba confinado. Si la pared es removida y se espera el tiempo suficiente, los dos gases ocuparán la totalidad del volumen. Este efecto no se produce cuando introducimos un gas y un líquido en el mismo volumen. En condiciones isotérmicas y bajo el punto de evaporación del líquido, este permanecerá en el fondo del contenedor y el gas ocupará el volumen restante. El gas no ocupará la totalidad del volumen en este caso debido a la existencia de la frontera o intercara entre el gas y el líquido. Esta superficie es creada espontáneamente y puede ser entendida como un balance entre fuerzas. En el interior del líquido cada molécula está rodeada por otras en cada dirección; por lo tanto está sujeta a una atracción en todas direcciones. En promedio, sobre periodos de tiempo largos comparado con las vibraciones moleculares, la atracción de cualquier molécula es uniforme e isotrópica. En la superficie, sin embargo, las condiciones son completamente diferentes. Las moléculas en la superficie son atraídas hacia adentro, y a sus lados, por sus vecinos; pero no hay atracción hacia afuera que ayuden a equilibrar la fuerza resultante hacia adentro ya que las moléculas de gas en el exterior no producen la misma fuerza de atracción. Por lo tanto cada molécula su-

periférica está sujeta a una fuerte atracción hacia el volumen, perpendicular a la superficie (Figura 2.1). Esta atracción hacia el interior provoca que el área superficial disminuya, ya que las moléculas en la superficie están en constante movimiento hacia adentro más rápido que lo que otras se mueven hacia afuera para tomar sus lugares; por lo tanto, el número de moléculas en la superficie están en constante disminución, y la contracción de la superficie continúa hasta que el máximo número posible de moléculas estén en el interior, es decir, hasta que la superficie sea mínima para un volumen dado.

El hecho de que la superficie del líquido se contraiga espontáneamente muestra que hay una energía libre asociada. Esta energía es interpretada como la energía de Gibbs necesaria para crear una nueva superficie, esto puede ser visto como una forma de trabajo superficial. El origen de este trabajo, en términos moleculares, cuando la superficie se extiende, se deben traer moléculas del interior hacia la superficie en contra de las fuerzas de atracción hacia el interior. Por lo tanto, es necesario un coste energético para vencer las fuerzas de atracción moleculares y llevarlas a la superficie. Aunque nos refiramos a ella como la energía libre por unidad de área, la

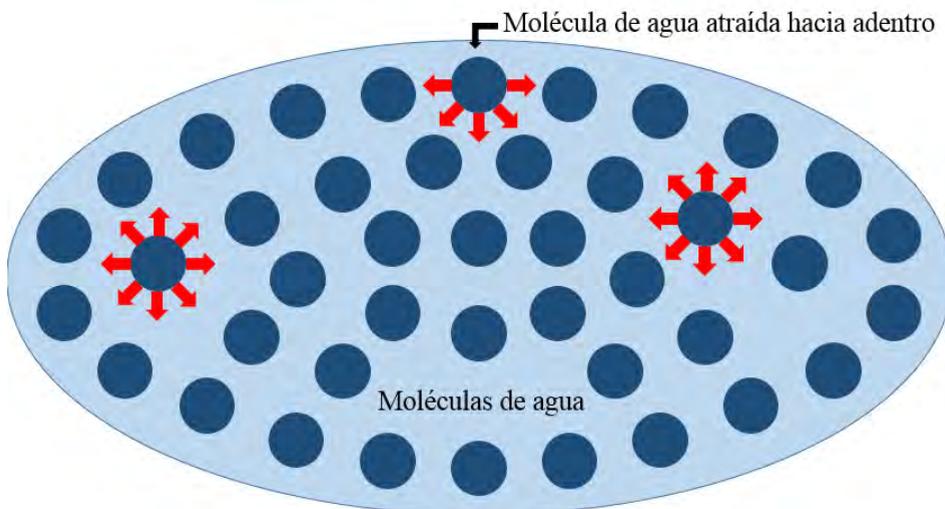


Figura 2.1: Balance de fuerzas en la superficie de un líquido

tensión superficial (γ) también puede considerarse como una fuerza por unidad de longitud. Veamos dos ejemplos que ilustran esta dualidad:

1. **Fuerza por unidad de longitud.** Considere una película de jabón estirada sobre un marco de alambre, donde uno de sus lados se puede mover sin fricción, para contraer o estirar la película (Figura 2.2). Experimentalmente al estirar, se puede medir la fuerza F que actúa sobre la barrera móvil en la dirección opuesta a la flecha mostrada en la Figura 2.2. A la fuerza por unidad de longitud la conoceremos como $\gamma = F/l$. Así, el trabajo hecho por la fuerza F para mover la barrera una distancia dx está dada por:

$$dW = Fdx = \gamma l dx = \gamma dA \quad (2.1)$$

donde $dA = l dx$ es el cambio del área al mover la barrera una distancia dx .

2. **Energía por unidad de área.** Considere una burbuja de jabón. En ausencia de gravedad y otros campos, la burbuja es esférica, debido a que esta es la forma que minimiza el área superficial de un volumen cerrado (Figura 2.3). Una burbuja de jabón de radio r tiene una

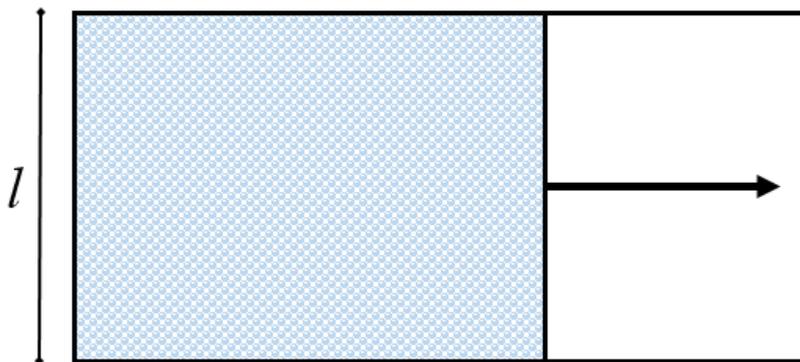


Figura 2.2: Película de jabón estirada sobre un marco de alambre con una barrera móvil.

energía libre superficial total de $4\pi r^2\gamma$ y, si el radio decrece por dr , entonces el cambio en energía libre superficial será $8\pi r\gamma dr$. Ya que al encogerse decrece la energía superficial, la tendencia a hacerlo debe equilibrarse con una diferencia de presión sobre la superficie ΔP tal que el trabajo contra esta diferencia de presión $\Delta P 4\pi r^2$ es justamente igual al decrecimiento en energía superficial, así

$$\Delta P 4\pi r^2 dr = 8\pi r\gamma dr \quad (2.2)$$

o reorganizando

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{r} \quad (2.3)$$

así podemos llegar a la conclusión de que mientras más pequeña es la burbuja, más grande es la presión del aire dentro con respecto al de afuera (presión de Laplace).

Así, las superficies en equilibrio pueden tratarse usando el concepto mecánico de tensión superficial o su equivalente matemático de energía libre superficial.

Las unidades usuales para γ son mN/m. Los valores de γ siempre son positivos, valores negativos indicarían que es más favorable la creación de una nueva superficie. Esto indicaría que nuevas rugosidades aparecerían en la superficie y, con suficiente tiempo, formarían nuevos volúmenes con sus respectivas superficies. Sin embargo, a temperatura ambiente provocado por el movimiento browniano, existe una rugosidad superficial de 0.3 nm (el diámetro de dos moléculas) que no desaparece debido a que se trata de un proceso continuo.

Ejemplos de algunos valores de γ pueden ir desde 20 mN/m para petróleo o 72.8 mN/m para agua pura a temperatura ambiente (20°C), otros valores están dados en el Cuadro 2.1. Estos valores de γ son dependientes de la temperatura y de la pureza del líquido.

2.1.1. Presión superficial

Al introducir agentes externos, en este caso moléculas anfifílicas, a la superficie de los líquidos estos pueden reducir la tensión superficial. Para considerar este fenómeno, una primera aproximación es tratarlos como gases ideales confinados en dos dimensiones.

Para poder estudiar las monocapas de Langmuir primero debemos encontrar una forma de caracterizarlas, al tratarse de un sistema termodinámico, lo más natural es usar variables termodinámicas como temperatura (T), área superficial (A) y presión superficial (Π). Esta última está definida como la diferencia de la tensión superficial del líquido puro (subfase) y la tensión superficial cuando se esparce la monocapa sobre ella [54]:

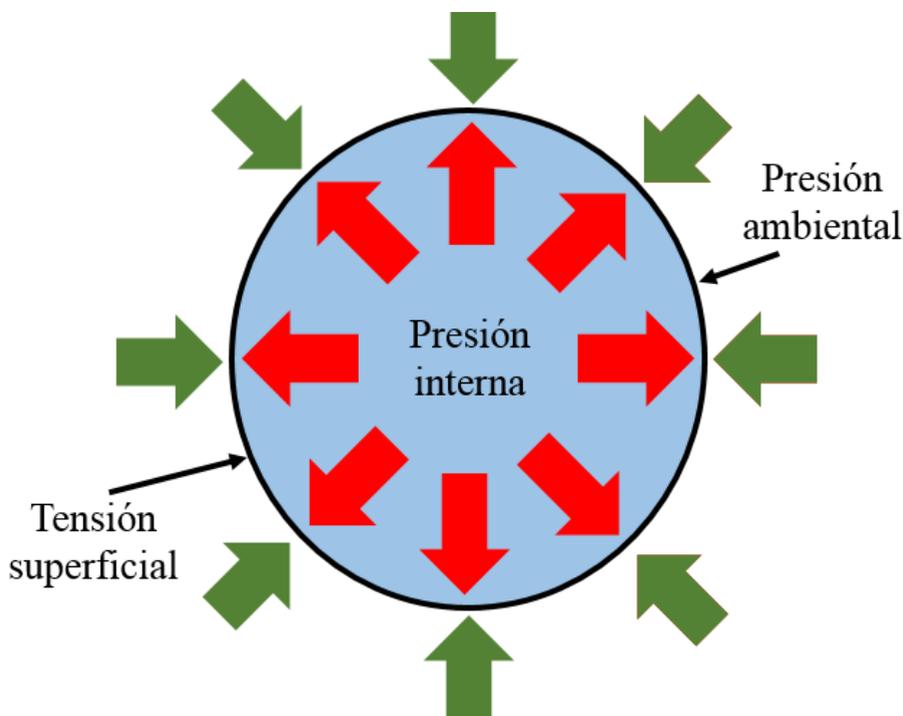


Figura 2.3: Burbuja de jabón sin considerar los efectos gravitacionales.

| Líquido | γ (mN/m) |
|-------------------------|-----------------|
| Acetona | 23.7 |
| Benceno | 28.85 |
| Tetracloruro de carbono | 26.95 |
| Acetato de etilo | 23.9 |
| Alcohol etílico | 22.75 |
| Éter etílico | 17.01 |
| n-Hexano | 18.43 |
| Alcohol metílico | 22.61 |
| Tolueno | 28.5 |
| Agua | 72.8 |

Cuadro 2.1: Tensión superficial de líquidos a 20°C (Cuadro adaptado de [53]).

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma \quad (2.4)$$

donde γ y γ_0 son las tensiones superficiales en presencia y ausencia de las moléculas anfífilas, respectivamente.

2.2. Isotermas bidimensionales

Una primera caracterización de una monocapa en una intercara aire-agua puede lograrse con la medición de la presión superficial (en condiciones de equilibrio) como función del área superficial disponible por molécula sobre la superficie del agua. En la práctica, estas mediciones son usualmente realizadas en condiciones de cuasi-equilibrio, durante compresiones superficiales a velocidad constante y suficientemente baja de dos barreras moviéndose sobre una superficie líquida (usualmente de agua o una solución acuosa). Durante este proceso, la tensión superficial es determinada con una placa o rodillo suspendido que es mojado por la superficie y al medir la fuerza que siente se puede calcular la presión superficial (Véase Capítulo 5). La curva obtenida con estos cambios de presión superficial respecto al área molecular son conocidas como isotermas $\Pi - A$ (el prefijo *iso* debido a que

se hacen a temperatura constante). Una isoterma típica de una monocapa de lípidos se muestra en la Figura 2.4.

Experimentalmente se observa que la curva puede ser dividida en varias regiones; en cada región la presión superficial crece de diferentes formas, y el cambio en la pendiente indica una transición de “fase”. En la isoterma hipotética de la Figura 2.4 se pueden observar diferentes tipos de comportamientos característicos:

1. A grandes valores de área molecular, las moléculas no interactúan mucho entre ellas; la monocapa es considerada en un estado “gaseoso”, a presión superficial cero.
2. Al decrecer el área molecular (e incrementar la presión superficial), la monocapa llegaría a una fase tradicionalmente llamada “líquido expandido”, en esta fase, tanto como en la fase gaseosa las moléculas están traslacionalmente desordenadas y las colas conformacionalmente desordenadas.

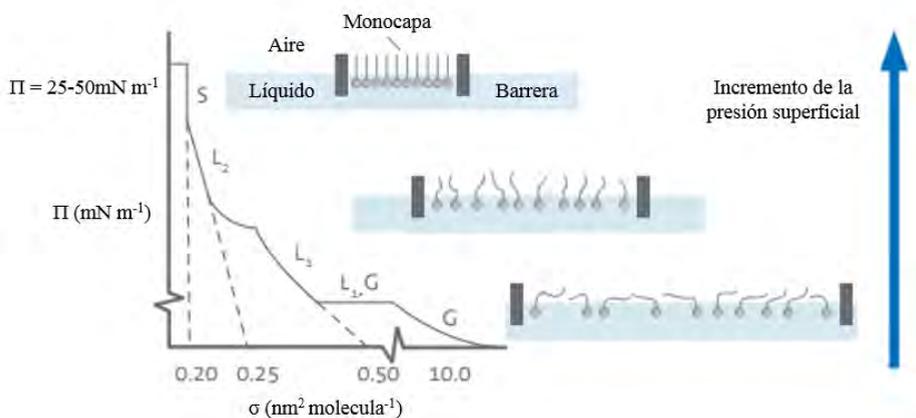


Figura 2.4: Isoterma que muestra algunas fases implicadas en el proceso termodinámico de una monocapa (Imagen adaptada de [55]).

3. Una mayor compresión podría dar lugar a una coexistencia de fases, entre la fase “líquido expandido”, y la fase “líquido condensado”. Esta coexistencia está indicada por una meseta (Π cuasi-constante) en la curva de $\Pi - A$ indicando una transición de primer orden, esta meseta no es perfectamente horizontal en muchos sistemas lo cual fue una fuente de gran controversia sobre la existencia de la transición y principalmente atribuida a impurezas [56], pero fue explicada por medio de observaciones ópticas directas de la coexistencia de fases [57]. Recientemente se ha explicado con la incapacidad que los dominios de “líquido condensado” tienen para incorporar moléculas libres durante la compresión [58].
4. Una vez pasada la región de coexistencia, se podría observar la fase “líquido condensado”, la cual está caracterizada por un ordenamiento traslacional y conformacional de las moléculas.
5. Al seguir comprimiendo se llegará a la región de colapso, donde las moléculas están tan empaquetadas que no pueden seguir comprimiéndose y algunas empiezan a caer en la subfase formando agregados, o formar multicapas.

En la sección 2.2.2 se hará una descripción más detallada de las diferentes fases.

2.2.1. Compresibilidad

En termodinámica y mecánica de fluidos, la compresibilidad (a temperatura constante) es una medida de cambio relativo del volumen de un fluido o sólido como respuesta a una presión aplicada [59] y se denota como:

$$\kappa = -V \frac{\partial P}{\partial V} \quad (2.5)$$

donde V es el volumen y P es la presión. Así, si tratamos nuestra monocapa como un sistema bidimensional, podemos hacer una analogía de la compresibilidad tridimensional con la bidimensional de la siguiente manera:

$$E = -A \frac{\partial \Pi}{\partial A} \quad (2.6)$$

donde A es el área molecular disponible y Π es la presión superficial. Para obtener E se debe derivar numéricamente los datos experimentales de las isotermas $\Pi - A$ y mutiplicarlos por el área molecular experimental. E es un número positivo en todos los casos antes del colapso.

En la Figura 2.5A se puede observar que al incrementar la pendiente de la isoterma $\Pi - A$ durante la compresión, hay un incremento en el módulo de compresibilidad E_0 (Figura 2.5B) llegando a un máximo y luego disminuyendo cuando la monocapa empieza a colapsar. Físicamente este aumento está relacionado con la energía que se necesita suministrar al sistema para comprimirlo (debido al tamaño y forma de las moléculas). Así, mientras menos área disponible hay, la resistencia de las moléculas a ser comprimidas crece, indicando que la monocapa es más resistente a las

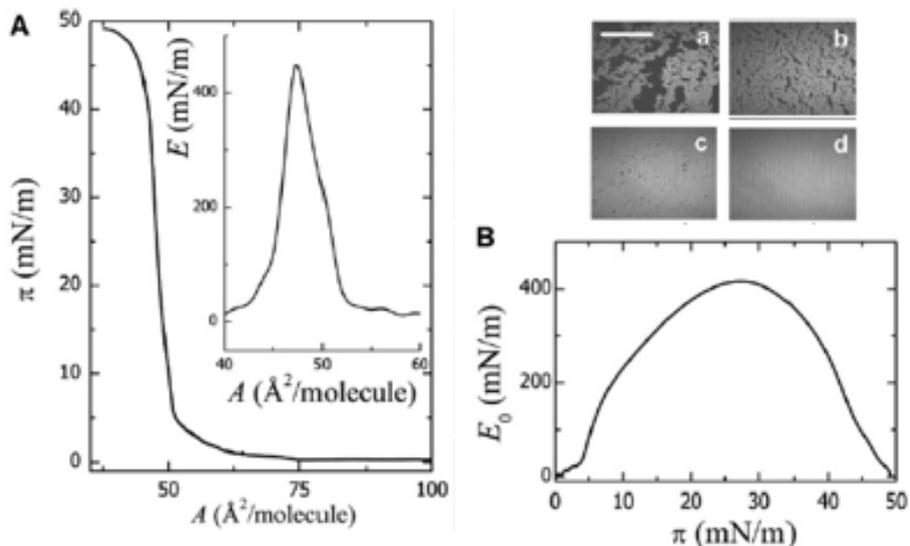


Figura 2.5: A. Isotherma $\Pi - A$ de una monocapa de ceramida. B. Módulo de compresibilidad E en función de la presión, obtenido como la derivada directa de la isoterma $\Pi - A$. (a-d) imágenes de las transiciones de fase de la monocapa de ceramida (Imagen adaptada de [28]).

compresiones y su compresibilidad disminuye, marcado con un aumento en el módulo de compresibilidad.

2.2.2. Diagramas de fase

Los estudios sobre isothermas revelan singularidades en las monocapas, debajo de la temperatura crítica, se espera encontrar un estado gaseoso, líquido y sólido separado por una transición de fase de primer orden (región LE-LC en la Figura 2.6). En una transición de primer orden, la entropía

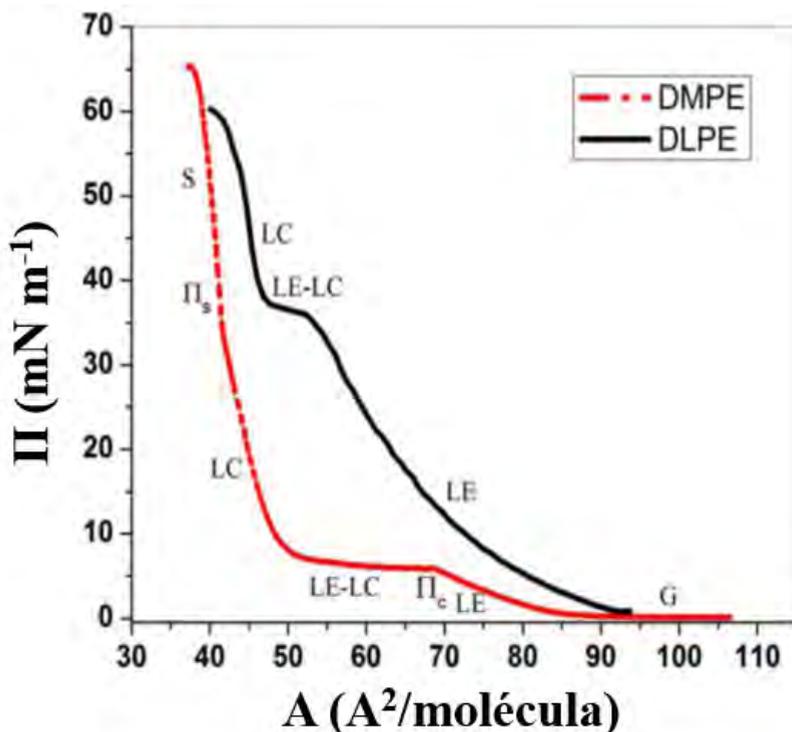


Figura 2.6: Isotherma de $\Pi - A$ de DMPE y DLPE, se muestra la transición de fase de primer y segundo orden denotadas por la meseta LE-LC y el cambio abrupto en la pendiente en Π_s respectivamente (Imagen adaptada de [23]).

molar, el volumen molar y otros parámetros molares sufren cambios discontinuos. La energía libre de Gibbs, $G = U - TS + \Pi A$, es continua pero su derivada parcial con respecto a T y Π

$$\left(\frac{\partial G}{\partial T}\right)_{\Pi} = -S \quad (2.7)$$

$$\left(\frac{\partial G}{\partial \Pi}\right)_T = A \quad (2.8)$$

son discontinuas. En contraste una transición de segundo orden (Π_s en la Figura 2.6) es en la cual la energía libre de Gibbs y su primera derivada son continuas pero su segunda derivada no lo es. Algunos ejemplos de transiciones de segundo orden son los cambios de fase asociados con la temperatura de Curie en materiales ferromagnéticos y las transiciones de orden-desorden observado en algunas aleaciones.

Los estados más generales en una monocapa se ilustran en la isoterma $\Pi - A$ de la Figura 2.6. A muy bajas presiones, se tiene una fase gaseosa, G , que se condensa en una fase denominada líquido expandido (LE) [60, 61]. Una fase más compacta es la fase de líquido condensado (LC) que existe a mayores presiones y bajas temperaturas. Una fase sólida (S) aparece cuando hay un cambio repentino en la pendiente de la isoterma a altas presiones y densidades.

Fase gaseosa

En una monocapa a bajas densidades y presiones la interacción entre moléculas es muy poca y como primera aproximación obedece la ecuación de estado de un gas ideal descrita por

$$\Pi a = k_B T \quad (2.9)$$

donde k_B es la constante de Boltzmann y a el área por molécula. En esta fase el área disponible por molécula es muy grande comparada con el área transversal de cada molécula. En general el área por molécula (a) se mide usando la siguiente ecuación:

$$a = \frac{A}{N} = \frac{A}{nN_A} = \frac{A}{\frac{m}{MW}N_A} \quad (2.10)$$

$$= \frac{A}{\frac{VC}{MW}N_A} = \frac{AMW}{N_AVC} \quad (2.11)$$

donde A es el área disponible en la palangana, N_A es el número de Avogadro, V es el volumen depositado, C es la concentración del lípido, y MW es su peso molecular.

Transiciones gas-líquido

Mientras la monocapa se comprime, la fase gaseosa se condensa en una fase líquido expandida (LE) mediante una transición de primer orden. Esta transición es difícil de estudiar debido a que la presión superficial es muy pequeña en la mayoría de las monocapas y es necesario evitar cualquier impureza que pueda causar una medición errónea de la presión [62]. Existe una amplia evidencia de que la transición de fase es de primer orden: a partir de las discontinuidades en las isothermas $\Pi - A$, la existencia de un calor latente de vaporización asociado con la transición y la coexistencia de fases se puede observar por métodos experimentales. Además, las fluctuaciones en el potencial superficial [63] en la región de ambas fases indica una coexistencia de fases. El caso tridimensional de la transición vapor-líquido puede tratarse en el caso bidimensional usando la ecuación de van der Waals [64] o modelos de mecánica estadística [65]. A temperaturas muy bajas, una monocapa en estado gaseoso puede comprimirse indefinidamente a una fase líquido condensado sin una discontinuidad discernible en la isoterma $\Pi - A$.

Fases condensadas

Después de la transición de gas a líquido, se tiene una variedad de estados condensados. El diagrama de fases de la Figura 2.7 (derecha) presenta los tipos de estados conocidos hasta ahora y se describen a continuación:

1. **Líquido-expandido** (LE, L_1). Es una fase con un arreglo bidimensional isotrópico de anfifilos. Aún existe un debate sobre como formular de la mejor forma una ecuación de estado para una monocapa

en este estado. Tales monocapas son fluidas y coherentes (se puede aplicar estadística de promedios temporales), la distancia promedio entre moléculas es mucho mayor que en el volumen de los líquidos. En el volumen un líquido es típicamente 10% menos denso que su estado sólido correspondiente, mientras que una monocapa en estado *LE* puede existir con áreas moleculares al doble que las de una monocapa en estado sólido. Se han hecho varias modificaciones de la ecuación bidimensional de van der Waals y se ha observado que ajustan bien con datos experimentales [68].

2. **Líquido-condensado (*LC*, L_2)**. Esta es la fase de líquido condensado primaria, considerada al inicio de su caracterización como una película semisólida, teniendo hidratadas las cabezas polares de sus moléculas [61, 69]. Sin embargo, estudios posteriores identificaron esta fase como una fase “esméctica I”, que tiene un ordenamiento de corto alcance traslacional y el área transversal por molécula les permite una rotación libre. Las moléculas están inclinadas con respecto a la posición normal a la intercara, y el ángulo de inclinación varía con la presión. Las monocapas en *LC* generalmente exhiben un régimen casi lineal en las isothermas $\Pi - A$.

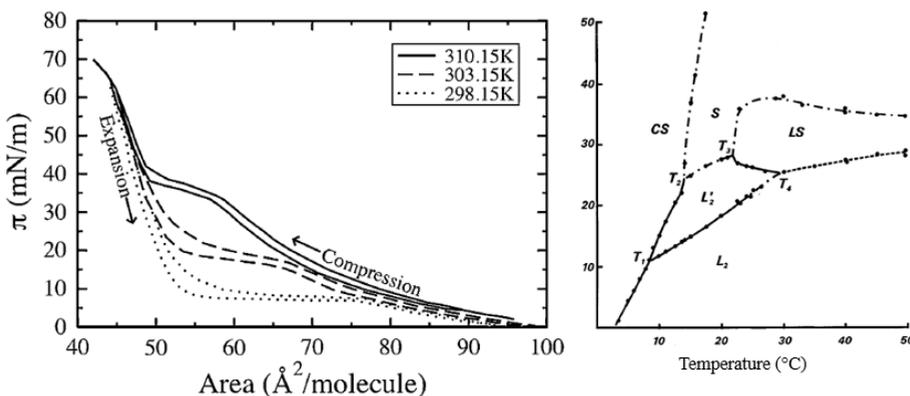


Figura 2.7: Izquierda. Isothermas a diferentes temperaturas (Imagen tomada de [66]). Derecha. Diagramas de fase de monocapas de ácido behénico (Imagen tomada de [67]).

3. **Líquido condensado** (LC' , L'_2). En esta región las moléculas difieren de la fase anterior en la dirección de inclinación de las moléculas. En la fase LC , las moléculas están inclinadas hacia el vecino más cercano mientras que a bajas presiones de la fase LC' están inclinadas hacia el segundo vecino más cercano (fase “esmética” F). Mientras se comprime más y se baja la temperatura la fase LC' es caracterizada por un comportamiento “esmético H”, o una estructura tipo espiga inclinada con dos moléculas en la celda unitaria (a diferentes orientaciones).
4. **Sólido-líquido** (LS). En esta fase las moléculas están orientadas en dirección normal a la superficie en una celda unitaria hexagonal. Está identificada como una fase hexática “esmética BH”. Las cadenas pueden rotar y tener simetría axial debido a su falta de inclinación. Se ha desarrollado un modelo de densidad funcional para la transición de inclinación entre las fases LC y LS [70], cuyos cálculos muestran que las interacciones anfilo-superficie juegan un papel importante en la determinación de la inclinación; sus conclusiones concuerdan con la falta de inclinación encontrada en anfilos fluorinados.
5. **Sólido** (S). Las cadenas en el estado S también están orientadas normales a la superficie, aunque su celda unitaria es cuadrada posiblemente debido a su restricción a rotar. Esta estructura es caracterizada por una fase “esmética E”, o fase espiga. Esta fase puede ser tratada con la teoría de densidad funcional de redes que describe rotaciones de segundo orden en la transición de fases [71].
6. **Cristal sólido** (CS). El cristal bidimensional con cadenas orientadas verticalmente y una estructura traslacional ordenada de largo alcance ocurre a bajas temperaturas y muy altas presiones.

Colapso

Cuando la presión superficial de la monocapa llega a un valor suficientemente alto (dependiendo de las moléculas que la componen) la monocapa colapsa en estructuras tridimensionales. Aún cuando no es completamente conocido el mecanismo de colapso de las monocapas se conoce que pueden ocurrir una formación de fases onduladas (ripples), también pueden crearse

mecanismos de nucleación seguidos de un continuo crecimiento de estructuras en el bulto [72], etc.

La fractura de las monocapas es el único tipo de colapso que se puede medir mediante los cambios en las isothermas $\Pi - A$, usualmente como un pico o una meseta de presión máxima, este valor es el que se reporta como “presión de colapso”. Desafortunadamente, estas presiones de fractura son altamente dependientes de las velocidades de compresión y a menudo no son muy reproducibles.

2.2.3. Teoría de medio efectivo

La aproximación de medio efectivo se encarga del modelado teórico que describe las propiedades macroscópicas de un material compuesto de dos o más componentes (fases). En general son desarrolladas tomando promedios de cantidades de las cuales está formada cada una de las fases que componen el material [73]. En este sentido, la teoría de medio efectivo es una descripción de un material compuesto (medio) basado en fracciones relativas de sus componentes.

Existen muchas teorías de medio efectivo, sin embargo, muchas de ellas fallan al predecir las propiedades del medio compuesto cerca de la percolación, la cual ocurre cuando el medio inicialmente disperso comienza a unirse convirtiéndose en la fase continua, esto es debido a la ausencia de correlaciones de largo alcance no contempladas en la teoría.

Las propiedades usualmente calculadas son la conductividad eléctrica [74], la constante dieléctrica [75] y las propiedades elásticas [76], las últimas caracterizadas por tensores de alto orden.

En el caso del módulo de compresibilidad de monocapas de Langmuir mixtas también se ha empleado en su versión más simple [77]. En esta versión solo se toma en cuenta la fase LE y la fase LC y se suman sus contribuciones individuales, usando la ecuación 2.6 y teniendo en cuenta

que el área total de la monocapa es $A = A_c + A_e$:

$$\frac{1}{E} = -\frac{1}{A} \left(\frac{\partial(A_e + A_c)}{\partial\Pi} \right)_T = \frac{1}{A} \left(\frac{A_e}{E_e} + \frac{A_c}{E_c} \right) \quad (2.12)$$

donde A_e y A_c son el área de la región LE y LC respectivamente (Apéndice C). E_e y E_c son los módulos de compresibilidad en los límites de la transición LE-LC. Este resultado se obtiene suponiendo que la variación de la composición de fases con respecto a la presión es despreciable. Sin embargo, en general esto no ocurre [77]. En principio este modelo tampoco contempla la percolación de la fase LC.

Un método usado para contemplar la percolación es normalizar el módulo de compresibilidad de la siguiente forma

$$E_{norm} = \frac{E - E_e}{E_c - E_e} \quad (2.13)$$

Este módulo es graficado con respecto al porcentaje de área condensada menos el porcentaje de área al cual hay percolación. En general, las curvas siguen un comportamiento parecido yendo desde 0 hasta 1 con un crecimiento abrupto en una región cercana a la percolación.

2.3. Termodinámica bidimensional

Considere dos fases y la intercara entre ellas. Escogemos el sistema como una porción de las dos fases M_1 y M_2 , y la porción de la intercara I encerrada por la superficie cilíndrica (Figura 2.8). Supongamos que la intercara es desplazada ligeramente a una nueva posición I' . El cambio en energía interna es:

$$\text{Para } M_1 \quad dU_1 = TdS_1 - p_1dV_1;$$

$$\text{Para } M_2 \quad dU_2 = TdS_2 - p_2dV_2;$$

$$\text{Para la superficie} \quad dU = TdS + \Pi dA$$

La última ecuación es escrita tomando en cuenta que $dW = -\Pi dA$. El cambio total de la energía interna es:

$$\begin{aligned} dU_{tot} &= dU_1 + dU_2 + dU = Td(S_1 + S_2 + S) - p_1dV_1 - p_2dV_2 + \Pi dA \\ &= TdS - p_1dV_1 - p_2dV_2 + \Pi dA. \end{aligned}$$

Ya que el volumen total es $V_{tot} = V_1 + V_2$, entonces $dV_1 = dV_{tot} - dV_2$, y

$$dU_{tot} = TdS - p_1dV + (p_1 - p_2)dV_2 + \Pi dA \quad (2.14)$$

Si la entropía y el volumen son constantes $dS = 0$ y $dV = 0$. Entonces en equilibrio, la energía tiene un mínimo, $dU = 0$. Esto reduce la ecuación a

$$(p_1 - p_2)dV_2 + \Pi dA = 0. \quad (2.15)$$

Si, como se muestra en la Figura 2.8, la intercara es plana y la superficie no tiene cambios de área, tenemos que $dA = 0$. Ya que $dV_2 \neq 0$, la ecuación 2.15 requiere que $p_1 = p_2$. Consecuentemente, la presión es la misma en las dos fases que están separadas por una superficie divisoria plana. Así, a menos que haya una fuerza externa que perturbe la intercara, esta no se verá afectada más que por los procesos que ocurran en ella.

2.3.1. Mezcla en monocapas

El estudio de monocapas con un solo tipo de moléculas son interesantes primero, desde el punto de vista teórico porque conforman un excelente modelo para estudiar el ordenamiento molecular en dos dimensiones. La superficie donde se colocan es una superficie con una suavidad ideal, aún tomando en cuenta las ondas capilares debidas principalmente a las fluctuaciones térmicas. La temperatura y la presión superficial pueden ser directa e indirectamente controladas; la segunda al ajustar el área superficial al cual están restringidas las moléculas. Estas variables no pueden ser controladas en otro sistema bidimensional. Más aún, las interacciones entre moléculas y entre la subfase y las moléculas pueden ser muy diferentes al cambiar la cabeza o la cola de las moléculas, otra forma de manipular las interacciones es cambiando el pH de la subfase. Podemos categorizar los sistemas donde se tiene más de un componente en 3 tipos, dependiendo de la solubilidad de los componentes de la monocapa:

1. Ambos componentes forman monocapas insolubles.
2. Un componente forma una monocapa insoluble mientras que el otro es soluble, fenómeno conocido como penetración.
3. Ambos componentes son solubles.

La tercera clase de mezclas no serán tratadas en esta tesis.

Mezcla de componentes insolubles

Las fases condensadas de este tipo de mezclas pueden exhibir comportamientos ideales, comportamientos no ideales, o comportamientos de completa inmiscibilidad (Figura 2.9).

Al tratar estas monocapas, la presencia de solventes se puede ignorar y la fase superficial es considerada como una mezcla de los componentes

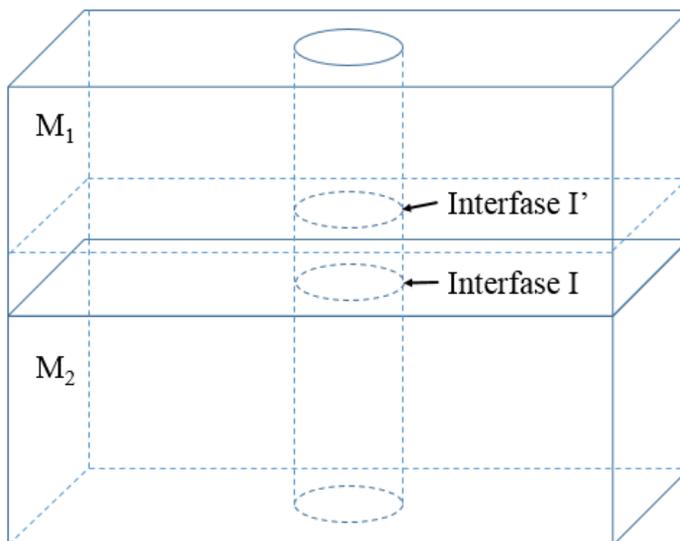


Figura 2.8: Intercara plana que separa los medios M_1 y M_2 .

lipídicos. La interpretación de la existencia de interacciones es basada en relaciones aditivas (Ecuación 2.16). En general una monocapa con diferentes especies muestra comportamientos no ideales, causados por interacciones moleculares significativas, cuando estas propiedades no dependen linealmente de la composición de la monocapa aparecen máximos o mínimos que indican estas desviaciones del caso ideal [78]. La relación lineal que siguen está dada por:

$$A_{ideal} = \chi_1 A_1 + \chi_2 A_2 \quad (2.16)$$

donde A_1 y A_2 son las áreas moleculares a una presión Π dada para los componentes puros (obtenidas experimentalmente) y, χ_1 , χ_2 son las fracciones

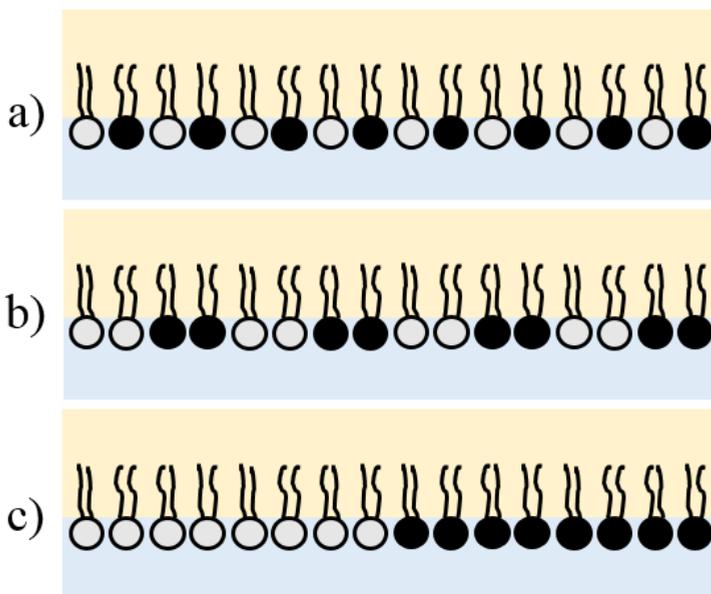


Figura 2.9: Posibles distribuciones de las moléculas en la monocapa de una mezcla. a) Una mezcla homogénea, con componentes completamente miscibles. b) Monocapa no homogénea, con cierta inmiscibilidad de los componentes. c) Completa inmiscibilidad de los componentes de la monocapa.

molares de cada componente para cada mezcla. También es conveniente definir una área de exceso dada por

$$A_{ex} = A - A_{ideal} \quad (2.17)$$

donde A es el área molecular de la respectiva mezcla. Si resulta que A tiene los mismos valores que A_{ideal} obtenemos una $A_{ex} = 0$ lo cual denotará un comportamiento completamente ideal. El mismo resultado se puede obtener si la mezcla es completamente inmisible.

Los comportamientos no ideales presentan desviaciones en la ecuación 2.17 representando mayores áreas promedio por molécula ($A_{ex} > 0$) o menores áreas promedio ($A_{ex} < 0$), y tiene relaciones físicas expresadas de la siguiente manera:

1. $A_{ex} < 0$ (Figura 2.10 izquierda). El área por molécula es menor que el área ideal, esto significa que las moléculas tienen un mayor empaquetamiento, sugiriendo una cierta atracción entre las moléculas y

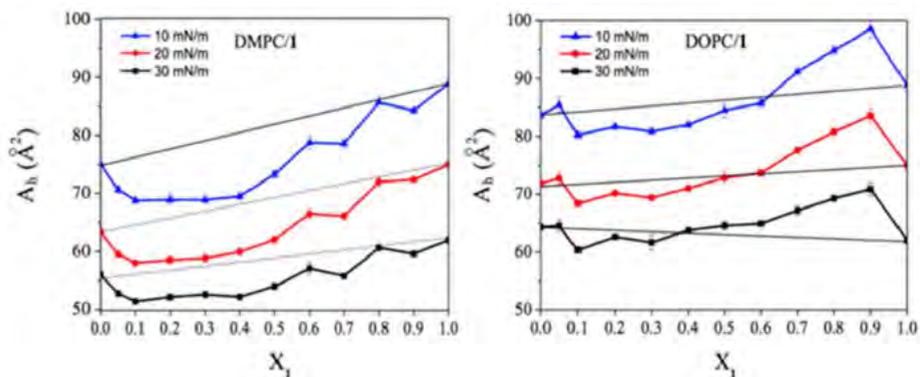


Figura 2.10: Área molecular promedio de (izquierda) DMPC y (derecha) DOPC reportada como función de la concentración molar en la mezcla con pyrene, las líneas rectas representan los valores que debe seguir el comportamiento ideal o mezcla completamente inmisible. Los sistemas fueron investigados a $21^{\circ}C$ y a diferentes presiones superficiales (Imagen tomada de [79]).

una mayor miscibilidad entre especies conllevando a la formación de complejos.

2. $A_{ex} > 0$ (Figura 2.10 derecha). En el otro caso, el área por molécula es mayor que el área ideal, sugiriendo que las moléculas tienen una menor atracción o repulsión entre ellas, creando un mayor espaciado entre las diferentes especies y favoreciendo la formación de agregados de especies puras.

Otra forma de evaluar la interacción entre las moléculas que componen y la estabilidad termodinámica de la monocapa es calcular su exceso de energía libre de Gibbs (ΔG_{ex}). Para esto, consideremos un pequeño cambio reversible dE en la energía del sistema

$$dE = TdS + \sum_i \mu_i dn_i + \Pi dA. \quad (2.18)$$

Y considerando la energía libre de Gibbs del sistema tenemos

$$G = E - TS - \Pi A, \quad (2.19)$$

diferenciando y usando la ecuación 2.18 encontramos

$$\begin{aligned} dG &= dE - TdS - SdT - \Pi dA - Ad\Pi \\ &= TdS + \sum_i \mu_i dn_i + \Pi dA - TdS - SdT - \Pi dA - Ad\Pi \\ &= \sum_i \mu_i dn_i - SdT - Ad\Pi. \end{aligned}$$

Al considerar los experimentos a temperatura y número de moles constante, obtenemos

$$dG = -Ad\Pi. \quad (2.20)$$

Al considerar el proceso de mezclado tenemos que las monocapas tienen permitido esparcirse a una presión baja Π_0 y su cambio de energía libre es

$$\Delta G_{1,2} = -\chi_1 \int_{\Pi_0}^{\Pi} A_1 d\Pi - \chi_2 \int_{\Pi_0}^{\Pi} A_2 d\Pi. \quad (2.21)$$

Por otro lado, a la presión Π_0 (suficientemente baja) la monocapa se comporta de manera ideal, así, en ese proceso inicial de mezclado tenemos

$$\Delta G_{ideal} = RT(\chi_1 \ln \chi_1 + \chi_2 \ln \chi_2). \quad (2.22)$$

Una vez mezcladas las moléculas a baja presión, se lleva a cabo la compresión hasta Π , en este proceso tenemos:

$$\Delta G_{12} = \int_{\Pi_0}^{\Pi} A_{12} d\Pi. \quad (2.23)$$

Para todo el proceso de mezclado desde una presión inicial Π_0 hasta una presión dada Π tenemos que

$$\begin{aligned} \Delta G_{mix} &= \Delta G_{12} + \Delta G_{1,2} + \Delta G_{ideal} \\ &= \int_{\Pi_0}^{\Pi} (A_{12} - \chi_1 A_1 - \chi_2 A_2) d\Pi + RT(\chi_1 \ln \chi_1 + \chi_2 \ln \chi_2), \end{aligned}$$

así, podemos definir la energía de exceso como:

$$\Delta G_{ex} = \int_{\Pi_0}^{\Pi} (A_{12} - \chi_1 A_1 - \chi_2 A_2) d\Pi. \quad (2.24)$$

Usualmente las compresiones comienzan a $\Pi_0 = 0$. Para obtener los excesos de energía libre de Gibbs se puede integrar por diferentes métodos numéricos.

Nuevamente, tenemos dos casos para cuando $\Delta G_{ex} \neq 0$:

1. $\Delta G_{ex} < 0$ (Figura 2.11 izquierda). Implica interacciones atractivas entre las moléculas que componen la mezcla, indicando una interacción termodinámicamente favorable.
2. $\Delta G_{ex} > 0$ (Figura 2.11 derecha a concentraciones molares altas). Implica interacciones repulsivas entre las moléculas que componen la mezcla. Estos valores pueden ser interpretados como una tendencia de las moléculas a interactuar con otras moléculas de la misma especie, conllevando a la observación de separación de fases [80].

Un mínimo en el exceso de energía libre de Gibbs es un indicativo de la formación de complejos entre moléculas de diferentes especies [81], sugiriendo que la influencia de las interacciones moleculares sobre la estabilidad de la monocapa es más significativa en ese valor de concentración molar [82]. Otro efecto que se puede observar en la Figura 2.11 es que a mayores presiones, la desviación de ΔG_{ex} se ve incrementada (en valor absoluto) con respecto al comportamiento ideal, lo cual implica una mayor interacción molecular cuando la monocapa de la mezcla se encuentra en un estado

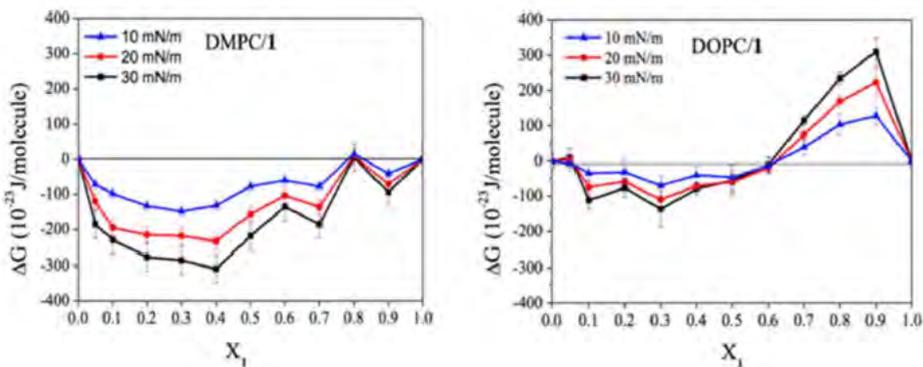


Figura 2.11: Exceso de energía libre de Gibbs reportada como función de la concentración molar en la mezcla de (izquierda) DMPC y (derecha) DOPC con pyrene, las líneas rectas representan los valores que debe seguir el comportamiento ideal o mezcla completamente inmiscible. Los sistemas fueron investigados a $21^{\circ}C$ y a diferentes presiones superficiales (Imagen tomada de [79]).

más condensado [82].

Mezcla de componentes insolubles y solubles (penetración)

Para las monocapas constituidas por partículas superficialmente activas pero solubles en agua, es necesario esperar diferentes tiempos de difusión, para que penetren en la monocapa, adhiriéndose a la superficie y formando una monocapa mixta que contiene componentes insolubles y componentes solubles en agua (Figura 2.12).

Una de las dificultades del estudio físico-químico de la penetración, es que la cantidad de componente soluble presente en la monocapa no es una cantidad tan accesible.

La forma más conveniente de medir la cantidad de material adsorbido

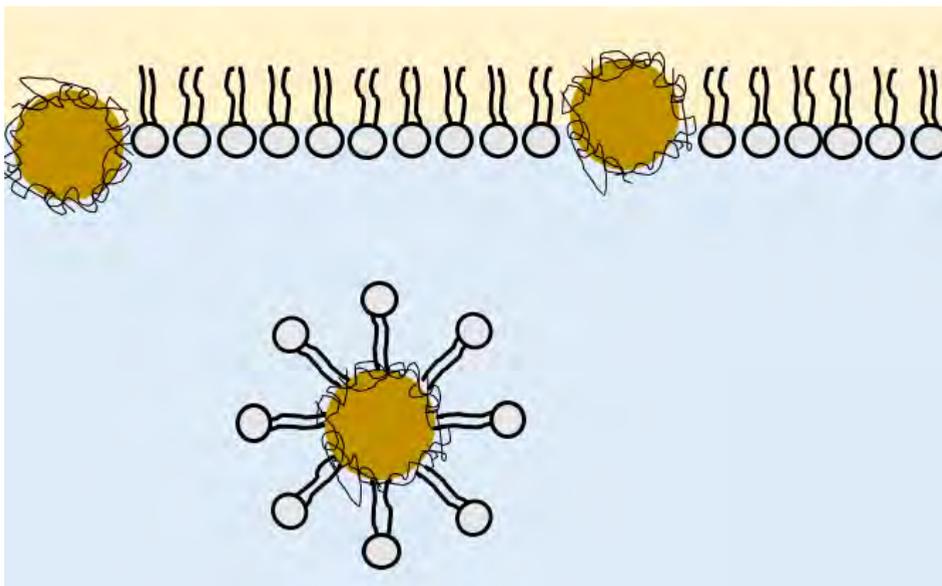


Figura 2.12: Esquema de una monocapa de lípidos en la intercara aire-agua y nanopartículas de oro recubiertas con albumina en la subfase y algunas adsorbidas en la intercara.

en la intercara es a partir de la medición de los cambios en el área superficial mientras se mantiene una presión constante, de esta forma los cambios en el área estarán directamente asociados a tres situaciones:

1. **Aumento de área superficial.** Las partículas son adsorbidas en la intercara creando un aumento en el área superficial al mantener la presión constante. En este caso se puede calcular el número de partículas que han sido adsorbidas.
2. **Disminución de área superficial.** Las partículas solubles secuestran a las moléculas insolubles por efectos hidrofóbicos, electrostáticos, etc. a este efecto se le conoce como desorción.
3. **Se mantiene el área superficial.** En este caso las partículas no son adsorbidas en la intercara o bien hay un intercambio entre la adsorción de unas y la desorción de otras manteniendo el área constante. En este escenario no se puede saber que está ocurriendo sólo con la presión superficial, por lo que otros métodos experimentales complementarios deben ser empleados [83].

2.4. Interacciones moleculares

Los componentes de una monocapa están relacionados directamente con su comportamiento mecánico. En monocapas tanto de una sola especie como mixtas, la longitud de su cola, la cantidad de enlaces dobles, el tamaño de su cabeza o estructura química tendrán un efecto tanto en las isothermas $\Pi - A$, como en la compresibilidad y en las propiedades mecánicas.

2.4.1. Dependencia de la cola hidrofóbica

La temperatura de la transición de fase depende de la longitud de la cola hidrocarbonada, las moléculas con colas más largas experimentan transiciones a temperaturas más altas (temperaturas de fusión T_m , Cuadro 2.2). Haciendo coincidir las líneas de transición de fase de ácidos grasos se puede observar un corrimiento sistemático en el eje de la temperatura de 5-10°C por cada grupo metileno adicional. Así, las monocapas formadas por moléculas que difieren solo en el tamaño de la cola hidrocarbonada

| Lípido | T_m ($^{\circ}\text{C}$) | Lípido | T_m ($^{\circ}\text{C}$) | Lípido | T_m ($^{\circ}\text{C}$) |
|--------|------------------------------|--------|------------------------------|--------|------------------------------|
| DLPC | 14 | DLPE | 29 | DLPG | -3 |
| DMPC | 24 | DMPE | 50 | DMPG | 23 |
| DPPC | 41 | DPPE | 63 | DPPG | 41 |
| DSPC | 55 | DSPE | 74 | DSPG | 55 |

Cuadro 2.2: Temperaturas de fusión de diferentes fosfolípidos (datos obtenidos individualmente de Avanti Polar Lipids).

experimentan la misma secuencia de transiciones de fase, pero a diferentes temperaturas.

Estudios cuantitativos sobre las transiciones de fase en monocapas que difieren solo en su cola hidrocarbonada han sido realizados [84] relacionando las monocapas en “estados equivalentes”, es decir, los estados que poseen los mismos grupos polares, son mantenidos a la misma temperatura y con la misma subfase, y tienen la misma inclinación de sus cadenas hidrocarbonadas y empaquetamiento.

2.4.2. Dependencia de la insaturación en la cola hidrofóbica

La insaturación de las colas hidrofóbicas también influyen directamente y con gran impacto en la temperatura de fusión (T_m) de los fosfolípidos. Para ejemplificar esto tomemos el lípido más estudiado, DPPC, cuya temperatura de fusión es 41°C . Si cada una de sus colas estuviesen monoinsaturadas, convirtiéndolas en ácido palmitoleico, esta temperatura caería hasta -20°C , un cambio drástico de 61°C . Es difícil hacer una tabla que contenga todos los cambios en las insaturaciones, ya que estas se pueden encontrar en casi cualquier enlace C-C dentro de la cola hidrocarbonada.

Este grado de insaturación y su decaimiento en la temperatura de fusión está directamente relacionado con la geometría que pueden tomar estos lípidos. Una cola saturada sin enlaces dobles tendrá una forma más recta en comparación a una insaturada, la cual tiene la capacidad de doblarse o torcerse. Esto provocará un arreglo más ordenado en una monocapa

formada solo de lípidos saturados, esto maximizará las interacciones entre las colas disminuyendo la fluidez de la monocapa. En cambio, en monocapas formadas por lípidos insaturados existirá una mayor distancia entre las colas, lo que favorecerá la fluidez de la membrana. En conclusión agregar lípidos insaturados a una monocapa de lípidos saturados incrementará su fluidez.

2.4.3. Dependencia del grupo polar

El tamaño del grupo polar tiene una relación directa con la compresión de las moléculas, un lípido con una cabeza polar de mayor tamaño tendrá un área por molécula más grande en las isoterms $\Pi-A$. Además, mientras más pequeña sea la cabeza polar, la cola hidrocarbonada tendrá más restricción en su inclinación debido a las interacciones hidrofóbicas desfavorables. Las interacciones entre los grupos polares también pueden variar dependiendo del pH de la subfase [85] [86]. Así, debido a este hecho se debe tener cuidado al usar sólo agua ultrapura, ya que no mantiene su pH fijo, en el caso de lípidos zwitteriónicos esto puede no tomarse en cuenta ya que tienen un intervalo relativamente grande de pH sobre los cuales sus propiedades no varían.

2.5. Monocapas como modelos biológicos

El estudio de monocapas en la intercara aire-agua ha sido de gran ayuda para comprender fenómenos fisicoquímicos que involucran sistemas bidimensionales, pero también ayudan a dilucidar las interacciones entre moléculas y elementos biológicos que cuentan con membranas compuestas de un conjunto similar de moléculas. Sin embargo, los elementos biológicos están compuestos de membranas con estructuras lamelares en especial en forma de bicapa. Aún cuando físicamente una bicapa y una monocapa no son la misma estructura existen condiciones en las cuales el comportamiento es similar. A continuación, trataremos los casos separados de la bicapa y la monocapa considerando la contribución de sus energías libres, junto con las condiciones para que exista un equilibrio mecánico. La bicapa es un estado libre de tensión en ausencia de un esfuerzo externo [87]. Una monocapa, por otro lado, sólo se puede mantener en equilibrio mecánico si se

le aplica una presión superficial externa, en general por medio de paredes que mantengan las moléculas en un área definida. Termodinámicamente, la presión superficial ejercida por la monocapa es una propiedad solamente de la monocapa y no de la intercara [88]. Así, el control de la presión superficial juega un papel importante en la correspondencia entre monocapas y bicapas de fosfolípidos.

2.5.1. Bicapas

La energía libre F_b de la bicapa (Figura 2.13) puede ser expresada en términos de la contribución de las moléculas que la componen [89]:

$$F_b = n_b \phi_b(a_b) = n_b [\phi_{phob}(a_b) + \phi_{hid}(a_b) + \phi_{int}(a_b) + \phi_{m-m}(a_b)], \quad (2.25)$$

donde a_b es el área por molécula y n_b es el número de moléculas en la bicapa, el área total de la bicapa es entonces $A_b = n_b a_b$. Los valores de la energía libre en la ecuación 2.25 se obtienen de exposición hidrofóbica de las colas hidrocarbonadas con el agua en la superficie de la bicapa (ϕ_{phob}), la interacción de hidratación de los grupos polares (ϕ_{hyd}), la interacción

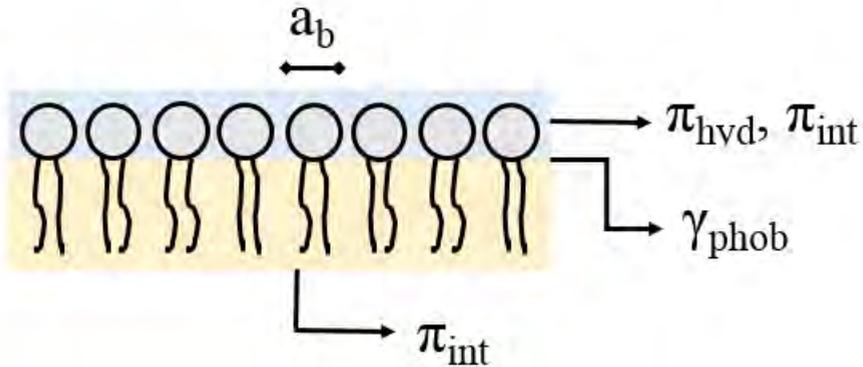


Figura 2.13: Representación esquemática del balance de fuerzas y energías en una bicapa de lípidos.

intermolecular entre las moléculas de lípidos junto con las contribuciones intramoleculares (ϕ_{int}), y la energía libre de interacción con las colas hidrocarbonadas de una monocapa con la otra monocapa (ϕ_{m-m}) del ensamble de la bicapa.

Las condiciones para el mínimo de energía libre determina el área de equilibrio por molécula, a_b^0 , en una bicapa libre de tensión y está dada por

$$\left(\frac{\partial F_b}{\partial a_b}\right)_{n_b} = n_b [\phi'_{phob}(a_b^0) + \phi'_{hyd}(a_b^0) + \phi'_{int}(a_b^0) + \phi'_{m-m}(a_b^0)] = 0, \quad (2.26)$$

donde la prima indica derivada con respecto al área por lípido. De las diferentes contribuciones en la ecuación 2.26, es probable que la interacción entre los dos componentes de la bicapa, representado por ϕ'_{m-m} , son relativamente pequeños debido a que las contribuciones en su mayoría son de van der Waals entre el grupo terminal metilo de las cadenas hidrocarbonadas. Así, la estabilidad de la bicapa es determinada esencialmente por el balance entre la interacción hidrofóbica, que tiende a decrecer el área interfacial lípido-agua, y las interacciones inter e intramoleculares (incluyendo la hidratación del grupo polar), que dan lugar a una repulsión neta que tiende a incrementar el área superficial de la bicapa.

Ya que en buena aproximación, la energía libre hidrofóbica está relacionada linealmente con el área de contacto interfacial de la cadena hidrocarbonada con el agua [90], y puede ser expresada como una densidad de energía libre superficial: $\gamma_{phob} = \phi'_{phob}$, siendo positiva. Los términos restantes, por otro lado, pueden ser expresados como contribuciones a la presión lateral: $\pi_i(a_b) = -\phi'_i(a_b)$, cuyo resultado nuevamente es positivo. Así, la ecuación 2.26 puede reescribirse como:

$$\gamma_{phob} = \pi_{int}(a_b^0) + \pi_{hyd}(a_b^0) - \phi'_{m-m}(a_b^0). \quad (2.27)$$

Esta es la ecuación para el equilibrio mecánico de una bicapa libre de tensión.

2.5.2. Monocapas

La energía libre, F_m , de una monocapa (Figura 2.14) en la intercara aire-agua o en la intercara aceite-agua puede ser expresada en forma similar a la ecuación 2.25 para una bicapa:

$$F_m = n_m \phi_m(a_m) = n_m [\phi_{hyd}(a_m) + \phi_{int}(a_m) + \phi_{m-u}(a_m)], \quad (2.28)$$

donde a_m es el área por molécula en la monocapa y n_m es el número de lípidos en la monocapa, que tiene un área total de $A_m = n_m a_m$. El término final, ϕ_{m-u} , en este caso representa la energía libre de interacción de las cadenas hidrofóbicas con la fase superior, ya sea aceite o agua. El término hidrofóbico es omitido debido a que, a diferencia de las bicapas, las cadenas hidrofóbicas pueden escapar hacia la fase aire o aceite y por lo tanto evitar contactos energéticamente desfavorables con la fase acuosa. En áreas por molécula comparables a aquellas en bicapas, el empaquetamiento tiene una forma similar y por lo tanto las interacciones de van der Waals para ϕ_{int} son muy parecidas a las interacciones en bicapas. Así, para monocapas en ambos tipos de intercara, los primeros dos términos de la ecuación 2.28 son

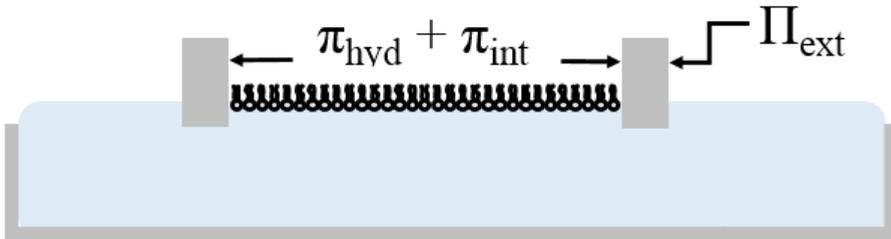


Figura 2.14: Presión superficial en una monocapa en la intercara aire-agua. Las fuerzas repulsivas entre moléculas de la monocapa dan lugar al crecimiento en la presión lateral lo cual reduce la tensión interfacial. En equilibrio mecánico, la presión superficial de la monocapa debe balancearse con la presión externa aplicada con las barreras lo cual previene que la monocapa se siga esparciendo.

similares a aquellas en bicapas, a densidades de empaquetamiento similares.

A diferencia de la bicapa, la monocapa estará en equilibrio solo cuando están bajo la acción de una presión superficial externa, de otra forma esta se expandirá indefinidamente. Derivando la ecuación 2.28, y tomando en cuenta que $-(\partial F_m / \partial A_m)_{n_m}$, es dada por:

$$\Pi_m(a_m) = \pi_{int}(a_m) + \pi_{hyd}(a_m) + \phi'_{m-u}(a_m). \quad (2.29)$$

Esta ecuación representa la condición para el equilibrio mecánico de la monocapa en un experimento, donde la presión superficial aplicada es numéricamente igual a $\Pi_m(a_m)$. Claramente, la presión aplicada Π_{ext} tiene signo contrario a la presión de la monocapa y es negativa de acuerdo a la convención de signos adoptada para los componentes de las presiones laterales $\pi_i(a)$, que en términos de la bicapa corresponde a una tensión extensiva. Nuevamente el término ϕ'_{m-u} debe ser aproximadamente cero para una intercara aire-agua ya que corresponde a las interacciones de van der Waals de las cadenas hidrocarbonadas con el aire. Para la intercara aceite-agua, el término ϕ'_{m-u} aunque es del orden de ϕ'_{m-m} de la ecuación 2.25, puede ser mayor que el de una intercara aire-agua.

2.5.3. Correspondencia bicapa-monocapa

Comparando las ecuaciones 2.25 y 2.28 obtenemos información sobre las condiciones en las que la monocapa está o no en un estado correspondiente al de la bicapa lipídica. El primer requerimiento para la correspondencia es que las áreas por moléculas deben ser las mismas. Ya que los componentes π_{int} y π_{hyd} son similares cuando el área por molécula es la misma, con esto, igualando las ecuaciones 2.25 y 2.28 obtenemos:

$$\Pi_m(a_b^0) = \gamma_{phob} + [\phi'_{m-m}(a_b^0) - \phi'_{m-u}(a_b^0)]. \quad (2.30)$$

Si tomamos en cuenta que los términos relacionados a las interacciones entre monocapa-monocapa en la bicapa y la interacción entre monocapa y la fase superior son muy pequeños entonces $\Pi_m = \gamma_{phob}$, es probable que los lípidos en monocapas y bicapas estén en un estado similar, ya que ambos

están sujetos a la misma tensión de compresión, que para bicapas tiene un valor numéricamente comparable a la densidad de energía libre superficial, γ_{phob} , o interacción debida al efecto hidrofóbico. Aún cuando en monocapas $\phi'_{m-m}(a_b^0) - \phi'_{m-u}(a_b^0) \neq 0$, se tiene que $\phi'_{m-m}(a_b^0) \ll \gamma_{phob}$, por lo que la correspondencia es válida para intercara aire-agua y aceite-agua.

Esto quiere decir que la monocapa y la bicapa tienen una correspondencia mecánica cuando la presión superficial de la monocapa es numéricamente igual a la densidad de energía libre hidrofóbica [91]. Típicamente existe correspondencia cuando las monocapa se encuentra en una fase suficientemente condensada, lo cual ocurre a presiones relativamente altas, en general arriba de 25 mN/m. Estos valores también suelen coincidir con los máximos de la compresibilidad calculadas usando la ecuación 2.6.

Capítulo 3

Reología interfacial

En general, la reología es el estudio de la deformación y el flujo de un material en respuesta a un esfuerzo aplicado. Los sólidos simples almacenan energía y tienen respuestas tipo resorte (elásticas), mientras que los líquidos simples disipan energía a través de un flujo viscoso. Para materiales viscoelásticos complejos (fluidos complejos), las respuestas reológicas revelan ambos tipos de respuestas tanto elásticas como viscosas. Hay dos ideas fundamentales que deben tomarse en cuenta en los estudios reológicos. La primera es que las fuerzas intermoleculares controlan la forma en que los materiales se comportan. La segunda es la importancia de las escalas de tiempo de nuestras observaciones comparados con los tiempos de reacción del material [92]. La relación entre uno y el otro es que los dos surgen a partir de la estructura que es consecuencia de las fuerzas y las escalas de tiempo para cambios debidos al movimiento microestructural resultantes de los cambios en energías mecánicas y térmicas.

La reología interfacial, como su análogo tridimensional, define la relación entre esfuerzo, deformación y tasa de deformación. Una diferencia importante entre los comportamientos reológicos de intercaras y de volumen es que los últimos pueden ser considerados incompresibles en muchas aplicaciones prácticas. Sin embargo, las monoacapas en la intercara pueden ser comprimidas o expandidas sobre un amplio rango de áreas por molécula [93].

Los modos posibles de deformación en una monocapa en la interfaz aire-agua pueden clasificarse en dos clases principales (Figura 3.1):

1. Deformaciones fuera del plano (transversales).
2. Deformaciones sobre el plano.
 - a) Cizallamiento.
 - b) Compresión.

Si una monocapa está presente en una interfaz aire-agua, los modos longitudinales son restaurados por los gradientes de tensión superficial de-

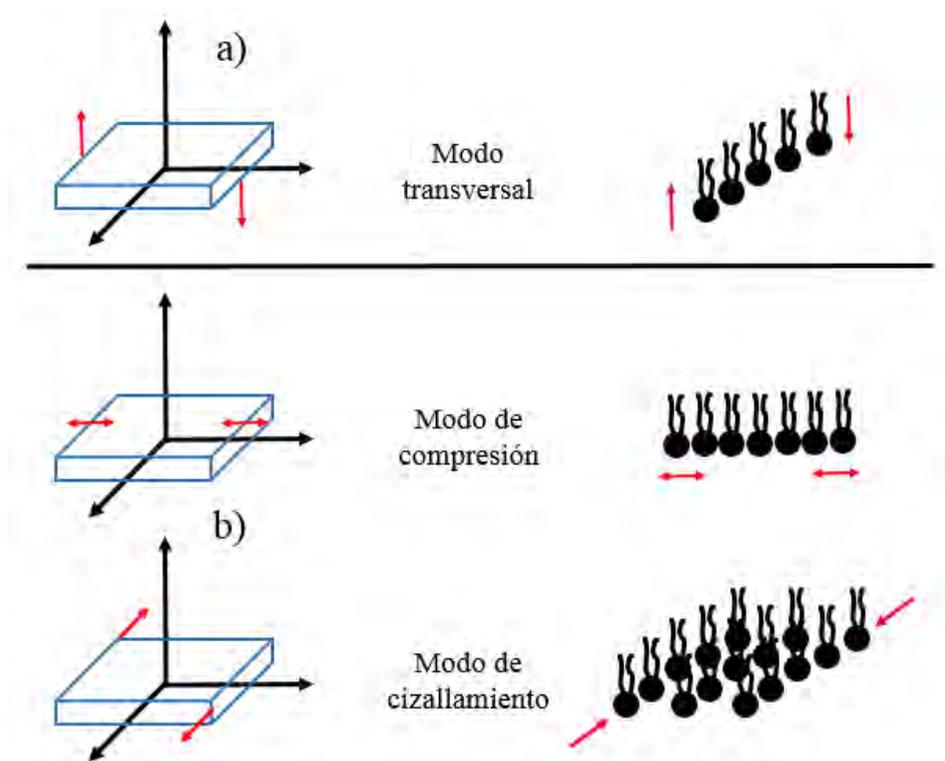


Figura 3.1: Esquema de los diferentes modos de deformación (a) dentro y (b) fuera del plano [94].

bido al gradiente de concentraciones. Ya que los efectos disipativos existen dentro de la monocapa, cada uno de estos modos dinámicos contienen componentes elásticos y viscosos. Así, los materiales consisten generalmente en dos componentes que lo caracterizan, las propiedades elásticas y disipativas de la monocapa en la superficie.

3.1. Esfuerzo y deformación

El esfuerzo se define como la fuerza dividida sobre el área a la cual se aplica. La presión tridimensional es un esfuerzo compresivo de volumen. Cuando colgamos un peso sobre un alambre, estamos aplicando un esfuerzo extensional, así como cuando deslizamos un pedazo de papel sobre una superficie engomada para alcanzar la posición deseada, estamos aplicando un esfuerzo de cizallamiento.

Cuando se aplica un esfuerzo a un material, ocurre una deformación.

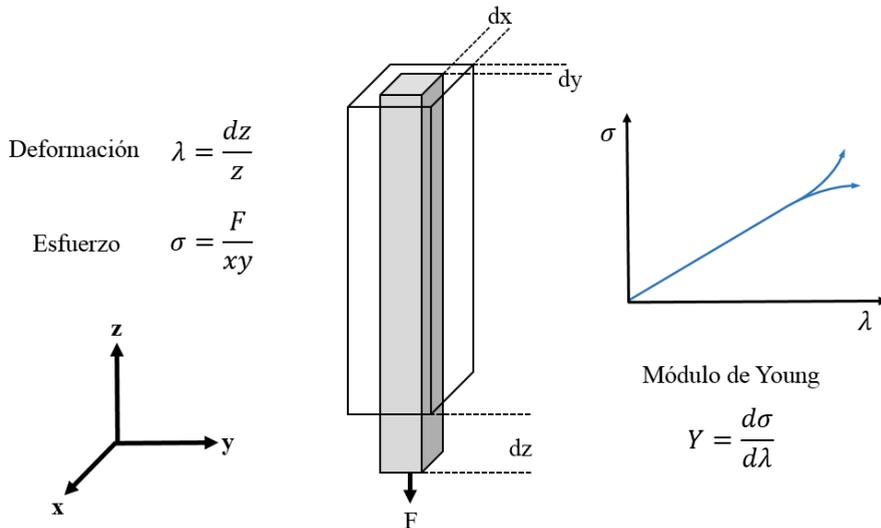


Figura 3.2: Deformación extensional a volumen constante $\lambda = \sigma_{zz} = \sigma_{xx} + \sigma_{yy}$.

Deben notarse algunos casos sobre las deformaciones y esfuerzos (Figuras 3.2 y 3.3):

1. El módulo elástico (módulo de Young) es constante a pequeños esfuerzos y pequeñas deformaciones. Esta linealidad da lugar a la ley de Hooke [95], la cual establece que el esfuerzo es proporcional a la deformación.
2. A mayores esfuerzos y deformaciones, se observan efectos no lineales. En redes poliméricas es normal observar un endurecimiento del material (un incremento del módulo cuando se incrementa la deformación hasta la fractura). Un reblandecimiento es observado en algunos metales y coloides hasta que el material cede al esfuerzo.
3. Debemos reconocer que el esfuerzo y la deformación son cantidades tensoriales y no escalares. Para ilustrar el problema en el caso tridimensional pensemos en lo que pasa si aplicamos una deformación a un elemento del material. La deformación estará compuesta de 3

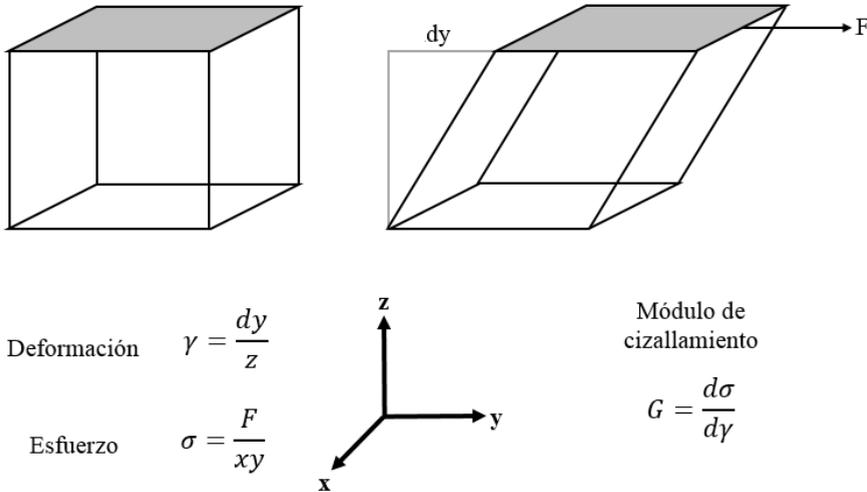


Figura 3.3: Deformación de cizallamiento $\gamma = \sigma_{xz} = \sigma_{zx}$.

elementos ortogonales que están alineados con cada eje, estos pueden descomponerse nuevamente en 3 elementos formando así 9 elementos que pueden ser acomodados en una matriz de 3×3 (Figura 3.4).

3.1.1. Tensor de deformación

La deformación matemática de un cuerpo se puede describir con la posición de cada punto definido por su vector radial $\vec{r} = (x_1, x_2, x_3)$ en algún sistema coordenado. Así, cuando el cuerpo se deforma, cada punto puede ser desplazado. Si consideramos el desplazamiento de un punto desde \vec{r} antes de la deformación hasta un valor diferente \vec{r}' (Figura 3.5). Si denotamos el vector desplazamiento como $\vec{u} = \vec{r}' - \vec{r}$, entonces cada componente es

$$u_i = x'_i - x_i. \tag{3.1}$$

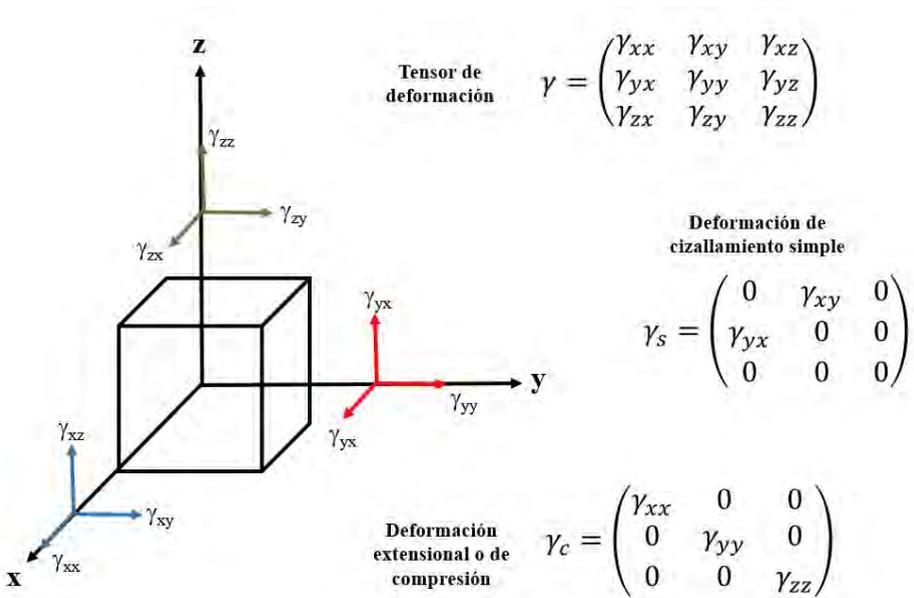


Figura 3.4: Tensor de deformación.

El vector \vec{u} es conocido como el vector desplazamiento. Por lo tanto, si el vector \vec{u} es dado como función de x_i , se puede determinar la deformación del cuerpo.

Si consideramos dos puntos muy cercanos, el vector radial que los une antes de la deformación es dx_i , después de la deformación tenemos $dx'_i = dx_i + du_i$. Por lo tanto, la distancia entre los puntos está dada por

$$dl = \sqrt{dx_1^2 + dx_2^2 + dx_3^2}$$

$$dl^2 = dx_i^2,$$

y después de la deformación,

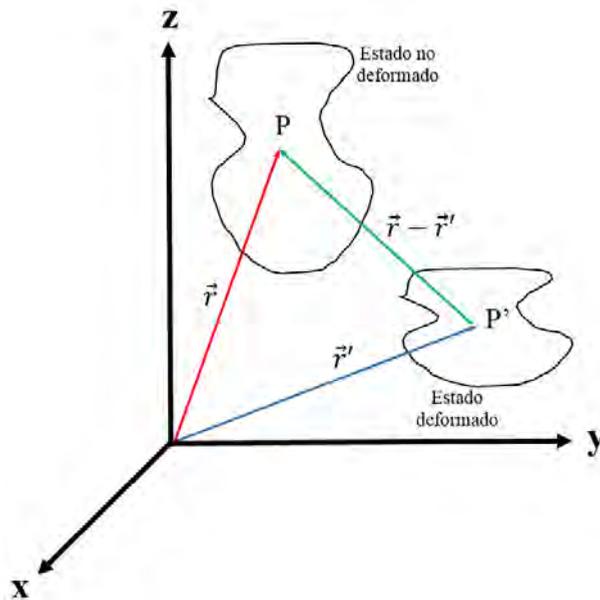


Figura 3.5: Esquema de una deformación general. Se supone que los puntos se mueven de \vec{r} hacia \vec{r}' .

$$dl = \sqrt{dx_1'^2 + dx_2'^2 + dx_3'^2}$$

$$dl'^2 = dx_i'^2 = (dx_i + du_i)^2.$$

Sustituyendo $du_i = (\partial u_i / \partial x_k) dx_k$, podemos escribir

$$dl'^2 = dx_i^2 + 2dx_i du_i + du_i^2$$

$$= dl^2 + 2 \frac{\partial u_i}{\partial x_k} dx_k dx_i + \frac{\partial u_i}{\partial x_k} \frac{\partial u_i}{\partial x_l} dx_k dx_l.$$

Y que la sumatoria es sobre i y k en el segundo término podemos reescribirlo como

$$2 \frac{\partial u_i}{\partial x_k} dx_k dx_i = \frac{\partial u_i}{\partial x_k} dx_i dx_k + \frac{\partial u_k}{\partial x_l} dx_l dx_k = \left(\frac{\partial u_i}{\partial x_k} + \frac{\partial u_k}{\partial x_i} \right) dx_i dx_k.$$

En el tercer término, cambiamos los índices y obtenemos

$$dl'^2 = dl^2 + 2u_{ik} dx_i dx_k,$$

donde definimos u_{ik} como el tensor de deformación

$$u_{ik} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_i}{\partial x_k} + \frac{\partial u_k}{\partial x_i} + \frac{\partial u_l}{\partial x_i} \frac{\partial u_l}{\partial x_k} \right). \quad (3.2)$$

Con el cual se obtienen los cambios de longitud en los elementos del cuerpo cuando este se deforma. Una propiedad importante que podemos notar es que es simétrico, es decir:

$$u_{ik} = u_{ki}. \quad (3.3)$$

Como cualquier tensor simétrico, u_{ik} puede ser diagonalizado. Esto quiere decir que podemos escoger ejes coordenados (ejes principales del tensor) de tal forma que los componentes diagonales u_{11} , u_{22} y u_{33} del tensor u_{ik} sean diferentes de cero. Estos componentes, los valores principales del tensor de deformación serán denotados como $u^{(1)}$, $u^{(2)}$ y $u^{(3)}$. Debe recordarse que, en general, la diagonalización del tensor u_{ik} en un punto del cuerpo no será diagonal en cualquier otro punto.

3.1.2. Tensor de esfuerzo

Cuando un cuerpo se encuentra en un estado de equilibrio mecánico y térmico, es decir, que no está deformado. Esto quiere decir que si se considera una porción del cuerpo, la fuerza resultante en esa región será cero. Sin embargo, cuando una deformación se lleva a cabo, el equilibrio se pierde principalmente por el reacomodo de las moléculas. Por lo tanto, surgen fuerzas que tienden a regresar al cuerpo al estado de equilibrio, estas fuerzas se conocen como *esfuerzos internos*. De acuerdo a la teoría de elasticidad, podemos decir que estos esfuerzos internos son fuerzas de corto alcance, las cuales actúan solo en los puntos vecinos. Así, las fuerzas ejercidas sobre cualquier parte del cuerpo actúan solo en la superficie de esa parte del cuerpo.

Consideremos la fuerza total en alguna parte del cuerpo. Primero, esta fuerza es la suma de todas las fuerzas de todos los elementos del volumen en esa región del cuerpo, es decir, se puede escribir la integral de volumen

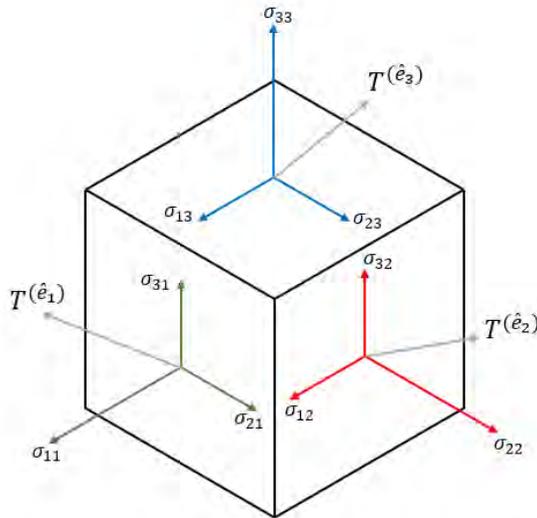


Figura 3.6: Tensor de esfuerzo sobre un volumen.

$\int \vec{F} dV$, donde \vec{F} es la fuerza por unidad de volumen y $\vec{F} dV$ es la fuerza sobre el elemento de volumen dV . Segundo, las fuerzas con las cuales varias partes del elemento considerado actúan una sobre otra no pueden dar algo diferente de cero (tercera ley de Newton). Así, la fuerza total es la suma de las fuerzas ejercidas sobre un elemento dado del cuerpo debido a los elementos que lo rodean (Figura 3.6). Sin embargo, estas fuerzas actúan sobre la superficie del elemento, y así la fuerza resultante puede representarse como la suma de fuerzas que actúan sobre todos los elementos superficiales, es decir, una integral sobre la superficie.

En este caso tenemos la integral de un vector. Así, F_i debe ser la divergencia de un tensor de rango dos, es decir, de la forma:

$$F_i = \frac{\partial \sigma_{ik}}{\partial x_k}. \quad (3.4)$$

Entonces la fuerza sobre cualquier volumen puede escribirse como la integral sobre la superficie que encierra el volumen:

$$\int F_i dV = \int \frac{\partial \sigma_{ik}}{\partial x_k} = \oint \sigma_{ik} dA_k, \quad (3.5)$$

donde dA_k son los componentes del vector superficial $d\vec{A}$, dirigido de forma normal hacia afuera de la superficie.

El tensor σ_{ik} es llamado *tensor de esfuerzo*. Como $\sigma_{ik} dA_k$ es el i -ésimo componente de la fuerza sobre el elemento de superficie $d\vec{A}$. Tomando elementos de área en los planos de xy , yz y zx , encontramos que el componente σ_{ik} del tensor de esfuerzo es el i -ésimo componente de la fuerza por unidad de área perpendicular al eje x_k . Así, la fuerza por unidad de área perpendicular al eje x normal al área es σ_{xx} , y las componentes tangenciales son σ_{yx} y σ_{zx} . En total el tensor de esfuerzo tiene 9 componentes debidas a la descomposición del esfuerzo en cada eje en 3 subcomponentes (Figura 3.6) y está dado por:

$$\sigma_{ik} = \begin{pmatrix} \sigma_{xx} & \sigma_{yx} & \sigma_{zx} \\ \sigma_{xy} & \sigma_{yy} & \sigma_{zy} \\ \sigma_{xz} & \sigma_{yz} & \sigma_{zz} \end{pmatrix}. \quad (3.6)$$

En el caso general para una deformación arbitraria, los componentes no-diagonales del tensor de esfuerzo no son cero. Esto quiere decir que no sólo las fuerzas normales (compresión) sino también las tangenciales (cizallamiento) actúan sobre cada elemento de superficie. En nuestro caso la ecuaciones se restringen a un sistema bidimensional donde también existen esfuerzos tanto de compresión como de cizallamiento.

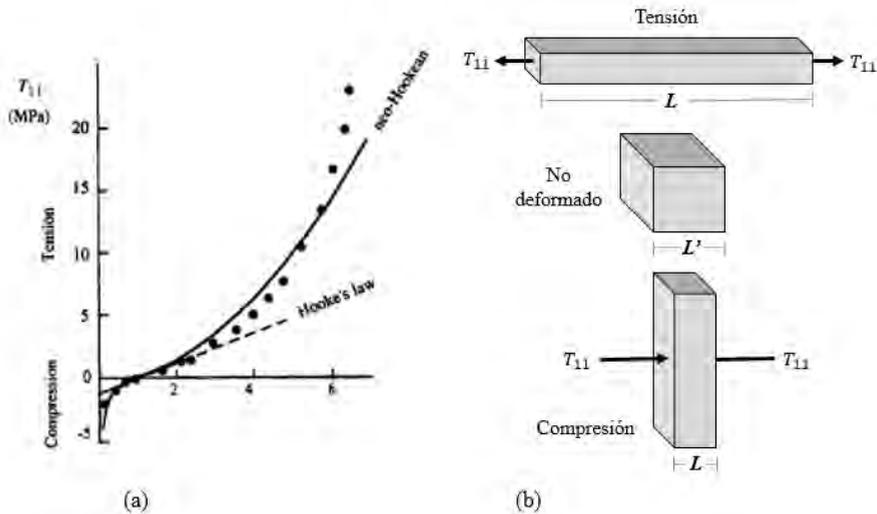


Figura 3.7: a). Comportamiento Hookeano (parte lineal) y comportamiento neo-Hookeano, donde la tensión crece al aumentar la deformación (Imagen tomada de [96]). b) Diagrama esquemáticos de la deformación.

3.2. Deformación en sólidos elásticos

Robert Hooke y sus experimentos mostraron que cuando se cuelga un peso de un resorte, este sufre un estiramiento, y que cuando se duplica el peso, la longitud de estiramiento se ve duplicada. Así, propuso que la fuerza es proporcional al cambio en la longitud de estiramiento. Pero si usaba un espesor o tamaño diferente de resorte, encontraba una constante de proporcionalidad diferente. Por lo que su constante de proporcionalidad no era universal y dependía de las propiedades del material, así como de su geometría. Para encontrar la verdadera constante del material (módulo elástico) de los resortes, Hooke desarrolló el concepto de esfuerzo y deformación (conceptos clave en reología y definidos en las secciones anteriores).

Si en esa época hubiera tenido caucho, las conclusiones habrían sido diferentes. La Figura 3.7 muestra resultados para una muestra de caucho probada en deformaciones de tensión y compresión. Podemos ver que a bajas deformaciones el esfuerzo es lineal con la deformación, pero a grandes

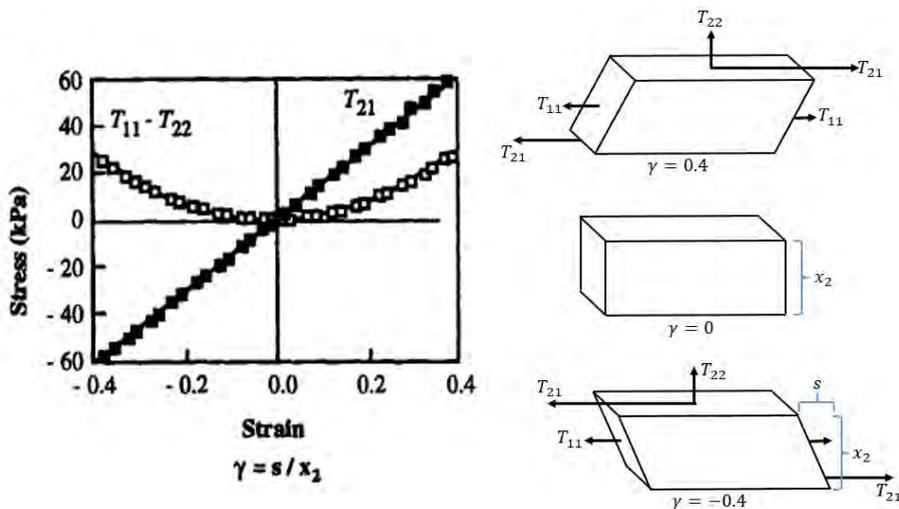


Figura 3.8: Deformación de cizallamiento sobre un sólido (Imagen adaptada de [96]).

deformaciones el esfuerzo es mayor al predicho por la ley de Hooke. La relación que en este caso ajusta la información es:

$$T_{11} = G \left(\alpha^2 - \frac{1}{\alpha} \right), \quad (3.7)$$

donde T_{11} es la fuerza de tensión dividida por el área a sobre la cual se actúa ($T_{11} = \frac{F}{a}$) y G es el factor de proporcionalidad también conocido como el módulo de cizallamiento. El radio de extensión α es definido como la longitud de deformación dividida por la longitud sin deformación:

$$\alpha = \frac{L}{L'}.$$

La Figura 3.8 muestra resultados de diferentes experimentos sobre el mismo caucho, en estos el material es cizallado entre dos placas paralelas manteniéndolas a la misma separación x_2 . Podemos observar que el esfuerzo de cizallamiento es lineal con la deformación sobre un amplio rango; sin embargo, a grandes deformaciones hay un componente adicional, los esfuerzos normales T_{11} y T_{22} necesarios para mantener el bloque con espesor constante x_2 . En el caucho, esta diferencia de esfuerzos normales dependen de la deformación de forma cuadrática:

$$T_{11} - T_{22} = G\gamma^2,$$

donde γ es definida como la deformación de cizallamiento sobre la superficie superior del bloque, es decir:

$$\gamma = \frac{s}{x_2}.$$

Además podemos encontrar que:

$$\sigma = G\gamma. \quad (3.8)$$

donde podemos observar que el esfuerzo de cizallamiento denotado por σ es lineal con la deformación.

3.3. Tasa de deformación y fluidos viscosos

Cuando un sistema fluido es estudiado mediante la aplicación de un esfuerzo, se produce movimiento hasta que el esfuerzo es removido. Considere dos superficies separadas por un pequeño espacio que contiene un líquido, como en la Figura 3.9. Un esfuerzo de cizallamiento constante debe ser mantenido en la superficie superior para que se mueva a velocidad constante, v . Si suponemos que no hay deslizamiento entre la superficie y el líquido, habrá un cambio continuo en la velocidad a través del espacio entre superficies, llegando a cero en la superficie inferior. Ahora a cada momento, el desplazamiento producido x y la deformación está dada por

$$\gamma = \frac{x}{z}, \quad (3.9)$$

y la velocidad $v = dx/dt$, podemos escribir la tasa de deformación como

$$\frac{d\gamma}{dt} = \frac{v}{z}. \quad (3.10)$$

Los términos *tasa de deformación*, *gradiente de velocidad* y *tasa de cizallamiento* son usados como sinónimos. Cuando la gráfica de esfuerzo de cizallamiento contra la tasa de deformación es lineal (Figura 3.9, derecha),

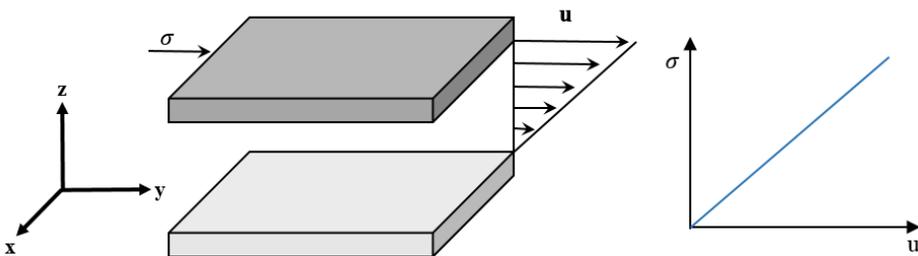


Figura 3.9: Gradiente de velocidades cuando un fluido es cizallado.

el comportamiento del líquido es simple y el líquido es Newtoniano [97] con la viscosidad, η , siendo la constante de proporcionalidad, es decir:

$$\sigma = \eta \dot{\gamma}. \quad (3.11)$$

donde $\dot{\gamma}$ denota la derivada temporal de γ .

3.4. Fluidos complejos y viscoelasticidad

Como ya hemos visto en las secciones anteriores, podemos escribir dos relaciones fundamentales que identifican las dos formas principales de comportamientos. Por ejemplo

$$\sigma = G\gamma, \quad (3.12)$$

$$\sigma = \eta \dot{\gamma}, \quad (3.13)$$

para sólidos Hookeanos y fluidos Newtonianos, respectivamente. Estas ecuaciones describen el comportamiento general de estos materiales a deformaciones pequeñas.

3.4.1. Viscoelasticidad

La principal característica que distingue a los diferentes tipos de materiales es cómo se comportan ante una deformación, es decir, el esfuerzo que sus moléculas realizan ante dicha deformación. Supongamos que tenemos un conjunto de ligas que pueden tener diferentes respuestas al aplicarles un esfuerzo constante que las estira (Figura 3.10) durante un periodo de tiempo:

1. **Caso elástico.** Si la liga permanece estirada durante ese lapso de tiempo y se suelta, el esfuerzo de las moléculas permanecerá constante tal que al momento de soltarla, la liga regresará a su longitud original.
2. **Caso viscoso.** Nuevamente si se intenta estirar la liga, las moléculas no realizarán ninguna clase de esfuerzo en mantener la forma original

al momento de soltarla. Al tratarse de un caso puramente viscoso es como si intentáramos jalar una liga de agua, donde la forma no será conservada.

3. **Caso viscoelástico.** En el caso en que las moléculas vayan perdiendo la capacidad de realizar esfuerzo mientras pasa el tiempo, es decir, que al soltarla la forma sea diferente a l original, tendremos un caso

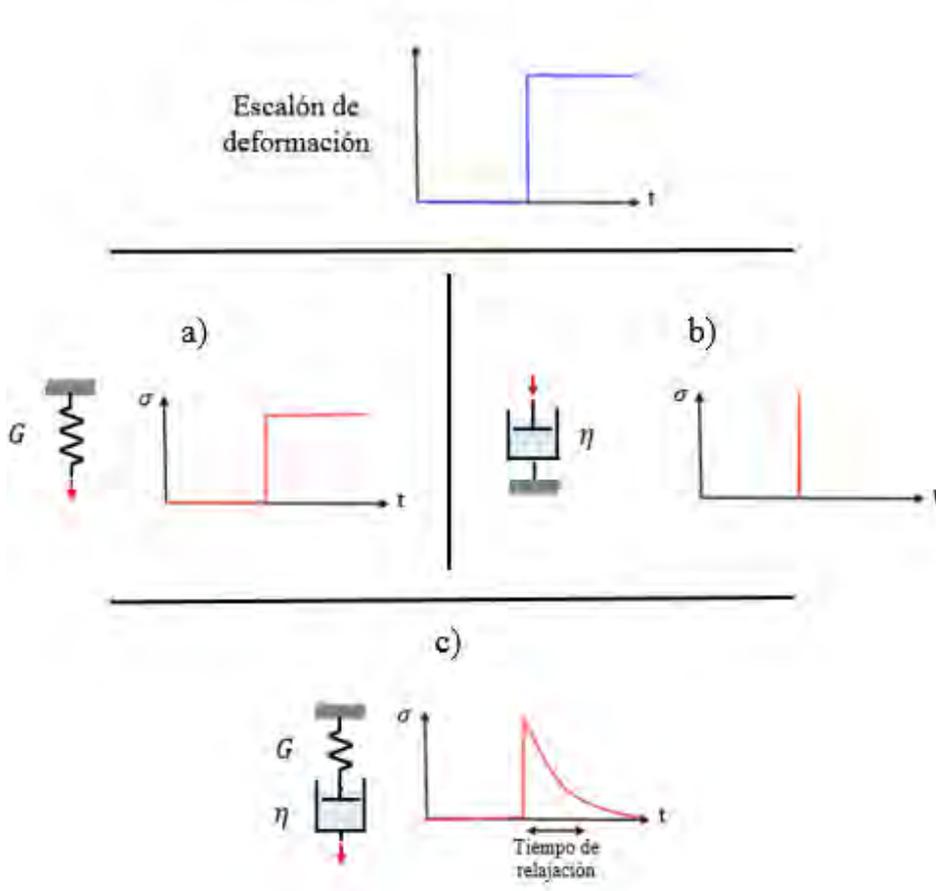


Figura 3.10: Una deformación constante se aplica a 3 diferentes materiales. a) Elástico. b) Viscoso. c) Viscoelástico.

intermedio, tanto elástico como viscoso. A este tipo de materiales los denominaremos fluidos complejos.

Dentro de la complejidad de los fluidos complejos, el tiempo de observación es esencial para atribuirles algún tipo de comportamiento preferencial. Por ejemplo, el vidrio a temperatura ambiente cumple todos los requisitos para ser un sólido con un punto de quiebre muy bajo. Sin embargo, si uno toma tiempo de observación muy largos (10 millones de años) el vidrio se comporta como un fluido [98].

Viscoelasticidad de compresión

Consideremos un cambio infinitesimal en el área superficial, $\delta A(t)$ producido por un esfuerzo uniaxial. La perturbación del área induce un cambio en la presión superficial $\delta\Pi(t)$ el cual evoluciona en el tiempo hasta que se alcanza un nuevo estado de equilibrio. Este cambio en la presión superficial depende de la escala de tiempo a la cual se lleva a cabo el experimento, y, a primer orden, puede expresarse como [99]:

$$\delta\Pi(t) = \Pi(t) - \Pi_0 = \frac{\partial\Pi}{\partial A}\delta A = -E(t)u(t), \quad (3.14)$$

donde $E(t) = -A_0(\partial\Pi/\partial A)_T$ es el módulo de compresibilidad dependiente del tiempo (definido en el capítulo 3) y está relacionado con la capacidad de la monocapa de almacenar energía elástica al comprimirse. Esta ecuación puede ser entendida como una respuesta general dependiente del tiempo, donde el esfuerzo superficial $\delta\Pi$ aparece como consecuencia al estímulo aplicado por medio de una deformación de compresión dada por $u(t) = \delta A/A_0$. En este contexto, la función de proporcionalidad $E(t)$ está relacionada con la función del material, que usualmente contiene ambos modos: tanto el componente de compresión como de cizallamiento: $E(t) = K + G$ [100]. Esto es debido a que la compresión uniaxial siempre involucra cizallamiento. Para sistemas fluidos, usualmente el componente de cizallamiento es muy pequeño comparado con el de compresión, mientras que es diferente de cero en monocapas sólidas.

En el límite de módulo de elasticidad constante, la ecuación 3.14 es equivalente a la ley de Hooke para un sólido puramente elástico. Si hay fricción involucrada, debe existir algún retraso en la función de respuesta que puede escribirse en términos del módulo viscoelástico incluyendo un término asociado a la disipación:

$$-\delta\Pi(t) = E^*(t)u(t) = \left[E'(t) + \mu(t)\frac{\partial}{\partial t} \right] u(t). \quad (3.15)$$

El segundo término está relacionado con las pérdidas debido a la viscosidad, que son proporcionales a la tasa de deformación (ley de Newton). Los factores de proporcionalidad son el módulo elástico ($E'(t)$) y la viscosidad de compresión ($\mu(t)$) que también depende del tiempo.

Para una deformación oscilatoria de pequeña amplitud ($\delta A \approx e^{i\omega t}$) con frecuencia ω , el módulo es una cantidad compleja dada por:

$$E^*(\omega) = E'(\omega) + i\omega\mu(\omega),$$

donde definimos el módulo elástico o de almacenamiento como E' y el módulo viscoso o de pérdidas como E'' , así

$$E^*(\omega) = E'(\omega) + iE''(\omega). \quad (3.16)$$

En equilibrio, o cuando la monocapa es perturbada a lo largo de un proceso cuasi-estático ($\omega \rightarrow 0$ para deformaciones oscilatorias), no hay respuestas viscosas presentes y el esfuerzo es puramente elástico. En este caso, el módulo de elasticidad es el mismo que el módulo de compresión obtenido de las pendientes de las isothermas $\Pi - A$ (E_0). Y la viscosidad de compresión alcanza su límite Newtoniano en el que es independiente de la frecuencia.

Las respuestas viscoelástica lineal de las monocapas adsorbidas obedece las relaciones de Kramers-Kronig, de las cuales se puede concluir que la respuesta elástica incrementa monótonamente con la frecuencia de deformación, mientras que la viscosidad decrece con la frecuencia (Figura 3.11) [102].

Viscoelasticidad de cizallamiento

Los conceptos de reología tridimensional pueden ser aplicados a la reología en dos dimensiones, aunque hay varias limitantes.

1. Para un análisis correcto el tensor de esfuerzo en la intercara debe ser simétrico.
2. Debido a las fuerzas de arrastre las propiedades de cizallamiento interfacial dependen de la geometría del aparato y el efecto de acoplamiento de la subfase debe considerarse en el análisis de la información.
3. Cada elemento de la intercara debe deformarse a área constante, y cualquier flujo radial en la intercara debe evitarse [103, 104].

Para deformaciones en el plano $x-y$ podemos definir la elasticidad interfacial de cizallamiento G como el factor de proporcionalidad entre la defor-

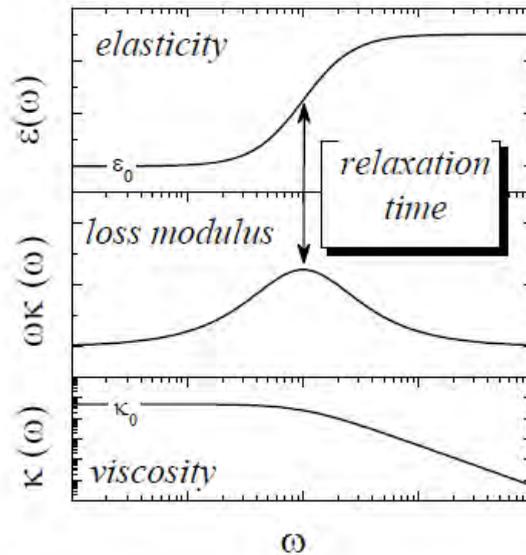


Figura 3.11: Dependencia de la frecuencia típica, módulos elástico y viscoso (Imagen tomada de [101]).

mación aplicada (u_{xy}) y el esfuerzo ejercido por la monocapa (σ_{xy}). Las monocapas “sólidas” muestran comportamientos elásticos (Hookeano) caracterizados por $\sigma_{xy} = G\gamma_{xy}$. Para monocapas totalmente “fluidas”, un comportamiento viscoso (Newtoniano) se observa con $\sigma_{xy} = \eta d\gamma_{xy}/dt = \eta\dot{\gamma}_{xy}$, donde $\dot{\gamma}_{xy}$ es la tasa de deformación y η es la viscosidad interfacial de cizallamiento.

La mayoría de monocapas interfaciales muestran comportamientos tanto elásticos como viscosos, y la respuesta a tal viscoelasticidad, de acuerdo a la reología de bulto, es un módulo complejo de cizallamiento G^* con una parte real y otra imaginaria dadas por:

$$G^*(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega) = G' + i\omega\eta \quad (3.17)$$

donde G' es el componente de almacenamiento y G'' es el componente de perdidas en cizallamiento. Para un movimiento oscilatorio a pequeña amplitud de frecuencia ω ($\gamma = \gamma_0 e^{i\omega t}$) el módulo de perdidas está relacionado con la fricción debida a la viscosidad como $G'' = \omega\eta$, donde nuevamente η es la viscosidad interfacial de cizallamiento.

3.4.2. Respuestas reológicas

Los materiales fluidos, por definición, son aquellos que fluyen cuando se les aplica un esfuerzo de cizallamiento. La forma en que responden a dichos esfuerzos es la base de la reología. Existen muchos tipos de fluidos: sustancias puras, mezclas, dispersiones y soluciones, que caen en categorías de fluidos simples o complejos. Cada uno tiene su comportamiento particular. En general, cuando un material tiene una fase uniforme, tal material es una sustancia pura y se le conoce como un fluido simple. Los materiales que contienen más de una fase, como las mezclas entre otras, son considerados fluidos complejos ya que su comportamiento reológico es generalmente dominado por las interacciones de sus constituyentes.

Ya hablamos de los comportamientos básicos (elásticos y viscosos) cuya particularidad es que siguen un comportamiento lineal entre el esfuerzo aplicado y su forma de fluir o deformarse. En los comportamientos lineales

existen otros tipos de materiales, y dentro de los comportamientos viscoelásticos la variedad aumenta.

Flujo de Bingham (plástico)

Eugene Bingham, un químico de coloides, primero en acuñar el término reología. También mostró que muchos fluidos reales tienen un nivel crítico de esfuerzo al cual deben ser sometidos para poder comenzar el flujo. Debajo de este esfuerzo crítico (σ_y), el material se comporta como un sólido, absorbiendo energía sin fluir. Una vez que se llega al umbral de esfuerzo crítico, el material cede y comienza a fluir (límite de fluencia). Este esfuerzo de corte es el responsable, por ejemplo, de porque necesitamos agitar el bote de la catsup para lograr un buen flujo. Los materiales que muestran este comportamiento llevan el nombre de fluidos de Bingham [105].

Los materiales bidimensionales como las monocapas de lípidos también tienen este tipo de comportamientos y pueden ser investigados siguiendo las curvas de esfuerzo contra deformación.

Un modelo simple para materiales plásticos es el modelo de Hooke para

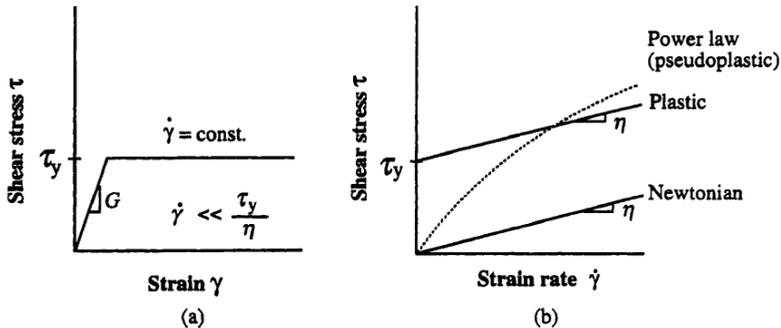


Figura 3.12: Comportamiento de Bingham. a) Esfuerzo de cizallamiento contra deformación. b) Esfuerzo de cizallamiento contra tasa de deformación comparado con la ley de potencias para modelos Newtonianos (Imagen tomada de [96]).

esfuerzos debajo del esfuerzo de corte y comportamiento Newtoniano arriba del esfuerzo de corte (Figura 3.12). Para deformaciones unidimensionales tenemos

$$\sigma = G\gamma \quad \text{para} \quad \sigma < \sigma_y, \quad (3.18)$$

$$\sigma = \eta\dot{\gamma} + \sigma_y \quad \text{para} \quad \sigma \geq \sigma_y. \quad (3.19)$$

Este modelo también puede ser escrito tal que no permite movimiento debajo del esfuerzo de corte

$$\dot{\gamma} = 0 \quad \text{para} \quad \sigma < \sigma_y, \quad (3.20)$$

$$\sigma = \eta\dot{\gamma} + \sigma_y \quad \text{para} \quad \sigma \geq \sigma_y, \quad (3.21)$$

este último fue el modelo usado originalmente por Bingham.

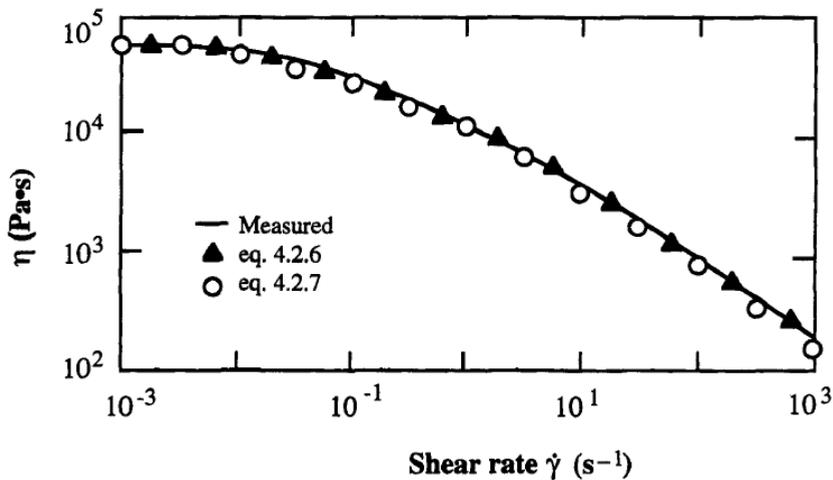


Figura 3.13: Viscosidad de cizallamiento contra la tasa de deformación (Imagen tomada de [96]).

Flujo pseudoplástico (shear thinning)

Algunos materiales no tienen un esfuerzo de corte, pero tienen comportamientos no lineales. Estos son considerados como pseudoplásticos [106] y fluyen instantáneamente al aplicárseles un esfuerzo pero muestran una disminución en su viscosidad y por lo tanto en su forma de fluir al aumentar la tasa de deformación (Figura 3.13), en la Figura 3.12 se muestra la diferencia entre comportamientos Newtonianos, plásticos y pseudoplásticos, representando su esfuerzo en función de γ y $\dot{\gamma}$.

El fenómeno de disminución en la viscosidad es también evidente en mediciones dependientes del tiempo. La Figura 3.14 muestra la dependencia temporal de la viscosidad de cizallamiento, definida análogamente a la viscosidad estacionaria como:

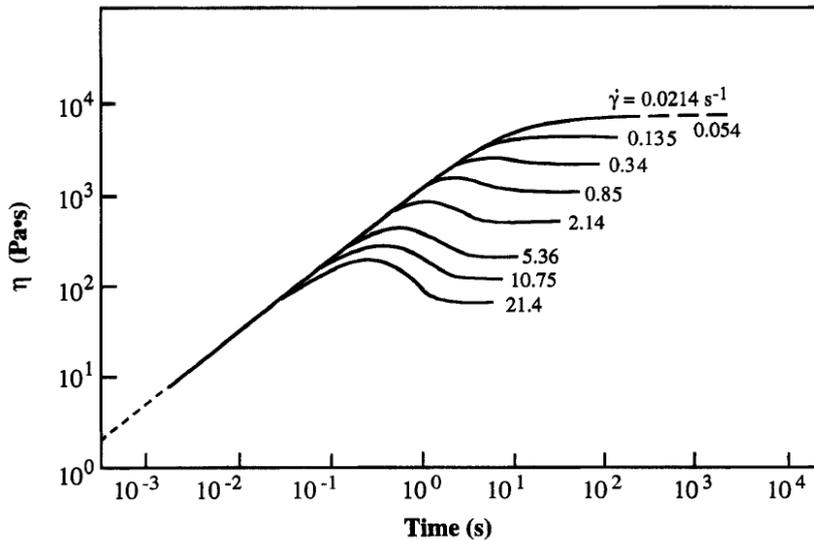


Figura 3.14: Crecimiento en la viscosidad de cizallamiento como función del tiempo después del cizallamiento a varias tasas de deformación (Imagen tomada de [96]).

$$\eta = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}}. \quad (3.22)$$

Mientras menor sea la tasa de deformación, el comportamiento está dentro de un régimen viscoelástico lineal (Figura 3.14) donde la viscosidad se vuelve independiente de $\dot{\gamma}$.

Las pinturas modernas son ejemplos de materiales pseudoplásticos. Cuando las pinturas son aplicadas el cizallamiento creado por la brocha permite que disminuya la viscosidad tal que moje la superficie de forma uniforme. Una vez aplicada la pintura vuelve a recuperar su viscosidad para no escurrir y terminando por solidificar.

Flujo dilatante (shear thickening)

El comportamiento de flujo dilatante es un fenómeno inusual donde los materiales aumentan su viscosidad al aumentar la tasa de deformación. En algunos casos son suspensiones densas de partículas sólidas en un medio fluido, las cuales al desarrollar espaciados mayores entre las partículas durante la agitación. Este efecto es encontrado en las temibles arenas movedizas y en suspensiones farmacéuticas tales como la penicilina. Este comportamiento dilatante a menudo resulta en la inestabilidad de materiales y arreglos estructurales o separaciones de fase.

3.5. Modelos viscoelásticos

La respuesta de los materiales elásticos, tal como vimos en las secciones anteriores, la relación entre esfuerzo y deformación puede ser expresada por medio de la ecuación de Hooke:

$$\sigma = E\gamma. \quad (3.23)$$

Al estudiar la respuesta de estos materiales, el concepto de tiempo no entra en las discusiones. Los materiales elásticos puros no muestran dependencia del tiempo en sus respuestas.

Cuando le aplicamos una fuerza externa a un fluido, estos se deforman de forma continua (fluyen). Para estos materiales se sigue la ecuación lineal de Newton:

$$\sigma = \eta \dot{\gamma}. \quad (3.24)$$

El significado físico de la tasa de deformación puede ser visto como un coeficiente de fricción entre la superficie de contacto y los cuerpos. Mientras más alto sea este coeficiente, más grueso (viscoso) será el material y más difícil de deformar.

Cuando queremos modelar estos comportamientos, tenemos dos casos particulares (Figura 3.15):

1. **Resorte.** Elemento básico para representar los comportamientos de los materiales elásticos (Hookeanos).
2. **Amortiguadores.** Elemento básico que representa la parte viscosa de los materiales (Newtonianos).

Para materiales viscoelásticos, la relación entre esfuerzo y deformación puede ser expresada como:

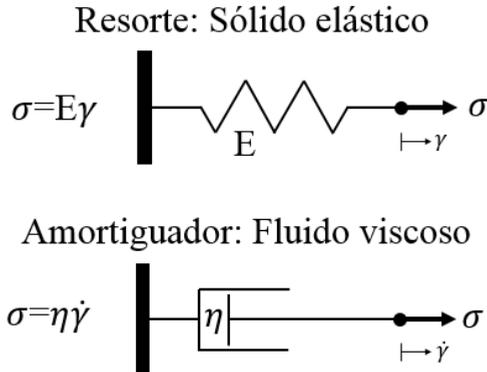


Figura 3.15: Los resortes representan la parte elástica y los amortiguadores la parte viscosa en los comportamientos de los materiales [107].

$$\sigma = \sigma(\gamma, \dot{\gamma}).$$

De esta forma podemos ver que el esfuerzo no es solo función de la deformación (sólido elástico) sino también de la tasa de deformación (fluido viscoso) donde existe una dependencia temporal.

Una de las formas más sencillas de modelos empíricos se obtiene conectando un resorte con un amortiguador en paralelo o en serie.

3.5.1. Modelo de Kelvin-Voigt

El modelo de Kelvin-Voigt se obtiene al conectar un resorte y un amortiguador en paralelo (Figura 3.16). En este modelo, el esfuerzo total aplicado estará compartido por ambos componentes tal que:

$$\sigma = \sigma_r + \sigma_a, \quad (3.25)$$

donde los subíndices r y a denotan resorte y amortiguador, respectivamente. Al aplicarse el esfuerzo, el resorte y el amortiguador se deformarán de la misma forma debido a su arreglo en paralelo. Por lo tanto, la deformación γ del sistema será igual para ambos componentes, es decir,

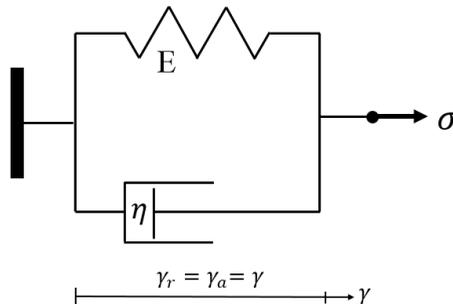


Figura 3.16: Modelo de Kelvin-Voigt que está compuesto de un resorte y un amortiguador acomodados en paralelo [107].

$$\gamma = \gamma_r = \gamma_a. \quad (3.26)$$

De las relaciones de esfuerzo-deformación para cada uno de los componentes obtendremos:

$$\sigma = E\gamma + \eta\dot{\gamma}. \quad (3.27)$$

De forma alternativa tenemos que,

$$\sigma = E\gamma + \eta\frac{d\gamma}{dt}. \quad (3.28)$$

Y obtenemos una ecuación diferencial de primer orden para γ .

3.5.2. Modelo de Maxwell

El modelo de Maxwell está compuesto de un resorte y un amortiguador conectados en serie (Figura 3.17). En este caso, el esfuerzo aplicado es sobre el sistema completo, es decir

$$\sigma = \sigma_r = \sigma_a, \quad (3.29)$$

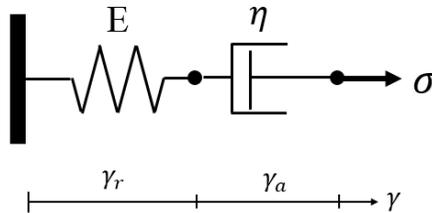


Figura 3.17: Modelo de Maxwell que consta de un resorte y un amortiguador en serie [107].

y la deformación resultante está dada por:

$$\gamma = \gamma_r + \gamma_a. \quad (3.30)$$

En este caso derivamos γ_r y sustituimos los valores en las deformaciones $\dot{\gamma}_r$ y $\dot{\gamma}_a$ y obtenemos:

$$\dot{\gamma} = \frac{\dot{\sigma}}{E} + \frac{\sigma}{\eta}.$$

Nuevamente obtenemos una ecuación lineal de primer orden que puede ser resuelta para σ o para γ . Ya que las respuestas reológicas están determinadas por un tiempo característico, definimos:

$$\tau = \frac{\eta}{E}. \quad (3.31)$$

Esto reduce las ecuaciones a la forma:

$$\eta\dot{\gamma} = \tau\dot{\sigma} + \sigma. \quad (3.32)$$

Es importante notar que este comportamiento puede seguirse tanto para una reología de compresión como para una reología de cizallamiento en cuyo caso, E cambia por G .

Solución del modelo de Maxwell (caso oscilatorio)

En esta sección trataremos como caso especial la deformación de cizallamiento puro. Muchos aparatos experimentales desarrollan mediciones a partir de perturbaciones oscilatorias del sistema, en estos sistemas la deformación oscilatoria es:

$$\begin{aligned} \gamma &= \gamma_0 e^{i\omega t}, \\ \dot{\gamma} &= i\omega\gamma_0 e^{i\omega t}. \end{aligned}$$

Con esto, la ecuación 3.32 se convierte en:

$$\tau \dot{\sigma} + \sigma = i\omega\eta\gamma_0 e^{i\omega t}. \quad (3.33)$$

Si resolvemos esta ecuación, obtenemos como solución

$$\sigma = \frac{\eta\gamma_0\omega(i + \omega\tau)e^{i\omega t}}{1 + \tau^2\omega^2}.$$

El módulo de cizallamiento G está definido como el cociente entre el esfuerzo de cizallamiento y la deformación,

$$G(\omega) = \frac{\sigma(\omega)}{\gamma(\omega)}. \quad (3.34)$$

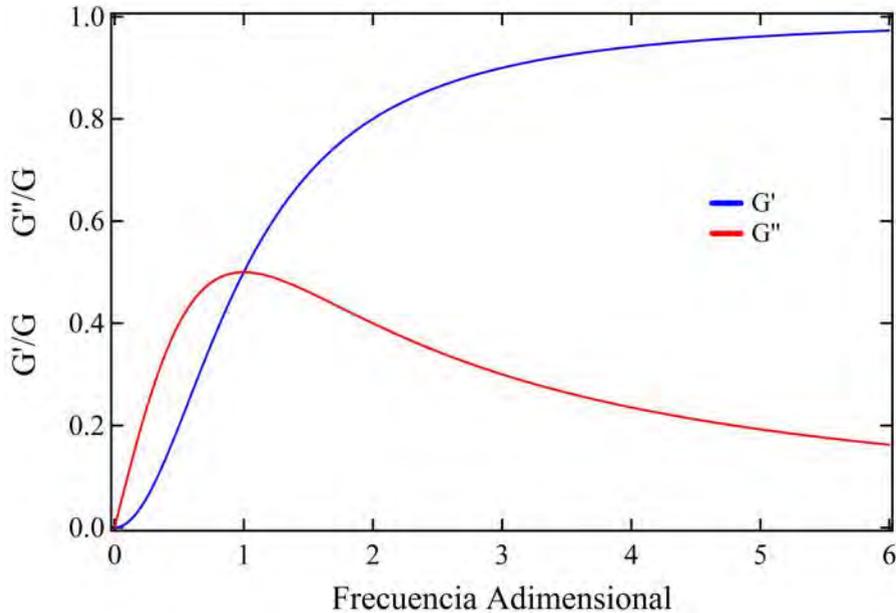


Figura 3.18: Solución al modelo de Maxwell a partir de las ecuaciones 3.36 y 3.37 para el caso de reología de cizallamiento. Los elementos del eje y están normalizados y $\tau = 1$.

El cual en general es una cantidad compleja dependiente de la frecuencia ω . Así, teniendo en cuenta que la deformación es oscilatoria, y la definición del tiempo característico (Ec. 3.31) tenemos que

$$G(\omega) = \frac{G\tau\omega(i + \tau\omega)}{(1 + \tau^2\omega^2)}, \quad (3.35)$$

cuya parte real e imaginaria son, respectivamente:

$$G'(\omega) = G \frac{\tau^2\omega^2}{1 + \tau^2\omega^2} \quad (3.36)$$

$$G''(\omega) = G \frac{\tau\omega}{1 + \tau^2\omega^2} \quad (3.37)$$

En la Figura 3.18 se grafican las soluciones a G' y G'' normalizadas con G , en este caso se aprecia un comportamiento dominado por el módulo viscoso a bajas frecuencias y uno dominado por el módulo elástico a altas frecuencias de deformación.

Capítulo 4

Materiales y métodos experimentales

4.1. Materiales

En este trabajo de tesis se usaron lípidos obtenidos de Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaste, AL, EUA). Los siguientes lípidos cuentan con una cabeza polar compuesta de fosfatidilcolina (Figura 4.1 izquierda):

1. 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (POPC).
2. 1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (DMPC).
3. 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (DPPC).
4. 1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (DSPC).

Los siguientes lípidos cuentan con una cabeza polar compuesta de fosfatidiletanolamina, que tiene un tamaño menor a la de fosfatidilcolina (Figura 4.1 derecha):

1. 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine (POPE).
2. 1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine (DMPE).
3. 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine (DPPE).

Fueron recibidos en forma de polvo con una pureza de 99 % y almacenados a -20°C . Sus propiedades químicas y físicas se resumen el Cuadro 4.1. Para preparar las soluciones de lípidos se utilizó cloroformo obtenido de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

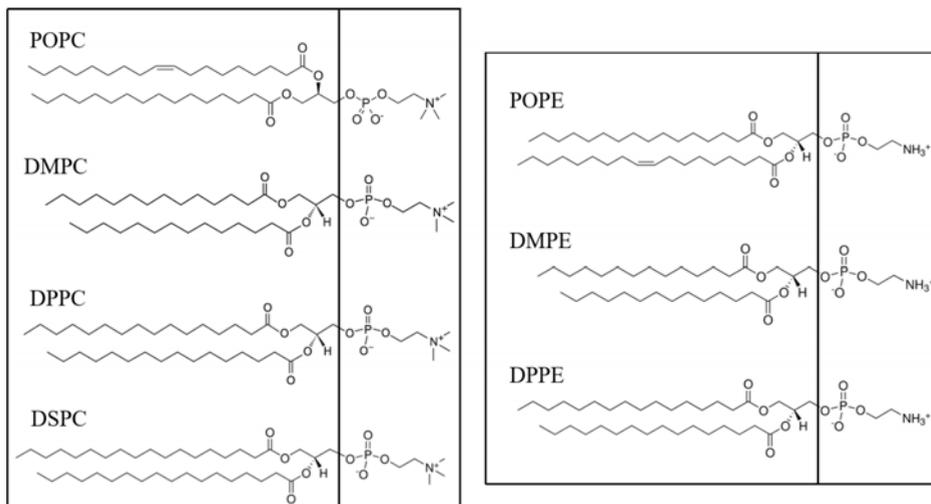


Figura 4.1: Estructura molecular de los fosfolípidos utilizados en esta tesis

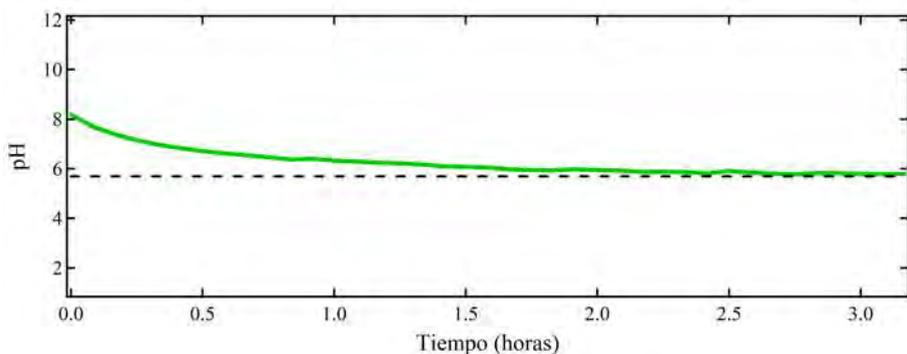


Figura 4.2: Cambio en el pH de agua ultrapura durante un intervalo de 3 horas con 15 minutos, el valor en el cual se estabiliza es 5.7.

| Nombre | No. de carbonos: dobles enlaces | $T_m(^{\circ}C)$ | MW |
|--------|------------------------------------|------------------|---------|
| POPC | 16:0, 18:1 | -2 | 760.076 |
| DMPC | 14:0 | 24 | 677.933 |
| DPPC | 16:0 | 41 | 734.039 |
| DSPC | 18:0 | 55 | 790.145 |
| POPE | 16:0, 18:1 | 25 | 717.996 |
| DMPE | 14:0 | 50 | 635.453 |
| DPPE | 16:0 | 63 | 691.959 |

Cuadro 4.1: Propiedades químicas y físicas de los lípidos. T_m se refiere al punto de fusión y MW al peso molecular.

Nanopartículas de PGLA recubiertas con una coraza de oro y funcionalizadas con albumina de bovino fueron sintetizadas por Diego Gómez Maldonado en su trabajo de tesis de maestría en Ingeniería Biológica en la Universidad Autónoma Metropolitana, Campus Cuajimalpa.

El agua ultrapura utilizada para la subfase de los experimentos con grado Mili-Q con alta resistividad ($18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) fue obtenida mediante procesos de purificación usando un equipo Millipore (Milli-Q IQ 7000, Merck). Es importante mencionar que los dos grupos de lípidos utilizados son zwitteriónicos en el rango de pH entre 5 y 9, por lo tanto no es necesario utilizar soluciones amortiguadoras para mantener constante el pH de la subfase para el agua ultrapura (ver figura 4.2).

4.2. Métodos experimentales

Al tratarse de procesos estadísticos, la mayoría de los experimentos fueron realizados al menos por triplicado.

4.2.1. Deposición y formación de las monocapas

Los lípidos son preparados en solución de cloroformo a una concentración 1 mg/ml. Una vez en solución son depositados en la superficie de agua gota a

gota (Figura 4.3), debido a la tensión superficial del agua la solución no se va al volumen. Se depositan 20 μl de solución utilizando una microjeringa (Hamilton, Gastight serie 1800, 50 μl), ver figura 4.4, y se deja equilibrar y a que se evapore el solvente orgánico durante 20 a 30 minutos.

Cuando se deposita el material en la superficie del agua, se distribuye por toda la superficie hasta que la presión sube hasta un valor de equilibrio (alrededor de 1.5 mN/m). Esta presión de equilibrio (Π_e) está definida como la presión generada espontáneamente cuando el material que se esparce (sin tomar en cuenta el solvente) es puesto en contacto con el agua superficial [108]. Cuando $\Pi < \Pi_e$, la monocapa es estable, pero cuando $\Pi > \Pi_e$ la monocapa puede tomar una de las fases descritas en la sección 1.5.

4.2.2. Determinación de la presión superficial

Para comenzar con la caracterización de las monocapas es necesario conocer la presión superficial. Para esto usaremos un método que se basa en la

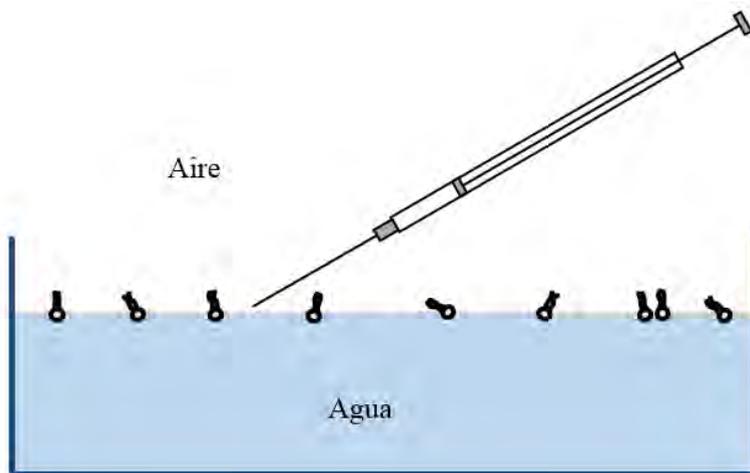


Figura 4.3: Deposición de lípidos en la intercara aire-agua usando una microjeringa. La deposición se hace gota a gota y con deposiciones cercanas a la superficie para evitar que el material se vaya al volumen.

medición directa de la fuerza que se necesita para mantener un objeto en la intercara. Esta fuerza tiene contribuciones gravitacionales y capilares.

Método de la placa de Wilhelmy

Este método es atribuido a Wilhelmy [109] en 1863. El objetivo principal de este método es que una placa delgada es suspendida de un tensiometro y es acercado a la superficie del agua hasta tocarla, lo cual formará un menisco alrededor de ella (Figura 4.5), en este método tendremos un sistema de fuerzas que actúan sobre la placa. Así, la fuerza total estará dada por el peso de la placa y la fuerza debida al efecto capilar, es decir:

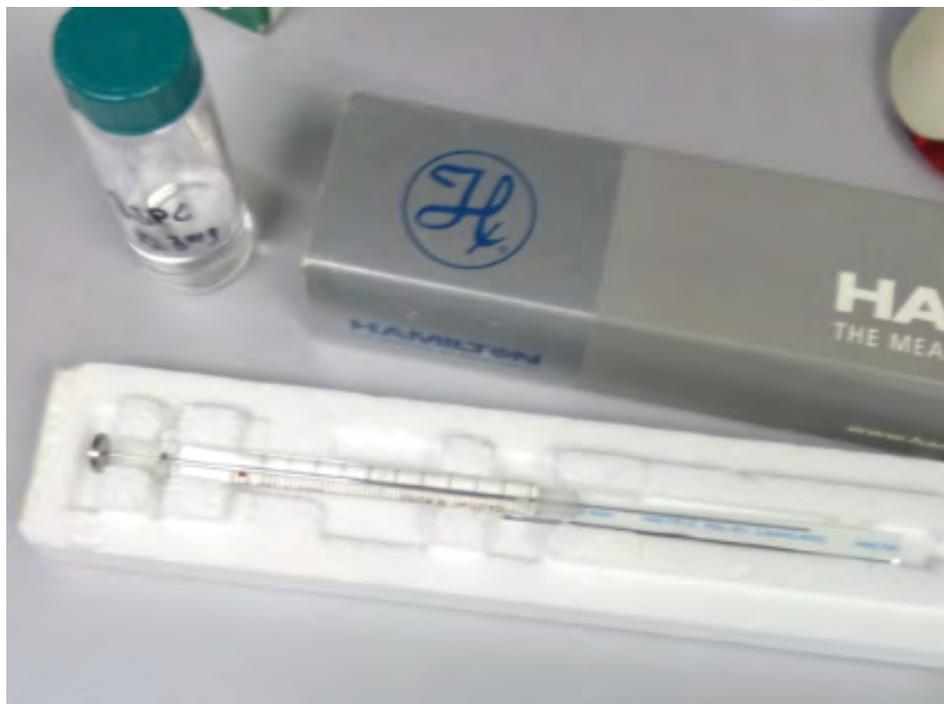


Figura 4.4: Microjeringa Hamilton utilizada para depositar la solución de lípidos en la intercara aire-agua.

$$F_{tot} = W_{placa} - \gamma P \cos(\theta) \quad (4.1)$$

donde P es el perímetro de la placa que está en contacto con el agua y γ es la tensión superficial. Al bajar la placa hasta la superficie y dejarla estática, tenemos una fuerza total debida al empuje que sufre la placa hacia arriba, en consecuencia el peso de la placa se verá afectado cambiando la tensión en la microbalanza (ΔW), así obtenemos para la tensión superficial medida:

$$\gamma = \frac{\Delta W}{P \cos(\theta)} \quad (4.2)$$

El ángulo de contacto θ (Figura 4.6) puede ser medido en el mismo experimento [110] mediante:

$$\left(\frac{h}{a}\right)^2 = 1 - \text{sen}(\theta) \quad (4.3)$$

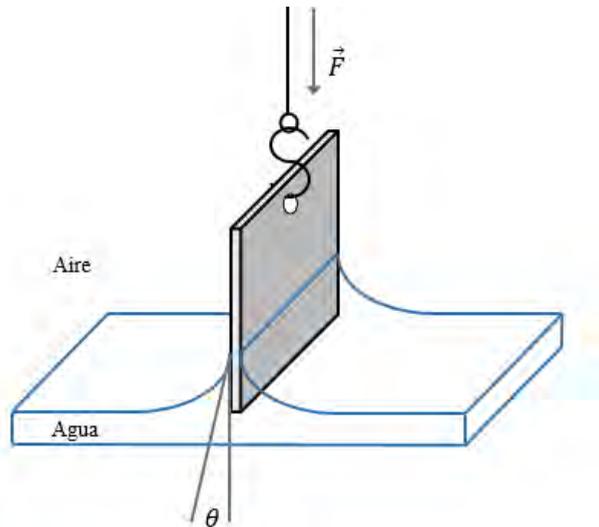


Figura 4.5: Efecto de capilaridad sobre la placa de Wilhelmy. Vista general y detalles del menisco formado con la placa.

Donde h es la altura hasta el tope del menisco sobre el nivel del agua y a es la longitud capilar del agua definida como $a = \sqrt{\gamma/\Delta\rho g}$, con ρ la densidad del agua. En este caso si el agua moja completamente la placa, el ángulo de contacto es cero y la ecuación 4.2 se reduce:

$$\gamma = \frac{\Delta W}{P} \quad (4.4)$$

De esta forma, se puede medir de una forma sencilla la presión superficial. Cuando el volumen de la muestra es disminuido es posible usar una placa con un perímetro más pequeño o un rodillo para evitar que los bordes de la placa se acerquen a las orillas del recipiente donde se contiene la muestra y evitar efectos de borde en las mediciones. La precisión en las mediciones de la tensión superficial se verán afectadas por la geometría del tensiómetro, siendo mayor el porcentaje de error con el rodillo [111].

4.2.3. Isotermas y compresibilidad

Para obtener isotermas en dos dimensiones se utiliza comúnmente la palangana de Langmuir (Figura 4.7) en nuestros experimentos se utilizaron dos modelos (KN3003, KSV-Nima). Muchos materiales que se usaban para fabricar las palanganas tendían a filtrar las moléculas superficialmente

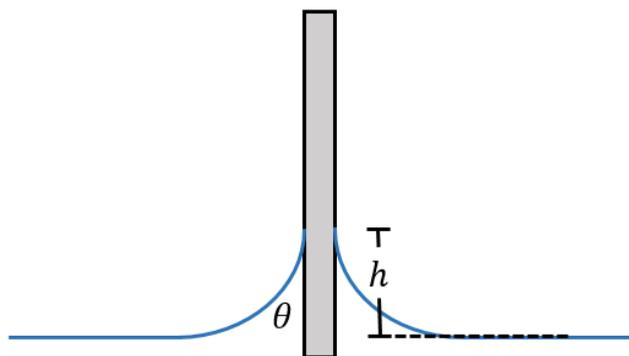


Figura 4.6: Perfil de un menisco formado por un líquido.

activas en la subfase y a través del material. La mayoría de las palanganas hoy en día son hechas de dos formas para garantizar que los sistemas estén libres de impurezas que modifiquen las mediciones:

1. Teflon (politetrafluoroetileno) no filtra el material y puede comprarse en bloques, hojas, y rodillos de varios espesores.
2. Vidrio de borosilicato.

En nuestro caso, la palangana está hecha de teflón y tiene las siguientes características (KN3003):

1. Área superficial: 273 cm^2 .

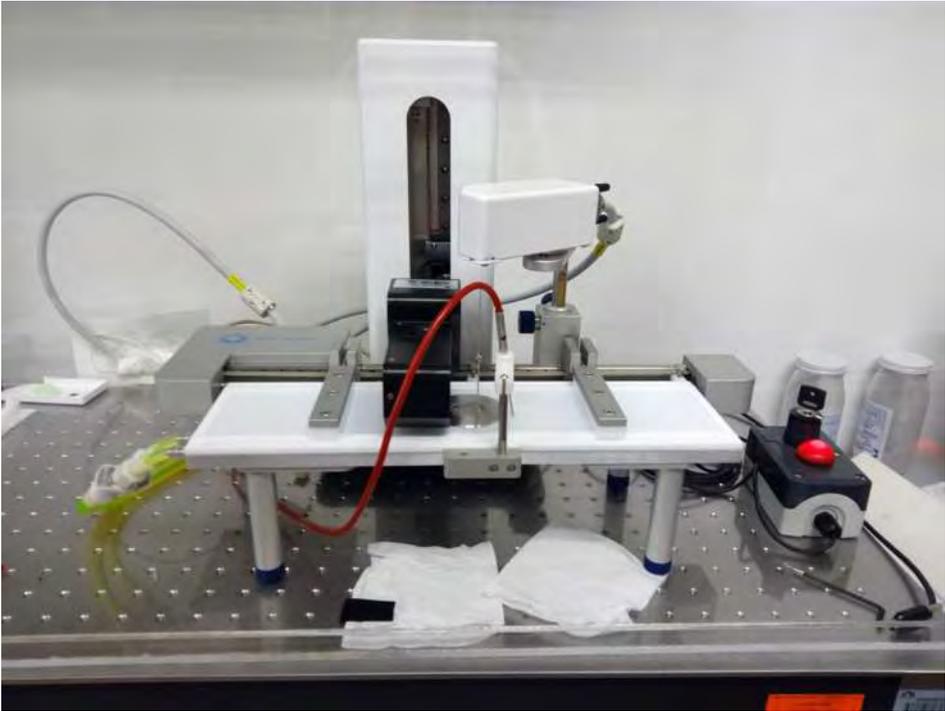


Figura 4.7: Palangana de Langmuir con un microscopio de ángulo de Brewster adaptado y conectada a un recirculador para mantener la temperatura constante.

2. Volumen de la subfase: 109 *ml*.
3. Dimensiones internas: 364 $mm \times 75mm \times 4mm$.
4. Par de barreras hidrofílicas que comprimen el material a diferentes velocidades.

Para comenzar los experimentos es necesario un alto grado de limpieza de los aparatos, esto se logra de la siguiente forma:

1. Enjuagar la palangana con etanol para remover impurezas en el teflon. Remover el etanol con toallas libres de pelusa (Kimwipes, Kimtech).
2. Enjuagar la palangana con cloroformo el cual por su naturaleza solvente ayuda a remover partículas y moléculas adheridas en el teflon. Remover el cloroformo con toallas libres de pelusa (Kimwipes, Kimtech).
3. Enjuagar nuevamente con etanol para remover cualquier rastro de polvo y partículas. Remover el etanol con toallas libres de pelusa (Kimwipes, Kimtech).
4. Enjuagar con agua MQ varias veces.

Estos procesos de limpieza deben llevarse a cabo con mucho cuidado para evitar raspar el teflón, las raspaduras crean espacios donde moléculas y partículas pueden quedar atrapadas y el proceso de remoción será más complicado después de cada experimento. Para evitar que la palangana se contamine por cualquier contacto con el ambiente y para evitar que las corrientes de aire del laboratorio modifiquen las mediciones una forma de lograrlo es colocando la palangana en un cuarto limpio y encerrada en una caja cerrada de acrílico. Es necesario utilizar guantes de nitrilo además de una bata plástica para no contaminar con polvo alguna parte del equipo.

Los procesos isotérmicos implican que la temperatura debe ser constante por lo cual es necesario conectar la palangana a un recirculador refrigerado (Thermo Scientific, ARCTIC A25, 12 litros, -25°C a 200°C), la temperatura es medida con un termopar incorporado en la palangana. Debido a que las perturbaciones mecánicas tienen un impacto directo en las

mediciones, la configuración del sistema se hizo sobre una mesa antivibratoria activa (Accurion, Vario Basic 40).

La característica básica de las monocapas en la intercara aire-agua es la isoterma, que dan información sobre el estado termodinámico de las moléculas en la monocapa y se observa mediante una gráfica de la presión superficial, Π , contra el área por molécula lograda al comprimir lateralmente la monocapa a una velocidad constante (en nuestro caso 5 mm/min) mientras se registra la presión superficial (en la Figura 4.8 se muestra una isoterma típicas de DPPC). Siendo así el, análogo bidimensional de las isotermas tridimensionales de presión contra volumen. El área por molécula puede calcularse de la concentración de la solución que se deposita, la cantidad depositada, el peso molecular y el área en la cual se confina la monocapa.

Caracterizamos el comportamiento mecánico de la monocapa por medio de su módulo de compresibilidad, E , definida en la sección 2.2.1. Este

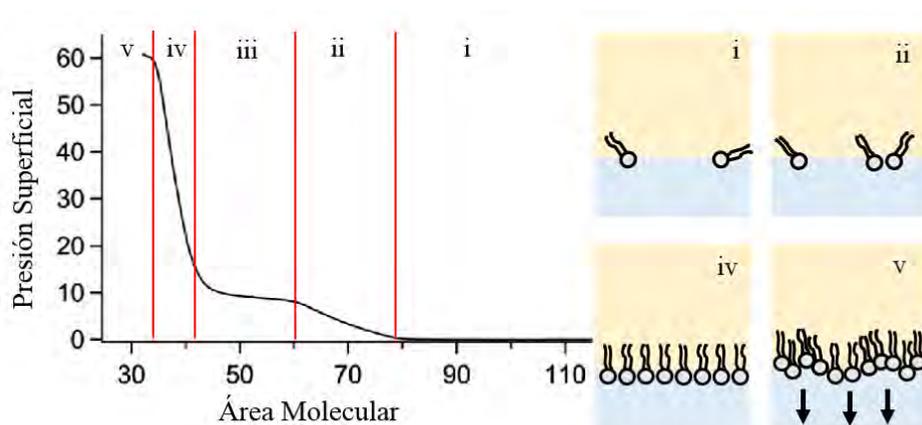


Figura 4.8: Formas típicas de isotermas en las cuales aumenta la presión al comprimirse el material, tales isotermas usualmente corresponden a cambios conformacionales en el material mientras la presión incrementa (Imagen adaptada de [112]).

módulo da información sobre la compresión lateral de la monocapa. Así, mientras más altos valores del módulo de compresibilidad, se necesita una mayor energía para comprimir la monocapa. Por lo que valores pequeños indican que la monocapa es más fácil de comprimir.

4.2.4. Microscopia de ángulo de Brewster

En 1991 el microscopio de ángulo de Brewster (BAM, Elli2000, Nanofilm Technologie GmbH, Alemania, Figura 4.9) fue introducido de forma independiente por dos grupos [113, 114]. La microscopia de ángulo de Brewster aprovecha el comportamiento reflectivo de la luz en la intercara. Este método se basa en el hecho de que un rayo de luz que pasa de un material de menor índice de refracción, n_0 , a otro de índice de refracción mayor, n_1 , tendrá la componente paralela del campo electromagnético polarizada a un ángulo definido por $\theta_B = n_1/n_0$ (Figura 4.10 izquierda), este ángulo es conocido como ángulo de Brewster [115]. La reflectividad cerca del ángulo

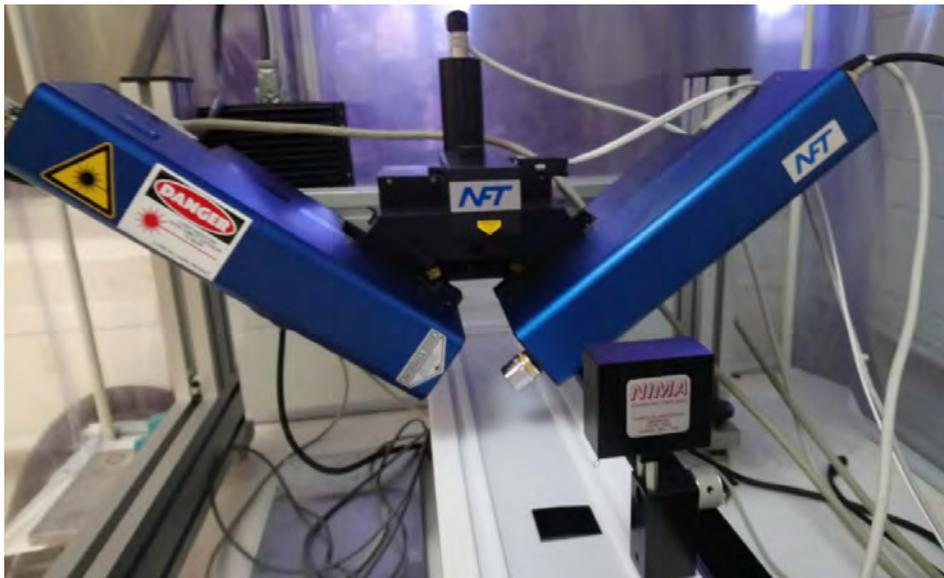


Figura 4.9: Microscopio de ángulo de Brewster (azul) adaptado a la palanquilla de Langmuir (Elli2000, Nanofilm Technologie GmbH, Alemania).

de Brewster es:

$$\frac{I_p(\theta)}{I_0(\theta)} = R_p = |r_p|^2 = \left[\frac{\tan(\theta_0 - \theta_1)}{\tan(\theta_0 + \theta_1)} \right]^2 \quad (4.5)$$

Depende del ángulo de incidencia, θ_0 , y el ángulo de refracción, θ_1 , relacionado a través de la ley de Snell ($n_0 \sin \theta_0 = n_1 \sin \theta_1$). Al agregar una pequeña capa de moléculas a la intercara crea múltiples reflexiones en la intercara aire-monocapa (01) y en la intercara agua-monocapa (12), produciendo una reflectividad dada por

$$R = \frac{r_{01} + r_{12}e^{-2i\beta}}{1 + r_{01}r_{02}e^{-2i\beta}} \quad (4.6)$$

Que depende del índice de refracción de la monocapa, n_1 , y del espesor, d , a través de $\beta = (2\pi dn_1/\lambda) \cos \theta_1$. Por lo tanto, operar un microscopio de

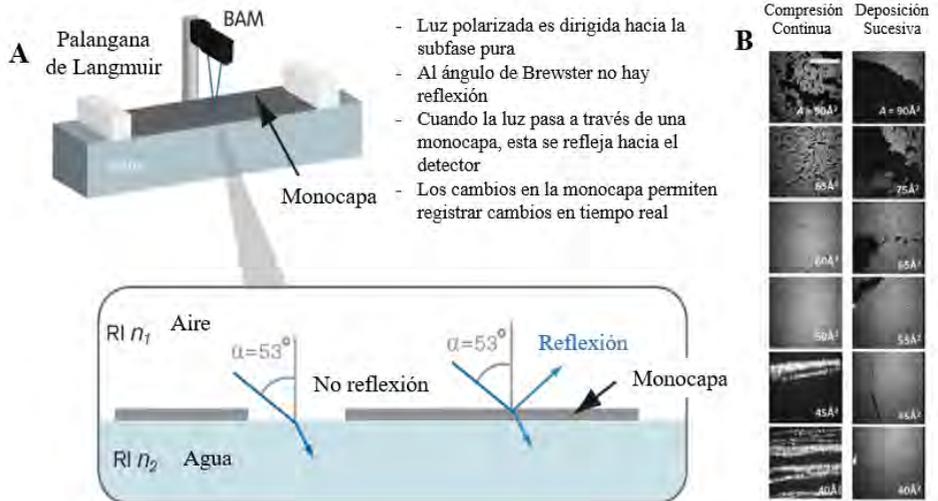


Figura 4.10: A. Ángulo de Brewster en el cual la luz se polariza. B. Imágenes de BAM [28].

ángulo de Brewster en el ángulo de Brewster para una intercara aire-agua limpia permite obtener imágenes de la monocapa; el brillo de la luz reflejada incrementará con n_1 y d [116]. Mediante el análisis de las anisotropías ópticas observadas en la despolarización de la luz reflejada se puede obtener información sobre la inclinación de las moléculas [117, 118].

La microscopia de ángulo de Brewster ha sido ampliamente usada para estudiar las características morfológicas y la formación de dominios (Figura 4.10 derecha) en la región de coexistencia LE-LC y para observar y analizar los diagramas de fase en las monocapas de Langmuir [119, 120].

4.2.5. Reología de compresión oscilatoria

La reología de compresión oscilatoria dentro del régimen de viscoelasticidad lineal debe realizarse a bajas deformaciones (menos de 10 %). Los equipos comerciales pueden trabajar en dos modos:

1. Deformación a velocidad controlada, en los cuales se fija la deforma-

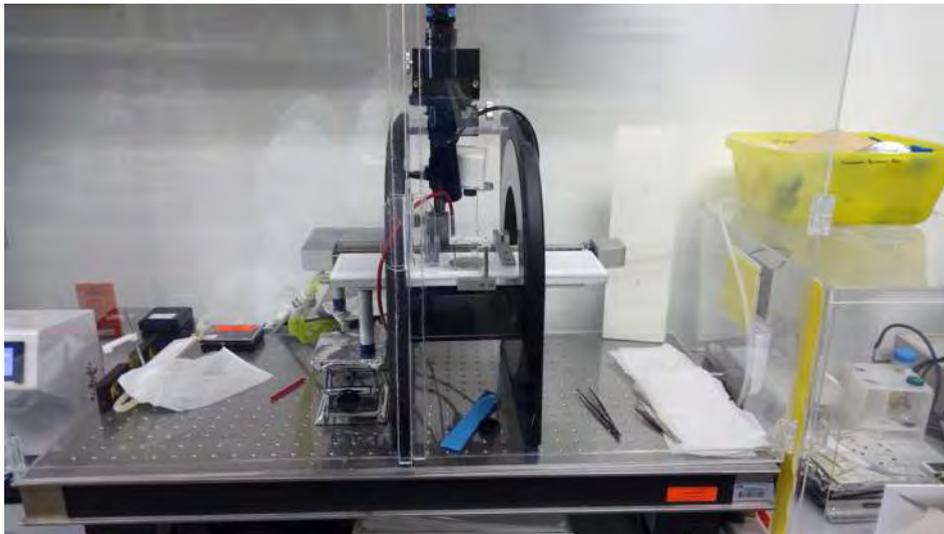


Figura 4.11: Configuración de la palangana de Langmuir para compresiones oscilatorias.

ción y se mide el esfuerzo.

2. Esfuerzo controlado, en los que se fija la amplitud del esfuerzo y se mide la deformación.

En nuestro caso de compresión oscilatoria, el equipo está en modo de deformación a velocidad controlada, donde se escoge la velocidad a la que se mueven las barreras y el esfuerzo se mide con los cambios de presión superficial monitoreados con la microbalanza y el rodillo de platino. Para una adecuada descripción a través de las ecuaciones matemáticas se asume que la deformación es igual en todos los puntos de la muestra, es decir, la inercia de la muestra es despreciable y se cumplen las condiciones de viscoelasticidad lineal.

Considerando que las barreras se mueven de manera sinusoidal, en unos

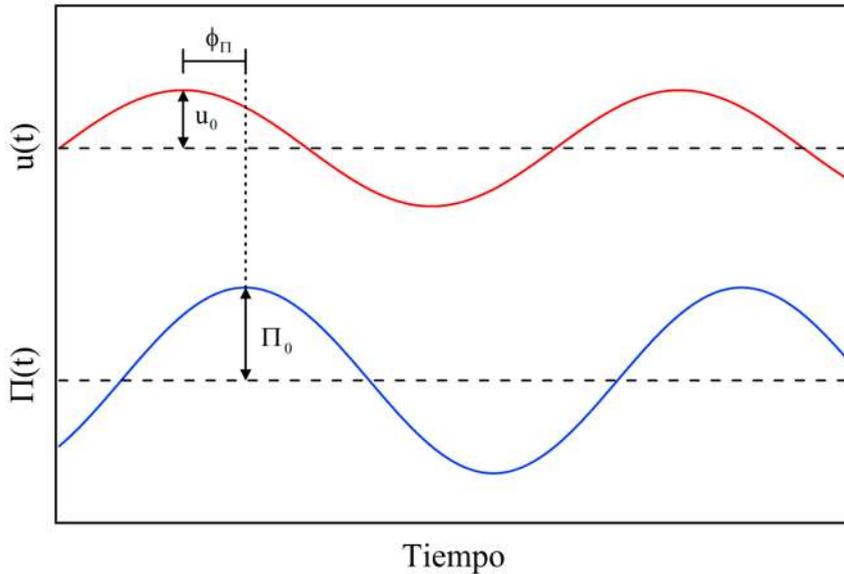


Figura 4.12: Componentes de la deformación y el esfuerzo oscilatorios y su diferencia de fase.

cuantos ciclos el esfuerzo también debe variar de forma sinusoidal, a la misma frecuencia que la deformación pero desplazada por una fase ϕ_{Π} (Figura 4.12). Matemáticamente podemos expresar el cambio de área en el tiempo como

$$A(t) = A_0 + u_0 \text{sen}(\omega t)$$

Donde u_0 es la amplitud de la deformación. De esta ecuación podemos definir la deformación en función del tiempo como

$$u(t) = u_0 \text{sen}(\omega t) \quad (4.7)$$

Mientras las barreras oscilan, el cambio en la respuesta mecánica es monitoreado por los cambios en la presión superficial, los cuales presentarán una respuesta sinusoidal dentro del régimen de viscoelasticidad lineal dado por

$$\Pi(t) = \Pi_0 + \Delta\Pi \text{sen}(\omega t + \phi_{\Pi}) \quad (4.8)$$

Donde Π_0 es la presión a un estado de empaquetamiento fijo, impuesto por las condiciones iniciales justo antes de comenzar la medición, y ϕ_{Π} es el factor de fase relacionado con el retraso en la respuesta del material debido a la fricción impuesta por la viscosidad. En el mismo régimen, el esfuerzo σ es proporcional a la deformación ($u(t)$)

$$\sigma(t) = E u(t) \quad (4.9)$$

Donde $E = |E^*| = \sqrt{E'^2 + E''^2}$ es el módulo viscoelástico, E^* es un número complejo cuya parte real E' representa el módulo de almacenamiento interfacial que está relacionado con el comportamiento elástico del material y E'' representa el módulo de pérdidas relacionado con el comportamiento viscoso. En el análisis oscilatorio el esfuerzo sobre la monocapa es la diferencia entre la presión superficial del estado sin deformar Π_0 y el estado estresado $\Pi(t)$,

$$\sigma(t) = \sigma_0 \text{sen}(\omega t + \phi_{\Pi}) \quad (4.10)$$

la amplitud de esfuerzo, σ_0 , es obtenida experimentalmente de la amplitud de la presión superficial, $\Delta\Pi$. De esta forma E' y E'' son calculados de la siguiente forma:

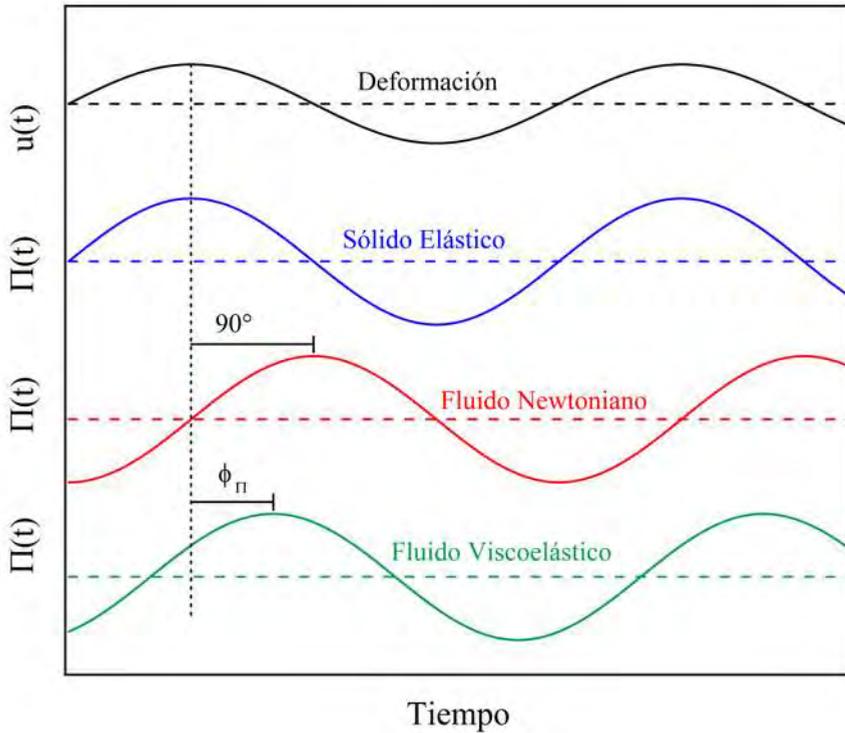


Figura 4.13: Esquema fundamental de las respuestas a las mediciones de reología oscilatoria.

$$E' = \frac{\sigma_0}{u_0} \cos \phi_{\Pi} \quad (4.11)$$

$$E'' = \frac{\sigma_0}{u_0} \operatorname{sen} \phi_{\Pi} \quad (4.12)$$

Si expandimos la ecuación 4.10 usando identidades trigonométricas podemos ver que

$$\begin{aligned} \sigma(t) &= \sigma_0 [\operatorname{sen}(\omega t) \cos(\phi_{\Pi}) + \cos(\omega t) \operatorname{sen}(\phi_{\Pi})] \\ &= [\sigma_0 \cos(\phi_{\Pi})] \operatorname{sen}(\omega t) + [\sigma_0 \operatorname{sen}(\phi_{\Pi})] \cos(\omega t) \end{aligned}$$

En esta ecuación podemos observar que hay una parte del esfuerzo que está en fase con la deformación impuesta (Ec. 4.7) y la otra parte en fase con la velocidad de deformación impuesta (derivada de la Ec. 4.7). Esta observación está en concordancia con las leyes de Newton y de Hooke para materiales viscosos y elásticos.

Para un sólido elástico ideal (Hookeano), el esfuerzo de compresión debe estar en fase con la deformación aplicada y para un fluido viscoso ideal (Newtoniano) el esfuerzo está desfasado por 90° . Mientras que para un fluido viscoelástico el esfuerzo debe tener un desfase con un valor entre 0 y 90° (Figura 4.13).

4.2.6. Reología de cizallamiento oscilatoria

Para el estudio de las propiedades de cizallamiento en la intercara utilizamos un reómetro interfacial de cizallamiento (KSV-Nima, ISR, rango de frecuencias de 0.01-10 rad/s, amplitudes de deformación de 3×10^{-4} -1 y resolución del módulo dinámico de 0.0001 mN/m) para medir las propiedades de un fluido complejo como función de la tasa de cizallamiento o deformación $\dot{\gamma}$, o de la frecuencia a la cual se impone la deformación. Por lo tanto, la reología de cizallamiento interfacial involucra cizallar la intercara y medir el esfuerzo resultante debido a la deformación impuesta.

El éxito de una técnica reométrica depende de su habilidad de medir las contribuciones del esfuerzo de la intercara en presencia de las contribuciones

de la subfase. Las contribuciones relativas de estas magnitudes a menudo se describen en términos del número de Boussinesq B_0 (Ápndice A) [121]. Mientras más grande sea su valor para algún instrumento reométrico más sensibles son sus mediciones de esfuerzos interfaciales. En los primeros experimentos se suponía que se podía deducir la parte interfacial simplemente con una diferencia entre el esfuerzo medido en una intercara con material adsorbido y con una intercara limpia. Sin embargo, se ha mostrado que esto es incorrecto debido al acoplamiento hidrodinámico entre la intercara y la subfase.

Existen varios tipos de reómetros, en este caso se usó uno que se basa en

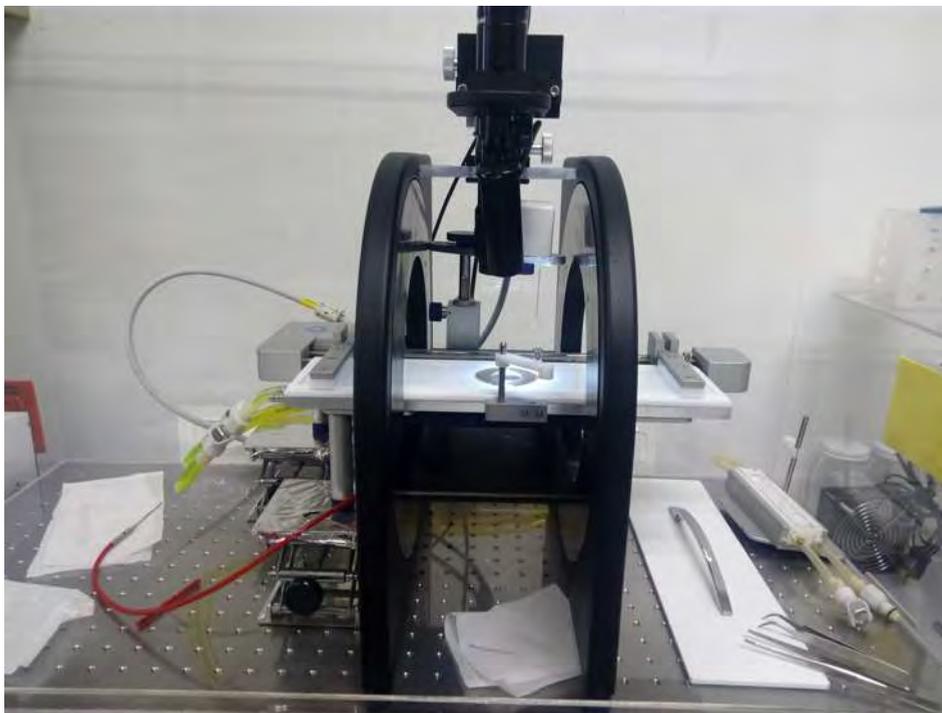


Figura 4.14: Palangana de Langmuir (KN 3003) adaptada con un reometro interfacial de cizallamiento magnético (ISR), que cuenta con un par de bobinas de Helmholtz.

el movimiento de una aguja magnética sobre la intercara movida mediante el campo magnético generado por un par de bobinas de Helmholtz (Figura 4.14) [122, 123]. Para que las respuestas obtenidas en los experimentos sean en su mayoría una contribución de la parte interfacial se usó una aguja magnética que consta de un capilar de vidrio hueco con una longitud de 23.13 mm y un diámetro de 0.4 mm, el cual contiene un núcleo magnético uniaxial con una masa total de 7.3 mg. Para llevar acabo los experimentos, se tiene que seguir una serie de pasos:

1. Se debe enjuagar la aguja magnética con agua (tipo Milli-Q), después enjuagar en etanol y por último dejarla suavemente en una caja de petri con de agua MQ limpia sobre la cual la aguja no tendrá resistencia externa al movimiento (no hay impurezas).
2. Se coloca un canal de vidrio sobre la palangana, el cual servirá de guía para la aguja debido a la formación de un menisco al llenar la palangana de agua (Figura 4.15).
3. Se hace la deposición de la monocapa.
4. Inmediatamente después se coloca la aguja de manera cuidadosa sobre



Figura 4.15: Aguja magnética colocada en la superficie del menisco formado sobre el canal al llenar de agua la palangana, la aguja debe quedar de manera paralela al canal para evitar efectos de borde.

la superficie que se formó sobre el canal de forma que la aguja esté paralela al canal, esto asegura una geometría de flujo uniforme.

Una vez colocada la aguja y formada la monocapa se comienzan las mediciones de esfuerzo controlado. En estas, se genera un campo magnético de la forma:

$$B = \frac{\mu_0 I R^2}{2(R^2 + x^2)^{3/2}} \quad (4.13)$$

el cual interactúa con la aguja creando una fuerza dada por

$$F_m = \eta \left(\frac{dB}{dx} \right) \quad (4.14)$$

que la mueve se manera sinusoidal debido a la corriente alterna introducida a las bobinas. El movimiento de la aguja es seguido por medio de video-microscopía, el cual es analizado siguiendo los patrones de intensidad de la aguja magnética. De esta forma se obtiene su movimiento el cual está relacionado directamente con la deformación de la monocapa (Figura 4.16).

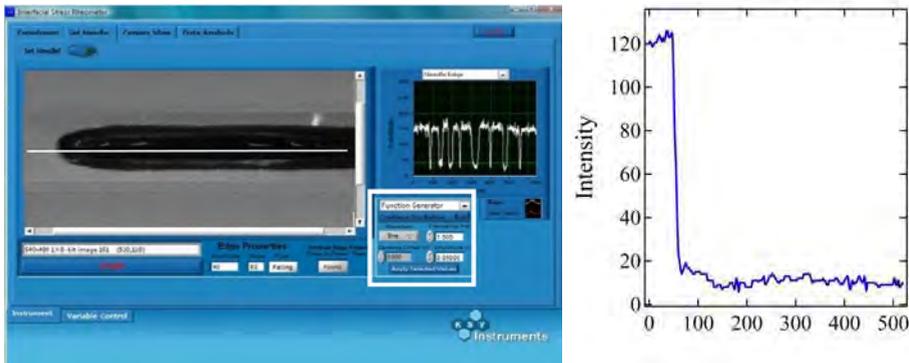


Figura 4.16: Izquierda. Imagen de la aguja desde el software la línea blanca muestra los pixeles analizados para determinar la posición de la aguja. Derecha. Perfil de intensidad de la línea blanca.

Al igual que en el caso de la compresión oscilatoria tendremos un desfase entre el esfuerzo aplicado y la deformación medida. De esta forma la fuerza transferida a la aguja que se traduce en un esfuerzo sobre la monocapa es

$$\sigma(t) = \sigma_0 \text{sen}(\omega t) \quad (4.15)$$

Con ω la frecuencia de oscilación y σ_0 la amplitud del esfuerzo. De donde podemos obtener el módulo viscoelástico de cizallamiento como

$$\sigma_0 e^{i\omega t} = G^*(\omega) \gamma_0 e^{i[\omega t - \delta(\omega)]} \quad (4.16)$$

Donde γ_0 es la amplitud de la deformación a la frecuencia dada, que en general se retrasa por una fase $\delta(\omega)$. De la ecuación 4.16 podemos observar que

$$G^*(\omega) = \frac{\sigma}{\gamma_0} e^{i\delta(\omega)} = G'(\omega) + iG''(\omega) \quad (4.17)$$

Donde el término en fase, $G'(\omega)$, es el módulo de almacenamiento relacionado con la parte elástica y $G''(\omega)$ es el módulo de pérdidas relacionado con la parte viscosa. De forma similar, podemos obtener la viscosidad dinámica $\mu(\omega)$, la cual se usa comúnmente para describir el comportamiento de fluidez de los materiales complejos

$$\mu(\omega) = \mu'(\omega) - i\mu''(\omega) = \frac{G^*(\omega)}{i\omega} = \frac{G''(\omega)}{\omega} - i\frac{G'(\omega)}{\omega} \quad (4.18)$$

Donde $\mu'(\omega)$ y $\mu''(\omega)$ son la parte real e imaginaria, respectivamente.

Capítulo 5

Resultados

5.1. Efecto de la cola hidrofóbica

En esta sección analizamos el efecto de la cola hidrofóbica en las monocapas formadas por lípidos puros a 25°C. Para este caso, sabemos que el número de carbonos en las colas hidrocarbonadas y el número de enlaces dobles está relacionado con la temperatura de fusión de las moléculas lipídicas de la siguiente manera:

1. Incrementar el número de carbonos aumenta la temperatura de fusión.
2. Incrementar el número de insaturación del lípido disminuye drásticamente la temperatura de fusión.

El primer punto está relacionado con el principio del punto de ebullición, el cual considera la energía necesaria para separar moléculas líquidas de sus vecinos más cercanos para formar moléculas de gas. El segundo punto está relacionado con la geometría de las moléculas, los ángulos de enlace tetrahédrico de lípidos saturados son relativamente más lineales (zigzag entre enlaces, ver figura 4.1) que los insaturados, lo cual les permite tener un mejor empaquetamiento, como resultado las interacciones moleculares son más cercanas lo cual incrementa las temperaturas de fusión. Los enlaces dobles promueven doblamientos en la molécula, estas geometrías no permiten un empaquetamiento cercano o favorable, por lo cual su temperatura

de fusión disminuye (Figura 5.1).

La temperatura de fusión también tiene impacto en el estado físico de la monocapa, es decir, si al comparar las isotermas de dos monocapas de lípidos, el punto de fusión es menor en una, la monocapa tendrá un comportamiento más fluido y se encontrarán áreas por molécula mayores que una monocapa de lípidos con punto de fusión mayor para una presión fija, tal como se muestra en las isotermas de la Figura 5.2 (izquierda).

En la Figura 5.2 (izquierda-arriba) se muestran las isotermas de cuatro fosfatidilcolinas en las cuales se incrementa el número de carbonos en las colas de DMPC (14), DPPC (16) a DSPC (18) y se tiene uno con dos colas de tamaño diferente (16 y 18) con una de ellas insaturada POPC. De acuerdo a lo anterior, podemos observar que la molécula insaturada cuya temperatura de fusión es menor (Cuadro 4.1) tiene áreas por molécula mayores a sus homólogas saturadas.

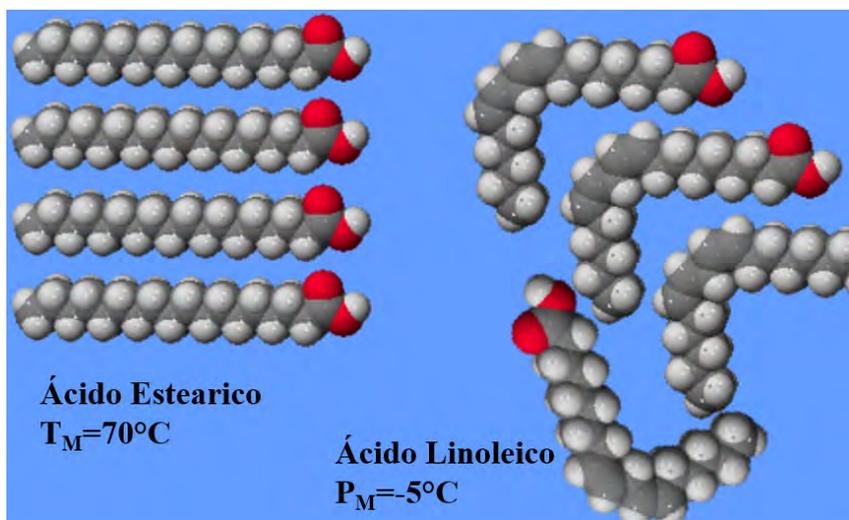


Figura 5.1: Representación del empaquetamiento de moléculas de ácido estearico y ácido linoleico con sus temperaturas de fusión.

De la misma Figura 5.2 (izquierda-abajo) se muestran las isothermas de tres fosfatidiletanolaminas. Donde nuevamente se ve un incremento en el área por molécula al incrementar la insaturación y al reducir el tamaño de la cola.

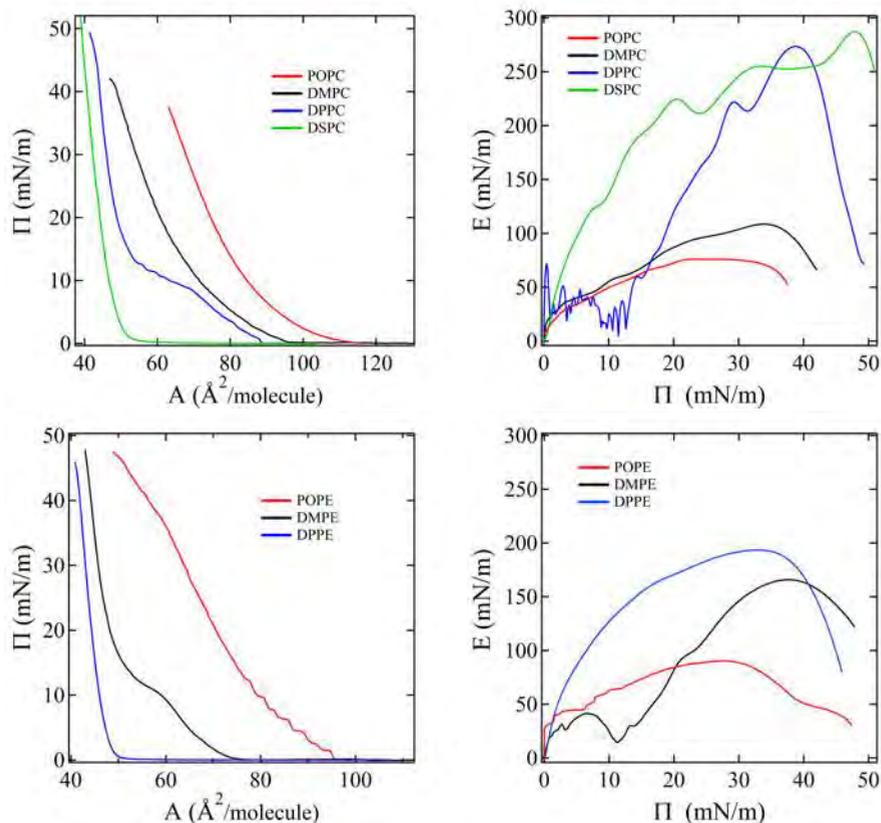


Figura 5.2: **Izquierda.** Se muestran las isothermas de lípidos a 25°C con la misma cabeza polar y diferentes colas hidrocarbonadas, arriba se encuentran las fosfatidilcolinas y abajo las fosfatidiletanolaminas. Se puede observar un incremento en el área por molécula al decrecer el número de átomos en la cola y el número de insaturación. **Derecha.** Compresibilidades obtenidas numéricamente de las isothermas.

Una vez que se han obtenido las isothermas, el siguiente paso es calcular sus módulos de compresibilidad (sección 2.2.1). En este caso, podemos notar que al incrementar el número de carbonos en la cola aumenta el máximo en el módulo de compresibilidad de las monocapas, es decir, se vuelve más difícil comprimir las al ir reduciendo el área por molécula. En el caso de tener una insaturación, la monocapa es más compresible. En el caso del DMPC el aumento en la compresibilidad no es tan notable como en el DPPC y DSPC, esto es probablemente ocasionado por que los experimentos se llevaron a cabo arriba de su temperatura de fusión. En algunas isothermas es apreciable una transición de primer orden, la cual puede identificarse en las gráficas del módulo de compresibilidad por un repentino decaimiento en la magnitud de E y un posterior aumento (Figura 5.2 derecha-arriba para DPPC y derecha-abajo para DMPE).

5.2. Efecto de la cabeza hidrofílica

El efecto debido a la cabeza hidrofílica también es de interés, para esto tomamos los resultados obtenidos para monocapas de lípidos con las mismas colas hidrocarbonadas y comparamos los resultados para explicar sus interacciones.

El primer efecto que es notable en las isothermas (Figura 5.3 izquierda) es el corrimiento de las presiones superficiales de fosfatidilcolina (PC) hacia áreas por molécula mayores a diferencia de las fosfatidiletanolaminas (PE) que se encuentran a menores áreas por molécula. De acuerdo a lo visto en la sección anterior, si tomamos en cuenta la temperatura de fusión de las moléculas, los resultados parecen contradecir los estados físicos de las moléculas.

Lo que no se ha discutido hasta este momento es el tamaño de las cabezas polares, las moléculas de PC tienen una cabeza polar de mayor tamaño que las de PE, por lo tanto en condiciones similares, las moléculas de PC toman un área más grande que las moléculas de PE. En este caso los efectos tiene más impacto debido a la geometría de las moléculas y a las interacciones estéricas que a la temperatura de fusión correspondiente. Lo que observamos en cada isoterma (Figura 5.3 izquierda) es que sin importar

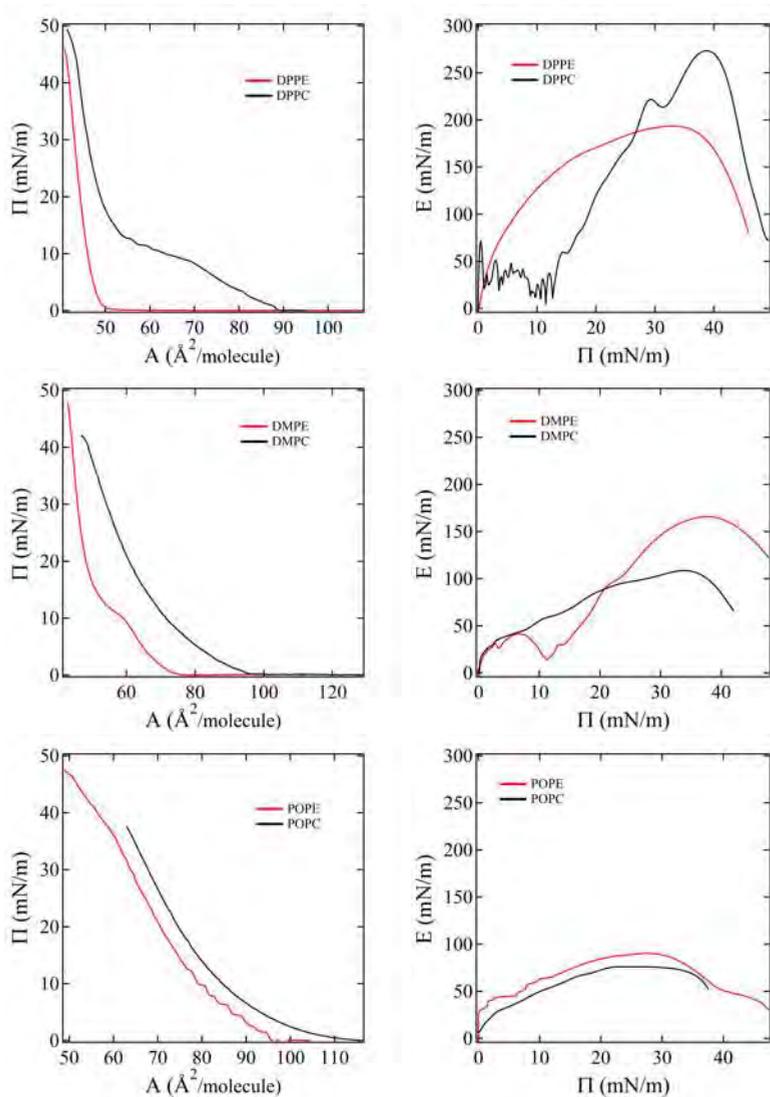


Figura 5.3: **Izquierda.** Se muestran las isothermas de monocapas de lípidos con cabezas polares distintas y la misma cola hidrofóbica. **Derecha.** Compresibilidades de las monocapas correspondientes.

el número de carbonos en las colas hidrofóbicas, los resultados son recorridos a áreas por molécula menores para cada PE en comparación con las PC.

Otro hecho importante es el de los enlaces hidrógeno formados directamente entre lipidos. Los grupos amina de las PE forman enlaces hidrógeno con los vecinos cercanos, mientras que las PC los forman por medio del oxígeno en el grupo fosfato[124]. Ya que todos los fosfolípidos tienen grupo fosfato, los enlaces hidrógeno son más fuertes en las monocapas formadas por PE que las de PC. Estos enlaces forman una red bidimensional en la intercara fosfolípido-agua y por lo tanto son también responsables del decrecimiento en el área por molécula medida en las isothermas.

En cuanto a las transiciones de fase, se puede observar que en las isothermas de DMPC y DMPE solamente la de DMPE tiene una transición de fase de primer orden (coexistencia de fases $LE - LC$), mientras que la de DMPC no tiene una transición marcada. Debido a que estas isothermas se trabajaron a 25°C y el DMPC tiene una temperatura de fusión de 24°C por lo cual se encuentra en un estado de mayor fluidez al compararlo con el DMPE cuya temperatura de fusión es 50°C . En cuanto al DPPC se observa que ocurre una transición de fase de primer orden mientras que en el DPPE hay una posible transición de segundo orden. Para las monocapas de POPE y POPC no hay transiciones de fase notables a estas temperaturas.

El efecto en los módulos compresibilidad (Figura 5.3 derecha) de las monocapas de POPE y POPC es similar aún cuando la monocapa de POPC es un poco más compresible. Sin embargo, cuando se trata de una transición de primer orden (DPPC y DMPE) hay un incremento abrupto en el módulo de compresibilidad que supera al de las monocapas sin transición visible (DMPC) o probable de segundo orden (DPPE), esto sugiere una relación entre una menor compresibilidad y la existencia de una región de coexistencia, lugar donde ocurre la formación de dominios.

5.3. Mezcla de lípidos

El análisis de monocapas de lípidos puros es necesario para conocer el comportamiento aislado de cada una de las moléculas. Sin embargo, las células

no están formadas por solo un tipo de molécula por lo que es importante estudiar mezclas de ellas para entender las contribuciones individuales en las interacciones en las monocapas compuestas por diferentes moléculas. En este trabajo se analizaron tres tipos de mezclas:

1. DSPC-POPE. En estas monocapas mixtas se hace un análisis únicamente desde el punto de vista termodinámico. Estos experimentos fueron realizados a 25°C.
2. DPPC-POPE. Donde se analiza la termodinámica, la formación de dominios y la reología del sistema. Estos experimentos fueron realizados a 20°C.
3. DPPC-nanopartículas de oro. Se realiza en análisis de penetración de las nanopartículas por medio de experimentos termodinámicos y reológicos. Estos experimentos fueron realizados a 20°C.

5.3.1. DSPC-POPE

Esta parte experimental fue realizada a 25°C por lo que las isothermas de lípidos puros es la misma que en las secciones 5.2 y 5.1. Además de las

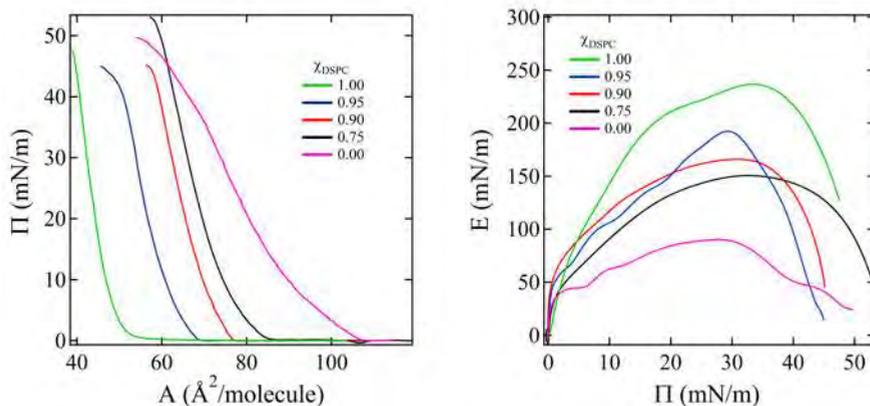


Figura 5.4: **Izquierda.** Isothermas de los lípidos DSPC y POPE puros y algunas mezclas. **Derecha.** Compresibilidades obtenidas numéricamente.

monocapas puras, se llevaron acabo tres mezclas, tomando en cuenta la fracción molar del lípido con la temperatura de fusión mas elevado: DSPC. Se realizaron mezclas con fracciones molares de DSPC, $\chi_{DSPC} = 1.00, 0.95, 0.90, 0.75, 0.00$ sobre las cuales se hizo el análisis termodinámico. Se escogieron mezclas con mayor cantidad de DSPC ya que al tratarse de un sistema modelo para membranas de hemoglobina su concentración en moléculas de PC es mayor al de PE.

De acuerdo al análisis hecho en las secciones 5.2 y 5.1, en DSPC ocurre una posible transición de segundo orden mientras que el POPE se mantiene en un estado más fluido con mayores áreas por molécula y mayor compresibilidad. Al disminuir χ_{DSPC} podemos ver que el área por molécula incrementa pero una posible transición de segundo orden sigue apareciendo en todos los casos (Figura 5.4 izquierda). Además, con muy poco incremento de POPE la isoterma se recorre considerablemente pero este incremento va disminuyendo al disminuir χ_{DSPC} . En esta sección el análisis se restringió a fracciones molares menores que 30% de POPE debido a lo reportado sobre cantidades de PC y PE en células.

La Figura 5.4 (derecha) muestra los módulos de compresibilidad (E) de las mezclas, en donde podemos observar que a 30 mN/m E aumenta al disminuir la concentración de POPE. A otras presiones ocurre un comportamiento similar, excepto en las mezclas $\chi_{DSPC} = 0.95, 0.90$ donde hay un intercambio de magnitudes a bajas presiones, el efecto a altas presiones está relacionado con la presión de colapso de la monocapa.

5.3.2. DPPC-POPE

Esta sección describimos los experimentos que se llevaron a cabo usando DPPC y POPE cuya representación esquemática se muestra en la Figura 5.5. El DPPC es uno de los principales componentes de las membranas pulmonares, cuya propiedad de reducir la tension superficial a valores cercanos a cero ha sido relacionado con el proceso de respiración, donde las monocas que se encuentran en una intercara aire-agua van desde estados muy comprimidos hasta estados muy expandidos donde la presión superficial es muy baja [125]. En estados muy comprimidos se ha identificado

que la membrana sufre efectos de doblamiento en los cuales el POPE tiene una participación fundamental debido a su forma de cono invertido [126], además de contribuir como regulador de fluidez en las membranas eucariotas [127].

Isotermas y compresibilidad

En la Figura 5.6 (izquierda) se muestra las isotermas experimentales realizadas a 20°C . Al igual que en la sección anterior, tomamos en cuenta la fracción molar del lípido con mayor temperatura de fusión, en este caso DPPC, y realizamos los experimentos a diferentes fracciones molares de DPPC: $\chi_{DPPC} = 1.00, 0.90, 0.80, 0.70, 0.50, 0.35, 0.25, 0.15, 0.00$. Lo primero que haremos notar es que al tratarse de experimentos a diferentes temperaturas comparados con los de las secciones 5.2 y 5.1, las isotermas de un solo lípido no son las mismas.

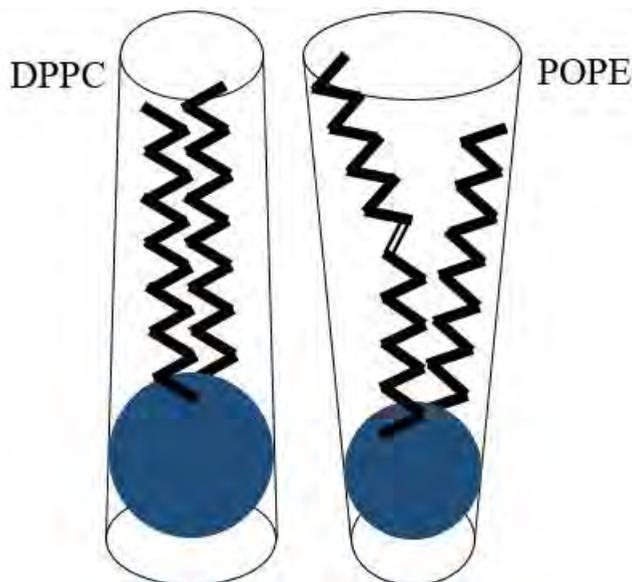


Figura 5.5: Representación esquemática de la geometría DPPC y POPE. Donde se muestra al DPPC con una cabeza polar de mayor tamaño comparada con el POPE.

De acuerdo con las isothermas de la Figura 5.6 (izquierda) el DPPC presenta una transición de primer orden en la cual hay una coexistencia entre las fases LE y LC y durante la cual existe una formación de dominios descritos en la literatura [55]. En cuanto al comportamiento del POPE puro, observamos que pasa de un estado LE a uno LC en una transición de fases a altas presiones superficiales, 38.2 mN/m [86], la monocapa presenta el colapso en valores cercanos a 50 mN/m.

Al disminuir el valor de χ_{DPPC} la transición de primer orden del DPPC va disminuyendo levemente, hasta que en $\chi_{DPPC} = 0.50$ casi no se aprecia en la isoterma, sin embargo en las imágenes de BAM (ver apéndice D , figura $D.5$) se observa la coexistencia de fases LC y LE . Por otro lado la transición de POPE puro al aumentar χ_{DPPC} también se va perdiendo hasta desaparecer en $\chi_{DPPC} = 0.50$. Esta pérdida de la presión casi constante en la región de coexistencia durante la transición de fase ha sido observada para pequeñas concentraciones de POPE [126].

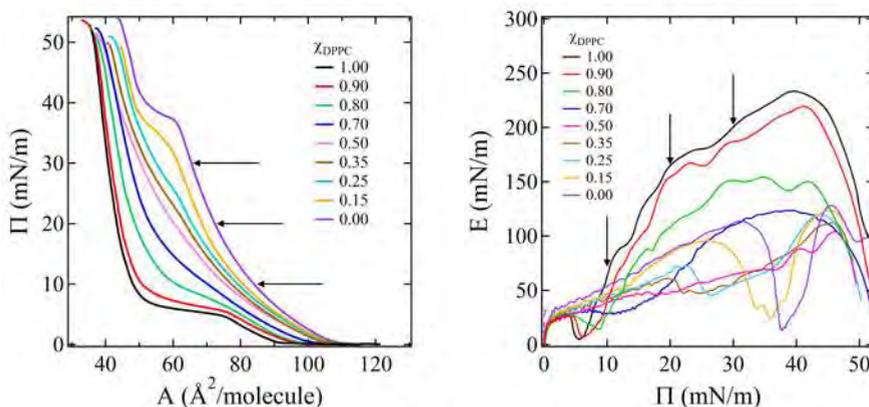


Figura 5.6: **Izquierda.** Isothermas de los lípidos DPPC y POPE puros y algunas mezclas, las flechas negras denotan los valores de presiones superficiales en los cuales se llevaron a cabo los experimentos en reología interfacial. **Derecha.** Compresibilidades obtenidas numéricamente.

Las transiciones de fase son más fáciles de visualizar al analizar los módulos de compresibilidad (Figura 5.6 derecha). Se puede observar la transición de primer orden para la mayoría de las mezclas excepto para $\chi_{DPPC} = 0.50$, y son caracterizadas por una repentina caída de E al aumentar la presión y un súbito crecimiento posterior. La Figura 5.7 muestra que este cambio en la presión superficial de transición tiene un comportamiento lineal decreciente al aumentar la fracción molar de DPPC, este comportamiento lineal ha sido relacionado con una buena miscibilidad entre los componentes de la mezcla [79].

En la Figura 5.8 se graficaron los módulos de compresibilidad a presiones superficiales de 5 mN/m, 10 mN/m, 20 mN/m, 30 mN/m y 40 mN/m, en cada una de las fracciones molares de DPPC estudiadas. De esto podemos notar lo siguiente:

1. $\Pi = 5$ mN/m. El módulo de compresibilidad es decreciente con χ_{DPPC} , sugiriendo que la monocapa más compresible es la de DPPC. En esta presión solo la monocapa de DPPC se encuentra iniciando su transición de fases, además la geometría de las moléculas de DPPC

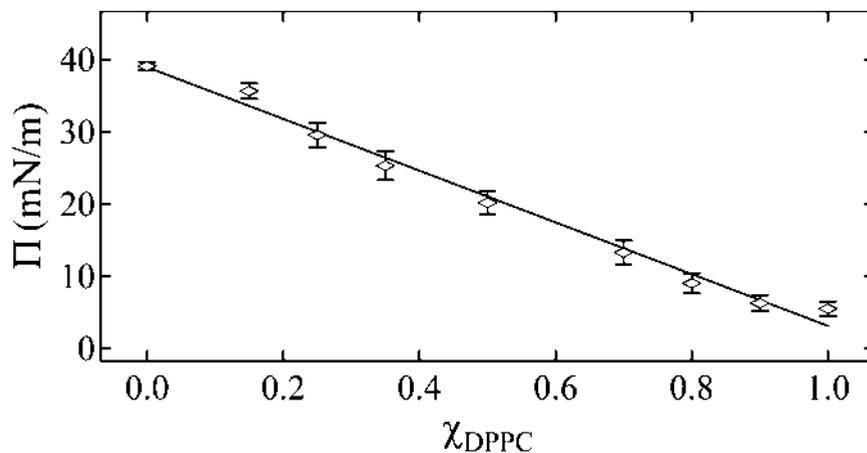


Figura 5.7: Presiones superficiales a las cuales ocurren las transiciones de fase de acuerdo al módulo de compresibilidad.

les permite irse empaquetando de mejor forma.

2. $\Pi = 10$ mN/m. El módulo de compresibilidad tiene un mínimo en $\chi_{DPPC} = 0.80$. A esta presión la monocapa que se encuentra iniciando su transición de fases es la $\chi_{DPPC} = 0.80$.
3. $\Pi = 20$ mN/m. El módulo de compresibilidad tiene un mínimo en $\chi_{DPPC} = 0.50$. A esta presión la monocapa que se encuentra cerca de su transición de fases es la $\chi_{DPPC} = 0.50$.
4. $\Pi = 30$ mN/m. El módulo de compresibilidad tiene un mínimo en $\chi_{DPPC} = 0.25$. A esta presión la monocapa que se encuentra iniciando su transición de fases es la $\chi_{DPPC} = 0.25$.
5. $\Pi = 40$ mN/m. El módulo de compresibilidad tiene un mínimo en $\chi_{DPPC} = 0.00$. A esta presión la monocapa que se encuentra sobre su transición de fases es la $\chi_{DPPC} = 0.00$.

Este análisis muestra que para una presión fija, existe un mínimo en el módulo de compresibilidad en la monocapa que se encuentra más cerca a su transición de fases. Esto sugiere que el empaquetamiento entre lípidos que permite una mayor compresibilidad tiene una relación directa con la coexistencia de fases.

Áreas de exceso y energías de mezclado

En la Figura 5.9 (izquierda) podemos observar el área por molécula obtenidas de los datos experimentales de las diferentes mezclas a diferentes presiones y su comparación con el comportamiento ideal (Ecuación 2.16). En la misma Figura 5.9 (derecha) podemos observar los valores del área de exceso calculada usando la ecuación 2.17. El comportamiento de la mezcla puede explicarse con alguna de estas dos, para hacerlo, tomemos en cuenta el área de exceso:

1. $\Pi = 5$ mN/m. A esta presión las monocapas, excepto la de DPPC, se encuentra en una fase expandida, es decir, las moléculas se encuentran muy separadas entre sí por lo que existe una alta movilidad tanto traslacional como rotacional. En esta fase expandida las moléculas

no están restringidas a una posición perpendicular a la superficie por lo que pueden ocupar áreas grandes tomando valores positivos en el área de exceso. Estos valores positivos se pueden interpretar como interacciones repulsivas.

2. $\Pi = 10$ mN/m. A esta presión las monocapas con $\chi_{DPPC} \geq 0.80$ están por encima de la transición de fases. Se puede observar que a partir de $\chi_{DPPC} = 0.70$ el área de exceso comienza a bajar e incluso se vuelve negativa para $\chi_{DPPC} = 0.90$.
3. $\Pi = 20$ mN/m. A esta presión las monocapas con $\chi_{DPPC} > 0.50$ están por encima de la transición de fases. Se puede observar que a partir de $\chi_{DPPC} = 0.50$ el área de exceso comienza a bajar y comienza a volverse negativa en $\chi_{DPPC} = 0.80$.
4. $\Pi = 30$ mN/m. A esta presión solo las monocapas $\chi_{DPPC} = 0.00$ y

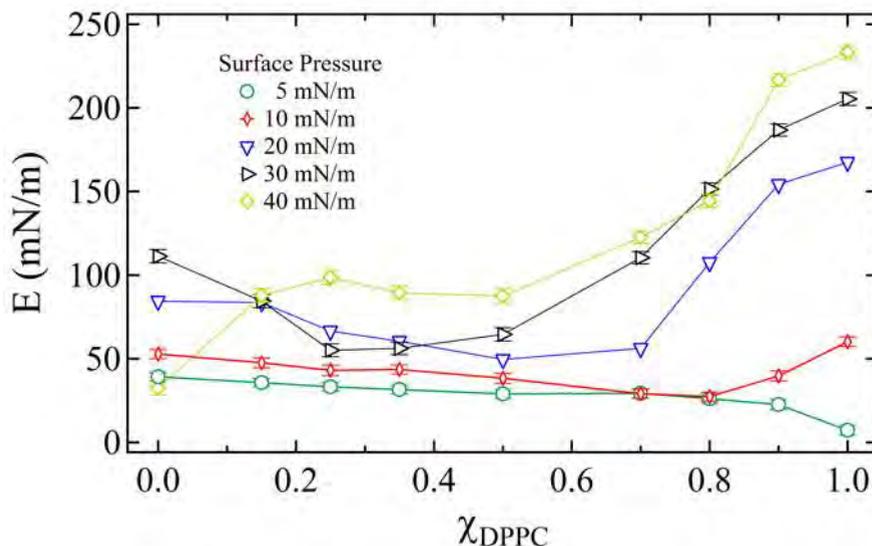


Figura 5.8: Módulos de compresibilidad a diferentes presiones superficiales, 5 mN/m (verde), 10 mN/m (rojo), 20 mN/m (azul), 30 mN/m (negro) y 40 mN/m (ocre). Las líneas sólidas son la unión de los puntos.

$\chi_{DPPC} = 0.15$ están por debajo de la transición de fases, la última muestra valores negativos muy cercanos al comportamiento ideal, a partir de ahí hay un mínimo en $\chi_{DPPC} = 0.35$. Estos valores negativos sugieren que las moléculas al estar más cerca entre ellas tienen una mejor miscibilidad, reduciendo su área efectiva por molécula.

5. $\Pi = 40$ mN/m. A esta presión ninguna monocapa está en fase LE, todas están al menos en fase de coexistencia. En este caso el área de exceso es menor en valor absoluto que a 30mN/m, debido a que se encuentran más cerca la atracción producida por el empaquetamiento se ve reducida por interacciones estéricas debido a la alta compresión a la que se tienen las moléculas.

De este análisis podemos observar una relación entre la región de transición de fases con el área de exceso al igual que en el caso de la compresibilidad.

La Figura 5.10 (derecha) muestra las variaciones de la energía libre de

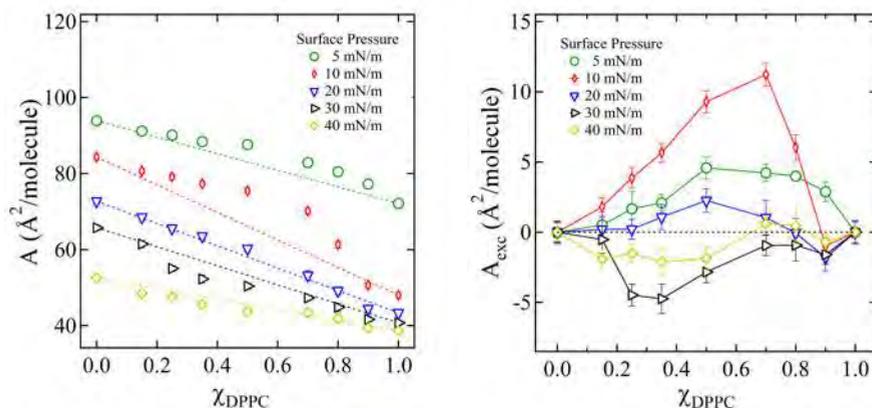


Figura 5.9: **Izquierda.** Área por molécula de las monocapas lipídicas como función de la concentración molar de DPPC, la línea punteada representa el comportamiento ideal para una mezcla. **Derecha.** Área de exceso para las monocapas mixtas de DPPC-POPE. Los datos fueron tomados a diferentes presiones, 5 mN/m (verde), 10 mN/m (rojo), 20 mN/m (azul), 30 mN/m (negro) y 40 mN/m (ocre). Las líneas sólidas son la unión de los puntos.

Gibbs de mezclado, ΔG_{mix} (ecuación 2.24) en las monocapas de DPPC-POPE como función de la fracción molar de DPPC. En general los valores de las energías son positivas en todo el rango de presiones estudiadas (5 mN/m, 10 mN/m, 20 mN/m, 30 mN/m y 40 mN/m). Los valores positivos indican que no existe una estabilidad termodinámica, probablemente por la falta de formación de enlaces hidrógeno entre las cabezas de PC y PE.

Análisis de imágenes de BAM

Por medio de BAM se analizaron las imágenes obtenidas durante los experimentos para obtener las isothermas calculando áreas de fases condensadas y expandidas de acuerdo al apéndice D. La Figura 5.11 muestra las tendencias de la formación de dominios, se puede observar que cada uno de ellos ocurre al comienzo de la presión de transición (Figura 5.7).

Se puede observar que la pendiente de la formación de dominios en los

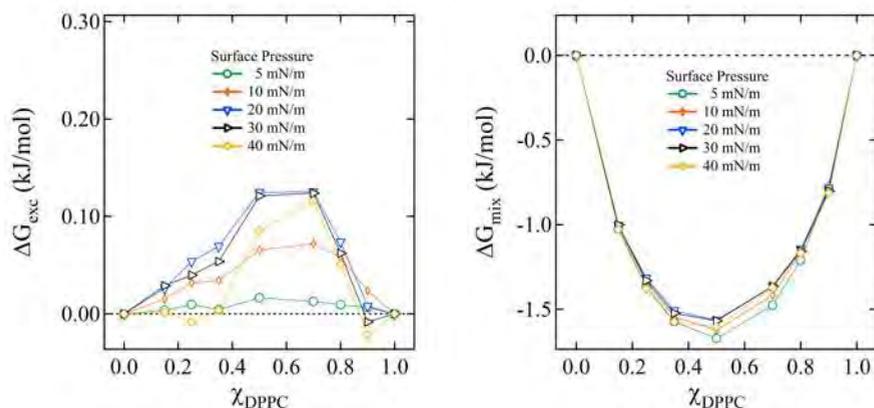


Figura 5.10: **Izquierda.** Energía libre de Gibbs de exceso obtenida a partir de los datos experimentales de las monocapas puras y las mezclas. **Derecha.** Energía libre de Gibbs de mezclado, la cual toma en cuenta el comportamiento ideal. Los datos fueron tomados a diferentes presiones, 5 mN/m (verde), 10 mN/m (rojo), 20 mN/m (azul), 30 mN/m (negro) y 40 mN/m (ocre).

lípidos puros es más grande y esta va disminuyendo en las mezclas intermedias. Esto sugiere una dependencia con la pérdida de la región de transición observada en las compresibilidades (Figura 5.6). También se puede observar que para $\chi_{DPPC} = 0.00$ el área condensada es distinta de cero a presiones debajo de la transición (15-34 mN/m), estas semillas de nucleación de dominios ya han sido observados ??.

Otra información importante que se puede obtener de la Figura 5.11 es la presión superficial a la cual la monocapa ya está completamente en fase LC, es decir, los dominios se unen en uno solo conjunto.

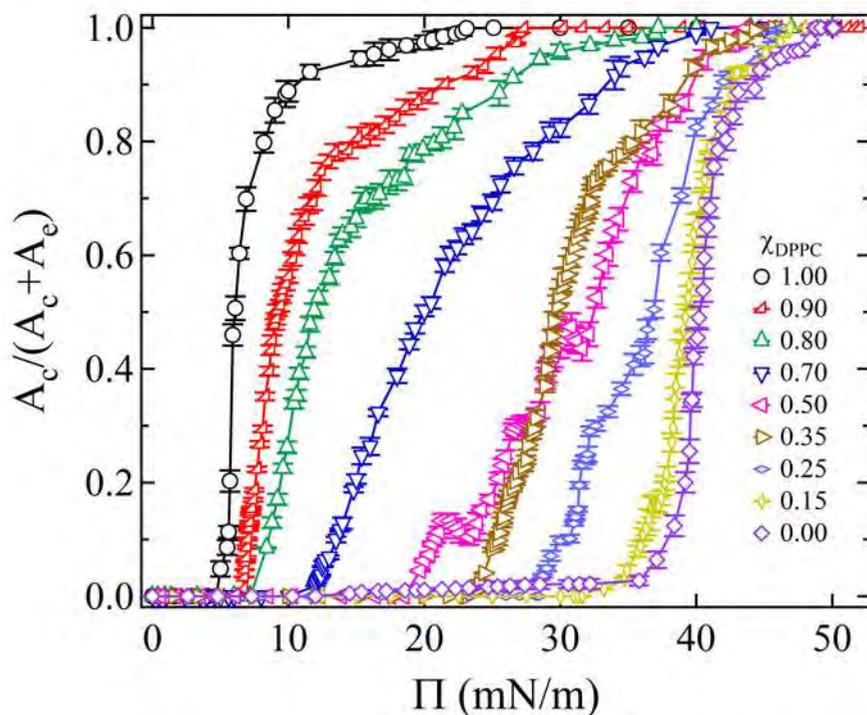


Figura 5.11: Áreas de fase condensada entre el área total de las imágenes obtenidas de BAM y calculadas de acuerdo al apéndice D.

Módulos de compresibilidad en función del área condensada

La Figura 5.12 muestra la dependencia de E con respecto a χ_{DPPC} para diferentes porcentajes de condensación (obtenida de las figuras 5.6 derecha y 5.11). Donde observáramos lo siguiente:

1. En ambas (figura 5.12 derecha e izquierda) se muestra el valor de E máximo de cada mezcla durante el proceso de compresión. Se observa que hay un mínimo en $\chi_{DPPC} = 0.50$. Sin embargo, estos valores no son comparables entre si por que la monocapa se encuentra en diferentes estados de composición de fases.
2. En la izquierda se muestra E justo antes de la aparición de fases condensadas (0%). Se puede observar que hay un máximo en las mezclas intermedias hasta el 50% de condensación. Cuando se llega a 75% comienza a aparecer un mínimo local también en las mezclas intermedias hasta que ese mínimo local se vuelve global a 100%.
3. En la derecha se puede apreciar la evolución del mínimo local de E en las mezclas intermedias desde 75% hasta 100%.

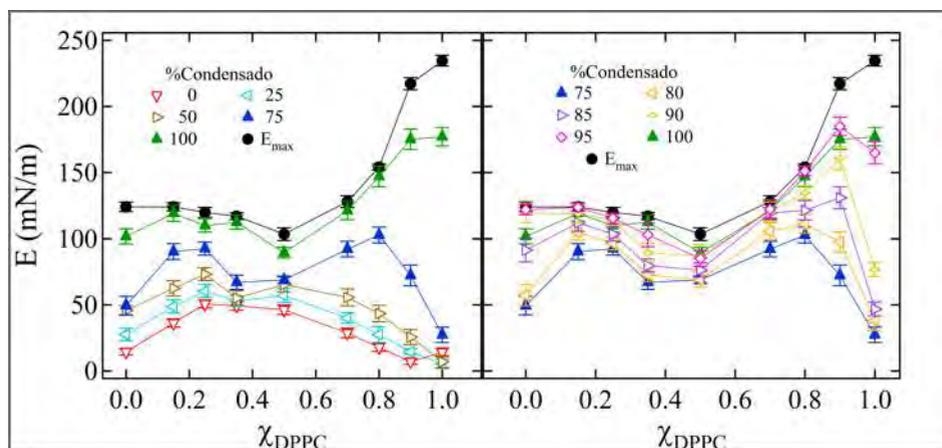


Figura 5.12: Comparación de módulos de compresibilidad para diferentes porcentajes de fase LC.

Cabe mencionar que para la curva de 0% de condensación se usó E a 2% de condensación para POPE puro, esto debido a que hay una rango de presiones sobre las cuales este porcentaje se mantiene constante aún cuando no se ha llegado a la región a la cual ocurre la transición de primer orden.

De este análisis observamos que los valores de E en las monocapas de un solo lípido crecen más rápido a partir del 75% (especialmente la de DPPC) de condensación mientras que en las mezclas este crecimiento es más lento. También se observa el cambio en las mezclas intermedias de máximo en E a mínimo local hasta 75%. El comportamiento de E al 100% de condensación sugiere que esta es la mezcla más compresible, esto podría ser asociado a la geometría de las moléculas (cono y cono-invertido) las cuales permiten un mayor empaquetamiento de la monocapa.

Morfología de dominios

Además de analizar los porcentajes en condensación también se observa un cambio en la forma de los dominios de la fase LC . La Figura 5.13 muestra las isotermas estudiadas, cada una de ellas con una imagen representativa de BAM sobre la transición de fases en las cuales se puede apreciar el cambio de forma.

Las monocapas de DPPC ampliamente estudiadas muestran dominios trisquel con simetría rotacional hacia la izquierda. Mientras que en los pocos estudios de la morfología de POPE muestran dominios tipo alga-marina. Para las mezclas no existe estudio de la formación de dominios, de la Figura 5.13 podemos apreciar que en la mezcla $\chi_{DPPC} = 0.90$ los dominios conservan la forma de trisquel. Esta forma comienza a perderse en la mezcla $\chi_{DPPC} = 0.80$ y se pierde casi completamente en $\chi_{DPPC} = 0.70$. Por otro lado los dominios tipo alga-marina se observan en las mezclas $\chi_{DPPC} = 0.15, 0.25, 0.35, 0.50$ aunque las ramificaciones decrecen en tamaño en cada uno de ellos.

Si comparamos esto con la Figura 5.12 podemos observar que los dominios tipo trisquel muestran módulos de compresibilidad más alto al con-

densarse la monocapa arriba del 95%. Aún cuando a este porcentaje los dominios ya han comenzado a unirse entre ellos (percolación) en su mayoría, la tensión lineal debida a la forma y conformación de los dominios parece tener impacto en este comportamiento.

Diagrama de fases

La Figura 5.14 muestra un diagrama de fases obtenido de las imágenes de BAM y de las isothermas, se tienen las siguientes regiones y puntos de interés:

1. La región de colapso es obtenida de las isothermas, esto ocurre cuando

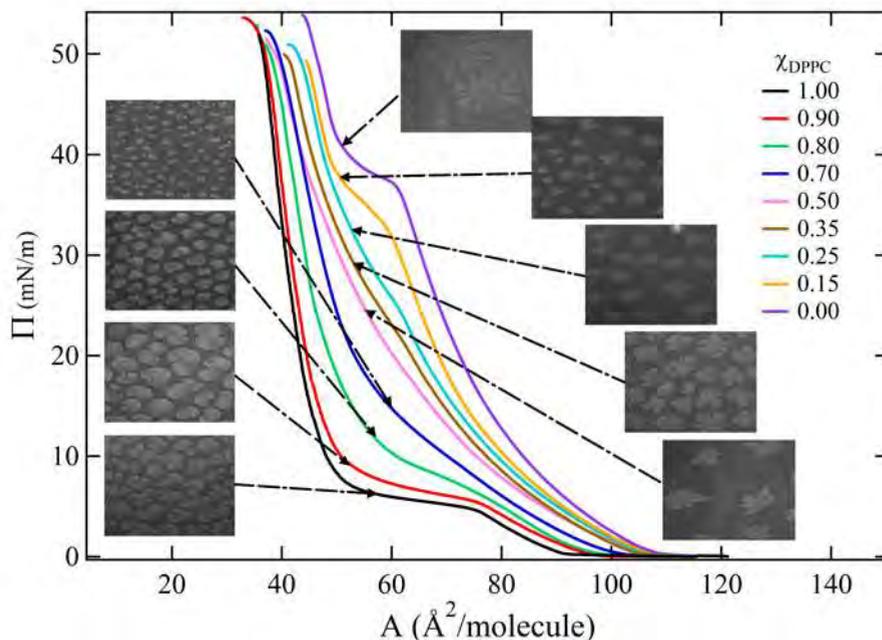


Figura 5.13: Se muestran las isothermas de las mezclas de DPPC-POPE y una imagen de BAM en cada región de coexistencia de fases. El tamaño de las imágenes es de $150 \times 125 \mu m$.

la presión superficial deja de incrementar y se mantiene constante o cae repentinamente, existen diferentes procesos de colapso, pero no fueron tratados en esta tesis.

2. La región homogénea *LE* se obtuvo tanto de observar la homogeneidad en las imágenes de BAM como de la presión a la cual el módulo de compresibilidad tiene una caída abrupta, lo cual señala una transición de primer orden. Estas dos coincidieron.
3. La región homogénea *LC* se obtuvo principalmente de imágenes de

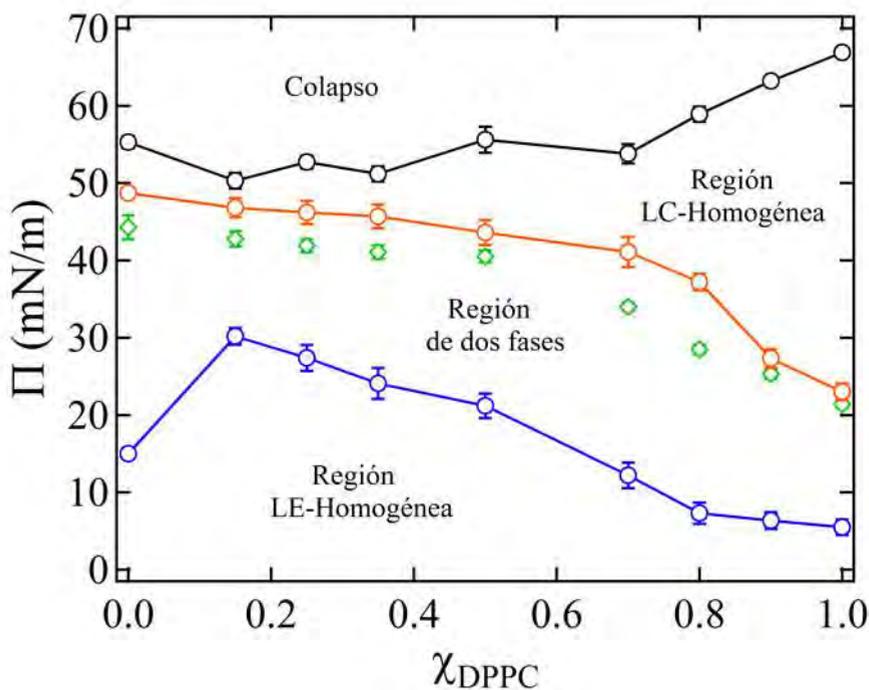


Figura 5.14: Diagrama de fases de la mezcla de lípidos DPPC-POPE. Se muestran las regiones donde solo existe una fase y la región donde hay coexistencia de dos fases obtenidas de las imágenes de BAM. De las isotermas se obtiene la región de colapso. Los puntos verdes indican la percolación de dominios obtenidos de las imágenes de BAM.

| χ_{DPPC} | $E_e(mN/m)$ | $E_c(mN/m)$ |
|---------------|----------------|-----------------|
| 1.00 | 27.4 ± 3.1 | 177.0 ± 7.3 |
| 0.90 | 23.6 ± 2.8 | 175.0 ± 8.6 |
| 0.80 | 19.7 ± 3.5 | 147.0 ± 8.2 |
| 0.70 | 28.3 ± 3.6 | 121.0 ± 7.9 |
| 0.50 | 48.8 ± 3.3 | 89.0 ± 4.3 |
| 0.35 | 57.4 ± 4.4 | 112.0 ± 5.9 |
| 0.25 | 62.6 ± 4.3 | 110.0 ± 5.2 |
| 0.15 | 52.6 ± 2.9 | 119.0 ± 6.2 |
| 0.00 | 66.5 ± 3.4 | 102.0 ± 6.7 |

Cuadro 5.1: Módulos de compresibilidad en los límites de coexistencia de fases.

BAM.

4. La región de dos fases también se obtuvo observando las imágenes de BAM.
5. Los puntos verdes señalan el las presiones a las cuales los dominios comienzan a unirse entre si (percolación).

Teoría de medio efectivo

En esta sección se analizó el sistema con la teoría de medio efectivo (sección 2.12), la cual solo es aplicable en la región de coexistencia de fases $LE - LC$. Para esto es necesario obtener $1/E$ de la Figura 5.6 derecha y relacionarlos con los valores de condensación de la Figura 5.11.

La Figura 5.15 muestra los valores de $1/E$ para las 9 mezclas estudiadas en esta tesis, donde cada una de las curvas tiene un ajuste lineal usando los módulos de compresibilidad en el límite de coexistencia, E_c para el límite de 100% condensada y E_e para el límite de 0% (Cuadro 5.15).

Las curvas de la Figura 5.15 muestran comportamiento lineal en algunas partes, especialmente la mezcla $\chi_{DPPC} = 0.50$, este comportamiento

lineal sugiere que el módulo de compresibilidad puede modelarse como un medio efectivo. Sin embargo, los ajustes lineales usando los módulos de compresibilidad del Cuadro 5.15 en general no coinciden con los datos experimentales, esto significa que la aproximación de medio efectivo de la

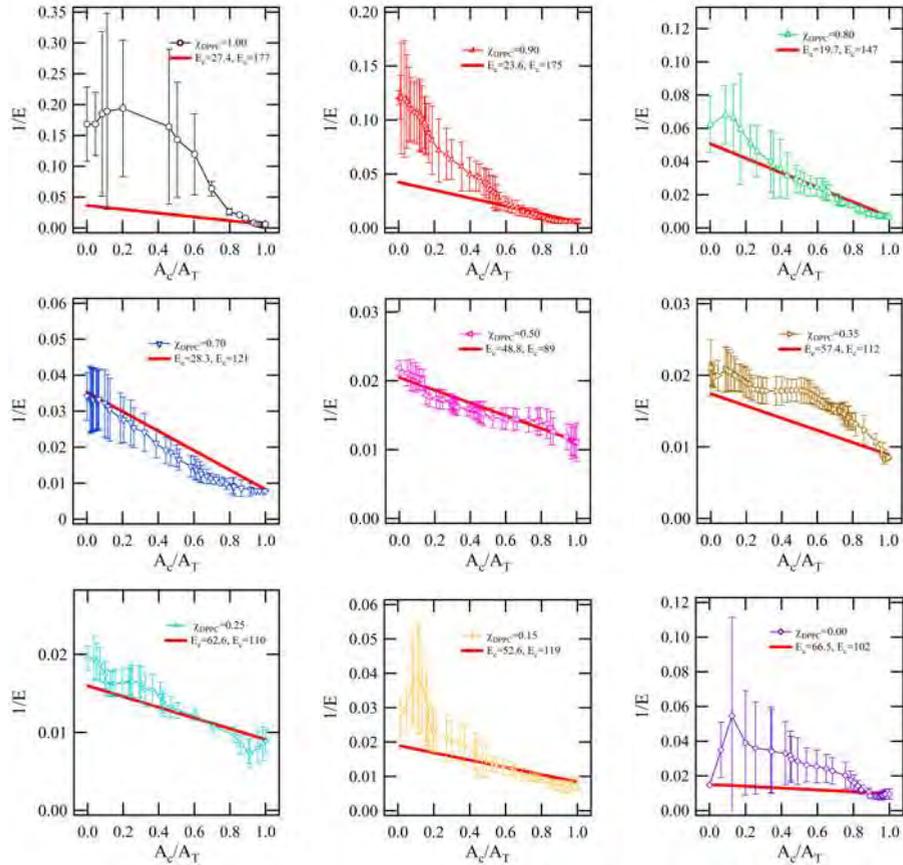


Figura 5.15: Teoría de medio efectivo aplicado a las mezclas de DPPC-POPE, las líneas rojas son el fit usando los módulos de compresibilidad en los extremos de la coexistencia. (Arriba) $\chi_{DPPC} = 1.00$, $\chi_{DPPC} = 0.90$ y $\chi_{DPPC} = 0.80$. (Medio) $\chi_{DPPC} = 0.70$, $\chi_{DPPC} = 0.50$ y $\chi_{DPPC} = 0.35$. (Abajo) $\chi_{DPPC} = 0.25$, $\chi_{DPPC} = 0.15$ y $\chi_{DPPC} = 0.00$.

Ecuación 2.12 no describe este tipo de comportamiento.

Para la monocapa $\chi_{DPPC} = 1.00$ esta diferencia en el ajuste es inusualmente grande, esto posiblemente está ligado con el cambio marcado en la pendiente en la transición de fases. Para la monocapa $\chi_{DPPC} = 0.00$ la aparición de pequeños dominios (cerca de 2% del área total) en un rango amplio de presiones (15-38 mN/m) y el cambio marcado de la pendiente en la transición están ligados con esta gran diferencia en el ajuste lineal.

Percolación y normalización de E

La percolación en los sistemas de dos fases juega un papel importante en la teoría de medio efectivo, de las imágenes de BAM se obtuvieron los valores de área condensada a la cual cada una de las monocapas está en proceso

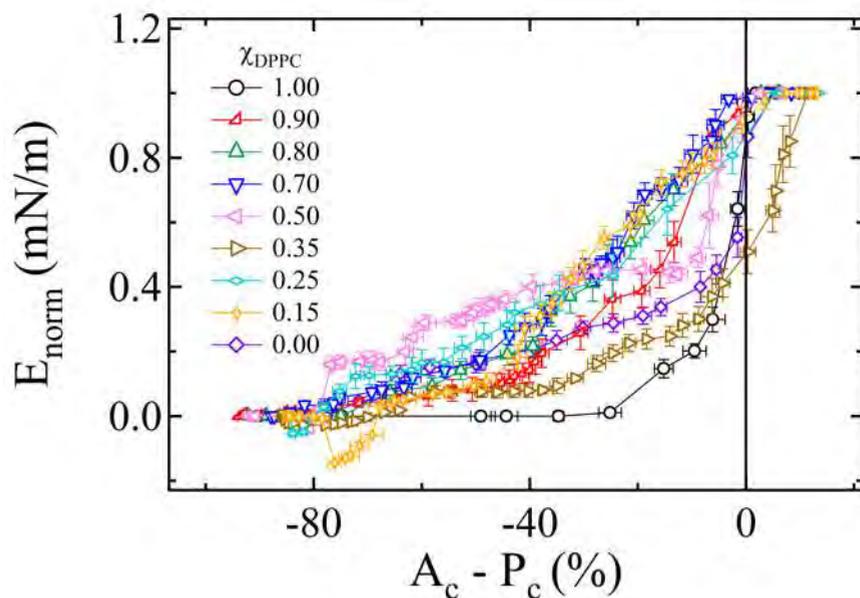


Figura 5.16: Módulo de compresibilidad normalizado contra el porcentaje de área condensada menos el límite de percolación de acuerdo a imágenes de BAM. La línea negra vertical indica la percolación.

| χ_{DPPC} | $P_c(\%)$ de BAM | $P_c(\%)$ de EvsA |
|---------------|------------------|-------------------|
| 1.00 | 95.0 ± 2.0 | 99.8 ± 0.2 |
| 0.90 | 94.0 ± 2.0 | 98.0 ± 2.0 |
| 0.80 | 92.0 ± 4.0 | 89.0 ± 3.0 |
| 0.70 | 88.0 ± 5.0 | 82.0 ± 3.0 |
| 0.50 | 92.0 ± 3.0 | 88.0 ± 3.0 |
| 0.35 | 86.0 ± 6.0 | 87.0 ± 5.0 |
| 0.25 | 85.0 ± 4.0 | 76.0 ± 7.0 |
| 0.15 | 85.0 ± 6.0 | 78.0 ± 7.0 |
| 0.00 | 84.0 ± 6.0 | 79.0 ± 6.0 |

Cuadro 5.2: Valores de área condensada en los cuales la monocapa muestra percolación. Obtenidos tanto de imágenes de BAM como del cambio de pendiente del módulo de compresibilidad a presiones arriba de la transición de fases.

de percolación (Cuadro 5.2). Los valores del Cuadro 5.2 se obtuvieron del análisis de imágenes de BAM y del cambio de pendiente del módulo de compresibilidad (Figura 5.6 derecha) a presiones mayores a la transición de fases.

Para modelar el módulo de compresibilidad tomando en cuenta la percolación de la monocapa se usó la ecuación 2.13, en la cual se necesitan los valores de E_e y E_c del Cuadro 5.15. La Figura 5.16 muestra los módulos de compresibilidad normalizados graficados contra el porcentaje de área condensada menos el porcentaje de área condensada en el cual la monocapa muestra percolación de acuerdo a las imágenes de BAM. En general hay un comportamiento de crecimiento del módulo normalizado cuando la monocapa se encuentra cerca de la percolación, siendo más marcado en las monocapas $\chi_{DPPC} = 0.00, 1.00$.

De acuerdo a la Figura 5.16, los módulos normalizados comienzan a subir arriba de 0.5 si la monocapa está cerca al menos del 20% de la percolación, en la mayoría de ellos el crecimiento es abrupto.

Reología de cizallamiento interfacial

Para los experimentos de reología de cizallamiento interfacial se aseguró que el sistema se encontrara en un régimen de viscoelasticidad lineal. Esto se llevó a cabo con mediciones de barrido en deformación (λ) a frecuencia constante ($\omega = 1.26$ rad/s), del cual se obtiene un módulo complejo de cizallamiento interfacial (G^*),

$$\sigma = G^* \lambda$$

La Figura 5.17 muestra estos datos para monocapas de DPPC a 20 mN/m y a 30 mN/m, en la cual al menos hasta 5% y 1% respectivamente la deformación de cizallamiento en el sistema permanece en un régimen lineal, aún cuando el equipo no llega a deformaciones más altas se eligió la misma amplitud de deformación para todos los sistemas.

La Figura 5.18 muestra los módulos viscoelásticos en barridos de frecuencia angular. Las monocapas $\chi_{DPPC} = 1.00$ y 0.90 muestran un comportamiento viscoelástico similar, aumentando la magnitud de sus módulos

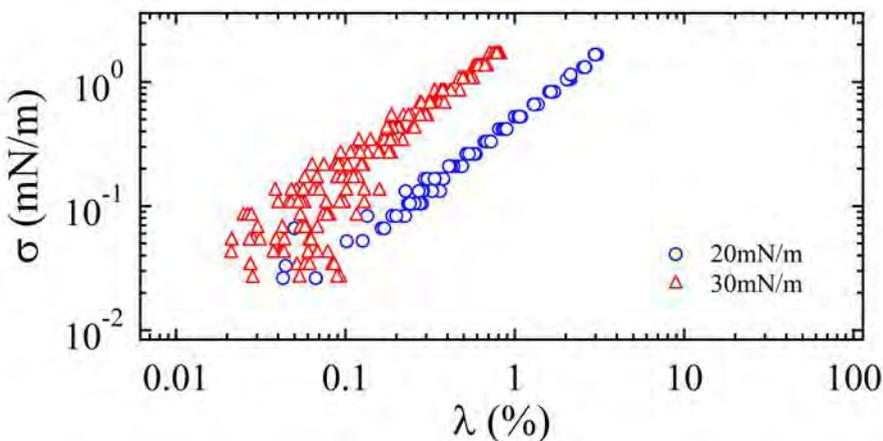


Figura 5.17: Deformación a la cual el sistema tiene una respuesta lineal. Los círculos azules son a 20 mN/m y los triángulos rojos a 30 mN/m

al aumentar la presión superficial. El comportamiento de quiebre del módulo elástico (G') ya ha sido observado en monocapas de DPPC [22], y está asociado a un rompimiento de la parte elástica al aumentar la frecuencia de oscilación. En general este comportamiento se ve en todas las monocapas con diferente magnitud.

La monocapa $\chi_{DPPC} = 0.00$ muestra una respuesta reológica muy baja (con respecto a la superficie de agua pura). En las presiones analizadas la monocapa se encuentra con pequeños dominios con área total menor a 3%. Una posible razón para la falta de respuesta ante la cizalla es la forma de las moléculas, al tener una forma de cono invertida tienen una mayor probabilidad de cambiar su inclinación permitiendo la deformación no forzada. En la Figura 5.18 se ve el mismo comportamiento para G'' en cada presión, mientras que G'' tiene un valor muy pequeño y disminuye rápidamente.

La monocapa $\chi_{DPPC} = 0.50$ es la única que muestra un intercambio de $G' > G''$ a $G' < G''$ en las tres presiones analizadas. También se observa que la parte viscosa G'' se mantiene en el mismo valor en las tres presiones probablemente consecuencia del POPE. Por otro lado G' aumenta ligeramente hasta llegar a un valor máximo a partir del cual comienza a caer.

La Figura 5.19 muestra los módulos viscoelásticos de cizallamiento para $\chi_{DPPC} = 1.00, 0.90, 0.70, 0.50, 0.35, 0.25, 0.15, 0.10,$ y 0.00 medidos a $\omega = 0.13$ rad/s. Podemos observar en las tres presiones analizadas el mismo comportamiento, el módulo viscoso G'' crece al aumentar χ_{DPPC} con una caída que crece al aumentar la presión en la monocapa 0.50. Para el módulo elástico tenemos que a 30 mN/m hay un incremento en la magnitud al aumentar χ_{DPPC} , a 20 mN/m la magnitud se mantiene constante a partir de $\chi_{DPPC} = 0.35$, mientras que a 10 mN/m hay un máximo en $\chi_{DPPC} = 0.50$.

De estos análisis podemos concluir que el sistema crece en resistencia a la cizalla al aumentar χ_{DPPC} , esto está relacionado con la composición de fases de la monocapa, ya que a una presión fija la monocapa está en un estado más condensado al aumentar χ_{DPPC} . Debido a que la reología de cizallamiento da información de la estructura, este análisis también señala que la geometría molecular está relacionada con la resistencia a la cizalla,

siendo la molécula de POPE (como invertido) la que tiene una mayor movilidad angular con respecto a la normal de la superficie, mientras que la geometría más cónica del DPPC con área mayor en la parte hidrofílica lo restringe a tales movimientos.

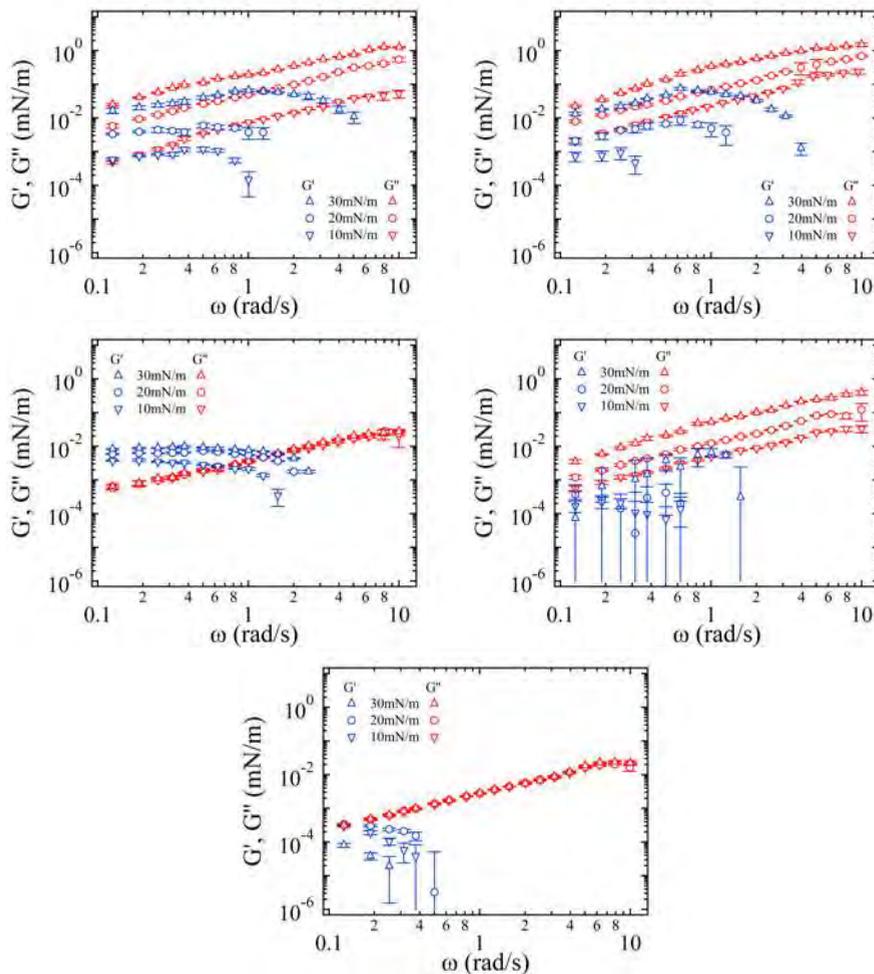


Figura 5.18: Módulos viscoelásticos de cizallamiento de las monocapas $\chi_{DPPC} = 1.00, 0.90, 0.50, 0.25$ y 0.00 respectivamente.

5.3.3. DPPC y nanopartículas

Nanopartículas

En esta sección se analizan los resultados obtenidos de monocapas de DPPC mezclados con nanopartículas constituidas de un núcleo de quitosano-ácido poliláctico glicólico (PLGA) y una coraza de oro sintetizadas por Diego Gómez en su tesis de maestría en la Universidad Autónoma Metropolitana campus Cuajimalpa bajo la dirección del Dr. José Campos Terán. Las nanopartículas tienen un tamaño de 167.2 ± 51.93 nm y fueron funcionalizadas con albúmina de suero bovino (BSA), dicha funcionalización sirve también como estabilizante (potencial zeta de -32.4 ± 5.78 mV). Las nanopartículas se mantuvieron en solución de agua MilliQ y su concentración

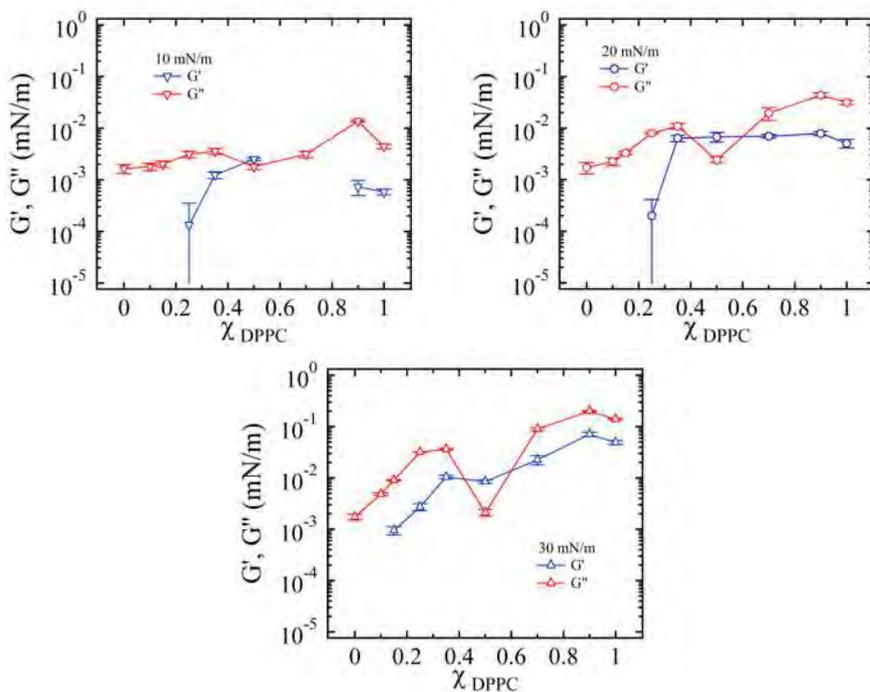


Figura 5.19: Módulos viscoelásticos de cizallamiento de varias monocapas a una frecuencia de 0.13 rad/s.

fue de aproximadamente 1×10^{-8} M.

El PLGA es uno de los polímeros biodegradables mejor desarrollados, y es muy atractivo debido a su biocompatibilidad, su protección contra la degradación, la posibilidad de la liberación sostenida, la posibilidad de dirigirse a órganos y células específicas, entre otras. La agencia de administración de alimentos y medicamentos (FDA, USA) y la agencia europea de medicamentos (EMA, UE) lo aprueban en el desarrollo de entrega de medicamentos y se han usado en vacunas, tratamientos contra el cáncer, inflamación y otras enfermedades.

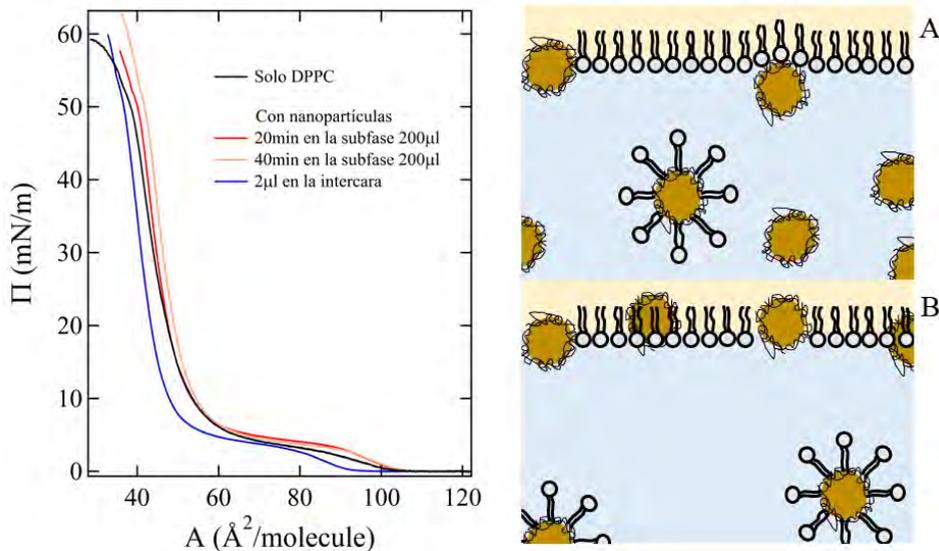


Figura 5.20: **Izquierda.** Muestra las isotermas de monocapas de DPPC y mezclas de DPPC con nanopartículas depositadas en la subfase medidas con diferentes tiempos en los cuales ocurre la difusión. **Derecha.** Esquema de una posible configuración de las moléculas de DPPC (círculos grises) en presencia de las nanopartículas (círculos dorados), para partículas inicialmente depositadas en la subfase (A) y para partículas inicialmente depositadas en la intercara (B).

Isotermas

La Figura 5.20-Izquierda muestra las siguientes mediciones (con $T = 20^\circ\text{C}$):

1. Isotherma de DPPC (1 mg/ml) con 20 minutos de espera para la evaporación del cloroformo.
2. Isothermas de DPPC (1 mg/ml) en las cuales se depositaron $200 \mu\text{l}$ nanopartículas en la subfase con una concentración de $1 \times 10^{-9} \text{ M}$. Los tiempos de difusión de las nanopartículas fueron tomados después de la evaporación del cloroformo, 20 y 40 minutos..
3. Isotherma de DPPC (1 mg/ml) en la cual se depositaron $2 \mu\text{l}$ sobre la superficie del agua.

Cuando se depositan las nanopartículas en la subfase es necesario esperar para que se difundan y lleguen a la intercara. En la Figura 5.20 se

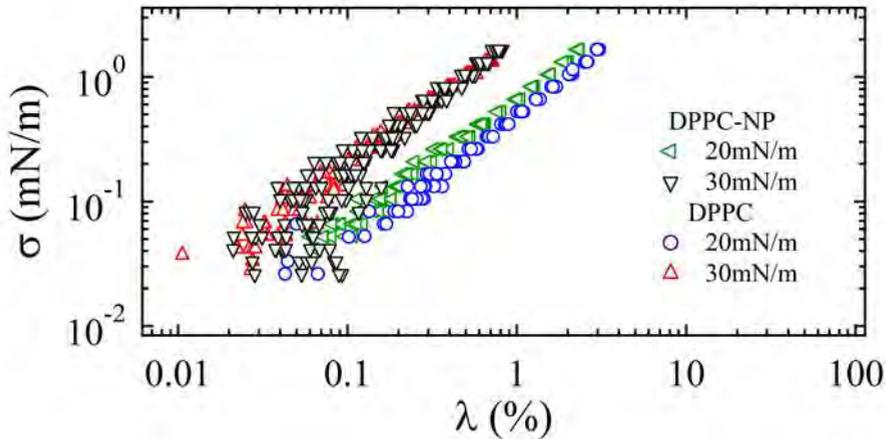


Figura 5.21: Deformación a la cual los sistemas DPPC y DPPC-NP tienen una respuesta lineal. Para DPPC los círculos azules son a 20 mN/m y los triángulos rojos a 30 mN/m. para DPPC-NP los triángulos verdes son a 20 mN/m y los triángulos negros son a 30 mN/m.

observan isotermas a dos tiempos de difusión diferentes 20 y 40 minutos, podemos apreciar que hay un cambio ligero, indicando que las nanopartículas comienzan a tener una competencia entre su adsorción y un secuestro de moléculas de DPPC de la intercara hacia el bulto.

Se puede apreciar que cuando las nanopartículas se depositan directamente en la intercara el área por molécula se ve reducida a una presión fija, esto indica que las nanopartículas en su mayoría permanecen en la intercara.

Reología de cizallamiento

La Figura 5.21 muestra las mediciones del régimen de viscoelasticidad lineal mencionadas en la sección anterior y son comparadas con el sistema que incluye nanopartículas, la frecuencia es la misma (1.26 rad/s). Podemos observar que a 20 mN/m la respuesta del sistema es mayor para una deformación fija, mientras que para 30 mN/m la respuesta es muy parecida. Esta diferencia en las presiones está relacionada con la constitución de fases en la monocapa, a 30 mN/m la monocapa se encuentra en un estado 100 % condensado, mientras que a 20 mN/m aún hay pequeños espacios

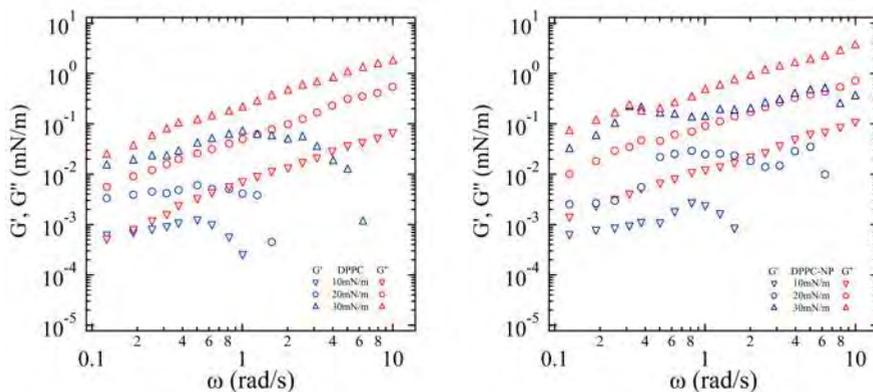


Figura 5.22: Comparación de módulos viscoelásticos de cizallamiento de monocapas de DPPC y DPPC-NP después de 40 minutos de difusión a una frecuencia de 1.26 rad/s.

entre los dominios de la fase LC.

La Figura 5.22 muestra los módulos de elasticidad y viscosidad de monocapas de DPPC (izquierda) y DPPC-NP después de 40 minutos de difusión (derecha). Se puede observar que en general los módulos tienen una magnitud mayor, en el rango de frecuencias estudiadas la contribución elástica (G') no tiene la caída representativa de las monocapas sin nanopartículas (Figura 5.19) a la presión de 30 mN/m, a 20 mN/m comienza a caer al final y para 10 mN/m también se ve recorrido a frecuencias mayores.

Otro factor apreciable en cada una de las contribuciones elásticas son los pequeños aumentos entre $\omega = 3$ rad/s y 7 rad/s, esto debe estar relacionado con la entrada de nanopartículas en la intercara dando una mayor respuesta del sistema. En la contribución viscosa (G'') este aumento local no es perceptible, sin embargo la magnitud de este módulo es mayor que para la monocapa de DPPC a cualquier frecuencia.

Capítulo 6

Conclusiones

En esta tesis se reportan los efectos hidrofóbicos-hidrofilicos como uno de los principales componentes de este tipo de sistemas, si no existiera cierto grado de insolubilidad debido a la parte hidrofóbica las moléculas no permanecerían en la superficie. Por lo tanto en la sección 5.1 y 5.2 reportamos experimentos que ayudan a entender estos aspectos. Se encontró que el número de carbonos en las colas hidrofóbicas así como el punto de fusión está directamente relacionado con el área molecular promedio que estos ocupan en la superficie así como la presión superficial que ejercen, efecto mostrado al disminuir la tensión superficial del agua. Se observó que su compresibilidad mecánica está ligada a estas interacciones hidrofóbicas-hidrofilicas. También se relacionaron los efectos de la formación de enlaces hidrógeno entre las partes polares de las moléculas, así como sus interacciones estéricas con los resultados termodinámicos.

También en esta tesis reportamos los efectos de la adición de lípidos insaturados a monocapas de lípidos saturados, en sus propiedades termodinámicas y mecánicas. Encontramos que la fase de coexistencia $LE - LC$ de DPPC y DSPC se recorren a mayores presiones superficiales al incrementar la fracción molar de POPE en la monocapa, en el caso de DPPC-POPE esto fue corroborado por medio de microscopía de ángulo de Brewster. Como en otros sistemas lipídicos la presión superficial no es constante en la región de coexistencia. Para el sistema DPPC-POPE comprobamos que el módulo elástico de compresión incrementa con la cantidad de fase LC ,

pero no sigue un modelo simple de medio efectivo. En general podemos asumir que las diferencias ocurren debido a que al comprimir, los dominios crecen a una mayor velocidad que la velocidad de compresión, pero no lo suficientemente rápido como para alcanzar un equilibrio termodinámico, en el cual el módulo debería ser cero. Antes de alcanzar la fase *LC*, la fase condensada comienza a percolar y el módulo no cambia significativamente hasta que comienza el colapso de la monocapa. El umbral de percolación es considerablemente alto, lo cual sugiere que hay interacciones repulsivas entre los dominios. El comportamiento encontrado en el módulo de cizallamiento es consistente con esto.

En particular para el sistema DPPC-POPE, al observar imágenes de microscopía encontramos que aparece un cambio de forma de los dominios que ocurre en la solución equimolar. Este cambio de forma está relacionado con el cambio en la tensión lineal de los dominios, el cual los hace pasar de dominios tipo trisquel a dominios tipo alga-marina. En esta mezcla equimolar, el cambio abrupto en la pendiente de la isoterma es poco visible y ambos módulos de compresión y cizallamiento tienen un mínimo a presiones superficiales relativamente grandes. Al comparar monocapas que llegaron al 100 % de condensación podemos observar que la mezcla equimolar necesita una menor energía para ser comprimida, lo cual indica un mejor arreglo entre moléculas. Los cálculos de los módulos de cizalla en un rango de frecuencias muestran que el comportamiento de la mezcla equimolar tiene un cambio drástico al compararse con las demás, aumentando su módulo elástico a bajas frecuencias en comparación con las demás mezclas.

Para el sistema DPPC-nanopartículas reportamos un corrimiento en la tensión superficial del DPPC al realizar la mezcla. Esto indica que las nanopartículas comienzan a competir por la superficie incluso secuestrando moléculas lipídicas. Los resultados de reología interfacial muestran que las propiedades mecánicas se ven incrementadas (por el incremento de los módulos) al introducir las nanopartículas, esto sugiere una estructura más compleja donde puede existir adsorción y desorción de moléculas, de ahí que el módulo elástico no disminuya drásticamente como lo hace para DPPC puro.

Para resumir los datos encontrados: explicamos el comportamiento bajo compresión de las fases en coexistencia de las monocapas lipídicas y mezclas de ellas usando la dependencia con su respuesta mecánica. La percolación de los dominios originó información sobre las interacciones de los dominios. Encontramos una correlación entre los comportamientos mecánicos de compresión y cizallamiento.

Estos resultados son un paso más para un mejor entendimiento del comportamiento de las membranas biológicas y sus respuestas ante estímulos mecánicos. Estas membranas contienen no solo una mezcla de lípidos sino también proteínas y moléculas pequeñas como colesterol. Hoy en día se sabe de una actividad considerable en balsas lipídicas que no son otra cosa que una separación de fases dentro de una bicapa lipídica y donde las proteínas tienden a segregarse, esto es un hecho de suma importancia para el entendimiento de membranas y sus funciones. Así, clarificar el proceso de la separación de fases es una meta importante.

Capítulo 7

Perspectivas de este trabajo a futuro

Las perspectivas de este trabajo para el futuro son:

1. Realizar experimentos de reología interfacial y termodinámicos en mezclas de lípidos que incluyan nanopartículas para obtener información sobre su interacción en procesos biológicos modelo.
2. Comparar los resultados sobre la teoría de medio efectivo con mezclas de otros lípidos.
3. Continuar con la escritura de al menos otro artículo con los datos obtenidos.
4. Continuar con la construcción de un reómetro interfacial magnético.

En este tipo de sistemas aún quedan muchas preguntas que no tiene una respuesta a la que se pueda llegar de forma sencilla, por lo que hay mucho por hacer.

Apéndice A

Números adimensionales

A.1. Número de Deborah

Maxwell introdujo la idea de flujo viscoso como la manifestación del decaimiento en la energía elástica almacenada. Siguiendo este concepto veremos como surge naturalmente una cantidad adimensional, el número de Deborah (De). Consideremos una pieza de materia en la cual todas las moléculas o partículas (ya sean pequeñas o grandes) han tenido tiempo suficiente para difundirse y alcanzar un estado de mínima energía. Si se aplica una deformación instantánea que perturbe el material, almacenaremos energía porque la estructura ha sido alterada y las moléculas pasan a un estado de mayor energía. Si mantenemos la materia en esta nueva forma, poco a poco las moléculas comenzarán nuevamente a difundirse hasta alcanzar un estado de energía mínima equivalente al inicial, aún cuando la forma original se haya perdido, es decir, ocurrió un flujo viscoso. Podemos definir el tiempo característico que le toma en ocurrir a este proceso como el *tiempo de relajación de esfuerzo*, τ , del material. Con esto, definimos el número de Deborah como

$$De = \frac{\tau}{t} \tag{A.1}$$

La relajación del esfuerzo resultante en una deformación puede observarse experimentalmente y podemos darnos cuenta que es el resultado del

movimiento difusivo de los elementos microestructurales. De esta forma podemos clasificar los diferentes tipos de materiales en dependencia directa del tiempo t , es decir, del *tiempo de observación experimental*. Así, podemos clasificar el comportamiento de los materiales en tres categorías [128]

| | | |
|-------------|--------------------|--------------|
| $D_e \gg 1$ | $D_e \approx O(1)$ | $D_e \ll 1$ |
| tipo sólido | viscoelástico | tipo líquido |

El caso más comúnmente citado es el de la boligoma, hecha de polímero de dimetil-siloxano. Si se tirado fuertemente muestra fragilidad, como un sólido pero si tira suavemente fluye como un líquido viscoso. El tiempo de relajación para este material es $\approx 1s$. Después de $t = 5\tau$ el esfuerzo decae a un 0.7% de su valor inicial por lo que el material pierde su forma original. Esto es, se puede decir que el material tiene una memoria de $5s$. Muchos otros materiales de uso común tienen tiempos de relajación cercanos a $1s$. Entre ellos se encuentran los detergentes espesos, productos de higiene personal y pinturas de latex. Esto no es una coincidencia, y este tiempo de relajación es deliberadamente escogido ajustando las formulas para crearlos. La razón de esto es que $1s$ está en el centro de nuestra escala de tiempo, nuestro sistema nervioso responde en escalas de tiempo desde $1ms$ hasta $1ks$, si un material tiene un tiempo de relajación dentro de esta región, observaremos texturas útiles e interesantes.

A.2. Número de Péclet

Aunque el número de Deborah es puramente basado en mediciones experimentales, es decir, observaciones del comportamiento material de bulto. El número de Péclet, se determina por medio de la difusividad de los elementos microestructurales, y es una cantidad adimensional dada por la escala de tiempo del movimiento difusivo relativo al flujo convectivo. El coeficiente de difusión, D , es dado por la relación de Stokes-Einstein (para una partícula esférica difundiéndose en un medio viscoso):

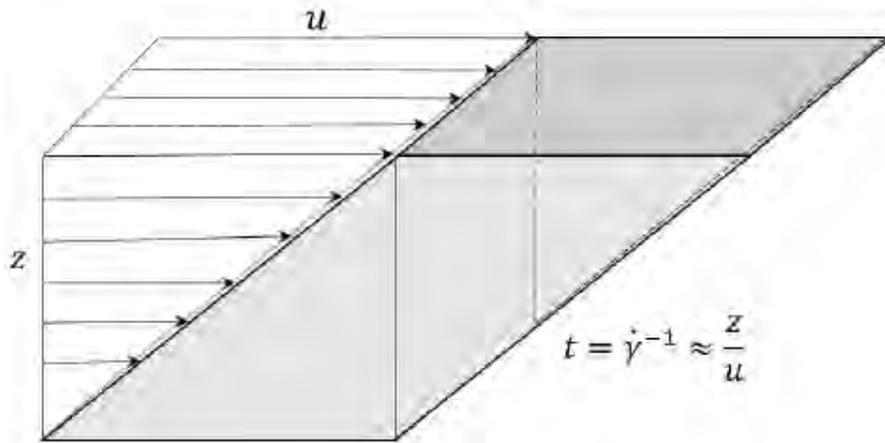


Figura A.1: El tiempo que toma por unidad de deformación en cizallamiento es $\dot{\gamma}^{-1} = z/u$.

$$D = \frac{\kappa_B T}{6\pi\eta_0 a} \quad (\text{A.2})$$

Donde κ_B es la constante de Boltzmann, η_0 la viscosidad del medio líquido, y a el radio de la partícula o molécula en difusión. Podemos usar la ecuación A.2 para estimar el tiempo que le toma a una partícula en difusión moverse un distancia característica. Por lo tanto, tiene sentido tomar el radio de la partícula como la distancia característica y con esto obtenemos la ecuación de Einstein-Smoluchowski [92]

$$t_a = \frac{a^2}{D} = \frac{6\pi\eta_0 a}{\kappa_B T} \cdot a^2$$

Y de esta forma

$$t_a = \frac{6\pi\eta_0 a^3}{\kappa_B T} \quad (\text{A.3})$$

El tiempo característico para el flujo en cizallamiento es el recíproco de la tasa de cizallamiento ($\dot{\gamma}^{-1}$). Esta tasa de cizallamiento es el tiempo que le toma a un elemento cúbico del material deformarse a un paralelogramo con ángulo de 45° como se muestra en la Figura A.1. El número de Péclet puede escribirse como:

$$P_e = \frac{6\pi\eta_0 a^3 \dot{\gamma}}{\kappa_B T} \quad (\text{A.4})$$

Un problema interesante surge cuando consideramos una solución coloidal compleja donde los componentes en difusión son mucho más grandes en tamaño que las moléculas del soluto. En sistemas diluidos la ecuación A.4 tendrá un valor adecuado pero no cuando el sistema se concentra más, es decir, el sistema en si se vuelve una fase condensada. Las interacciones entre los componentes en difusión disminuyen su movimiento e incrementan su viscosidad. La cantidad apropiada para esta situación debe contener la viscosidad del sistema y no la del medio y por lo tanto obtenemos

$$P_e = \frac{6\pi a^3 \sigma}{\kappa_B T} \quad (\text{A.5})$$

Donde el esfuerzo de cizallamiento, $\sigma = \eta\dot{\gamma}$, ha sido utilizado para hacer una clara distinción con respecto a la ecuación A.1.

A.3. Número de Weissenberg

El número de Weissenberg es un número adimensional utilizado en el estudio de flujos viscoelásticos y fue llamado así por Karl Weissenberg. Este número compara los efectos debidos a las fuerzas viscosas y las fuerzas elásticas. Puede escribirse de varias formas, pero usualmente está dado por la relación entre el tiempo de relajación del esfuerzo del fluido y un proceso de tiempo específico. Por ejemplo, en un esfuerzo de cizallamiento simple, el número de Weissenberg está definido como la tasa de cizallamiento $\dot{\gamma}$ multiplicado por el tiempo de relajación τ

$$W_e = \frac{\text{Fuerzas viscosas}}{\text{Fuerzas elásticas}} = \frac{\mu\dot{\gamma}}{Eu} = \dot{\gamma}\tau \quad (\text{A.6})$$

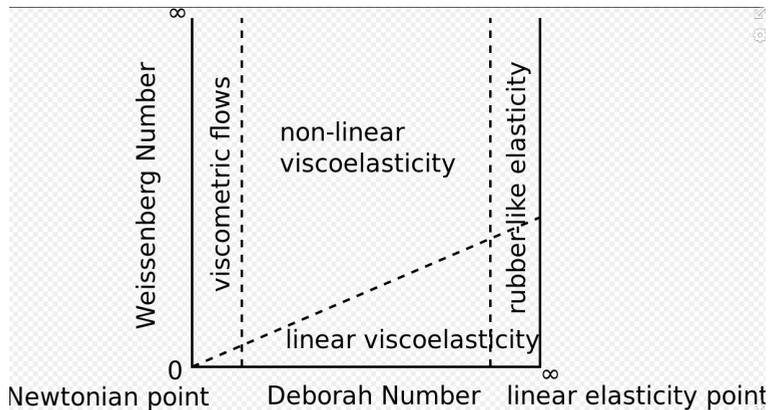


Figura A.2: Muestra los diferentes comportamientos del fluido al comparar los valores del número de Weissenberg y el número de Deborah.

Donde μ es la viscosidad dinámica, E es el módulo elástico de compresión y u es la deformación de compresión. Ya que este número es obtenido de un escalamiento en el esfuerzo por medio de los tiempos de observación, puede escribirse de diferentes formas dependiendo la tasa de cizallamiento o de compresión, y de la longitud característica del sistema.

En la literatura usualmente se confunde el número de Weissenberg con el número de Deborah. Sin embargo, su significado físico es diferente. El número de Weissenberg indica el grado de anisotropía u orientación generado por la deformación y es apropiado para describir el flujo bajo esfuerzos constantes [129, 130], tal como cizallamiento simple. A diferencia del número de Deborah que debe usarse para describir flujos que se encuentran bajo esfuerzos no constantes [131] usados en materiales elásticos, y físicamente representa la tasa a la cual la energía elástica es almacenada o liberada.

A.4. Número de Boussinesq

Cuando se diseña un aparato que mida las propiedades interfaciales deben de tener un sensibilidad adecuada para detectar los esfuerzos en la superficie en presencia de la subfase. Para describir más detalladamente

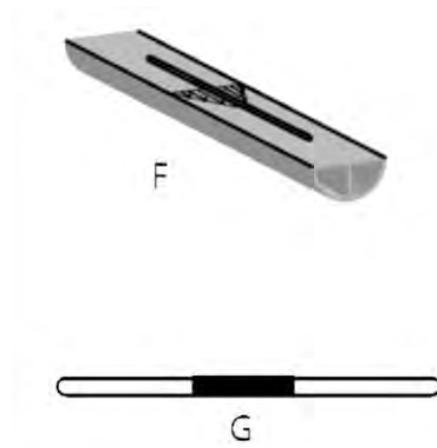


Figura A.3: La geometría de la aguja magnética permite una mejor medición de las propiedades interfaciales.

las interacciones entre la monocapa con la subfase, es necesario el uso de un número adimensional que relacione los dos componentes de arrastre experimentados por alguna sonda reológica

$$B_0 = \frac{\text{arrastre superficial}}{\text{Arrastre de la subfase}} = \frac{\mu_s \frac{v}{L'_c} P_c}{\mu \frac{v}{L''_c} A_c} = \frac{\mu_s}{\mu} \frac{P_c}{A_c} \frac{L''_c}{L'_c} \quad (\text{A.7})$$

Donde B_0 es conocido como el número de Boussinesq [132], μ representa la viscosidad de la subfase, μ_s la viscosidad superficial, v la velocidad característica, L'_c y L''_c son las escalas de longitud característica a las cuales la velocidad decae en la superficie y en la subfase, respectivamente, P_c es el perímetro de contacto entre la sonda reológica y la interface, y A_c es el área de contacto entre la sonda y la subfase. Podemos reescribir el número de Boussinesq como

$$B_0 = \frac{\mu_s}{\mu a} \quad (\text{A.8})$$

Donde a es un parámetro con unidades de longitud y está relacionado con la geometría de la sonda [133].

1. Si la sonda tiene una geometría bicónica o de anillo, el parámetro está relacionado con el radio de la figura y su valor se encuentra usualmente en el orden de centímetros.
2. Para la sonda magnética (Figura A.3), la cual fue usada en esta tesis, el parámetro está determinado por el radio de la aguja y se encuentra en el orden de milímetros.

Cuando $B_0 \gg 1$, el arrastre experimentado por la sonda predomina por las interacciones superficiales; cuando $B_0 \ll 1$, se están midiendo principalmente las propiedades de la subfase. Así, la forma de la sonda estará directamente relacionada con la medición de las propiedades interfaciales al variar P_c y A_c (parámetro a de la geometría). El número de Boussinesq refleja un criterio que relaciona la importancia de la reología de bulto con la interfacial. En general, este número será relativamente más grande mientras más grande sea la adsorción del surfactante que tiene el efecto de producir una viscosidad interfacial grande.

Apéndice B

Métodos numéricos

B.1. Derivación: Módulos de compresibilidad

En nuestros experimentos la variable Π depende del área molecular A , es decir, $\Pi = \Pi(A)$, pero sólo conocemos los valores de Π en un conjunto finito de puntos, obtenidos de información experimental:

$$(A_1, \Pi_1), (A_2, \Pi_2), \dots, (A_n, \Pi_n) \quad (\text{B.1})$$

Para continuar los cálculos de módulos de compresibilidad necesitamos encontrar la derivada de esta función discontinua. Nuestro objetivo es aproximar la pendiente de la curva Π en un punto particular $A = A_i$ en términos de $\Pi(A_i) = \Pi_i$ y el valor de Π en el punto siguiente $A = A_{i+1}$ dado por Π_{i+1} . De cursos básicos de cálculo:

$$\Pi'(A_i) = \Pi'_i \approx \frac{\Pi_{i+1} - \Pi_i}{A_{i+1} - A_i} \quad (\text{B.2})$$

Esta es la diferencia dividida de primer orden por el lado derecho. Un método alternativo es usar la diferencia dividida por el lado izquierdo, dada por:

$$\Pi'(A_i) \approx \frac{\Pi_i - \Pi_{i-1}}{A_i - A_{i-1}} \quad (\text{B.3})$$

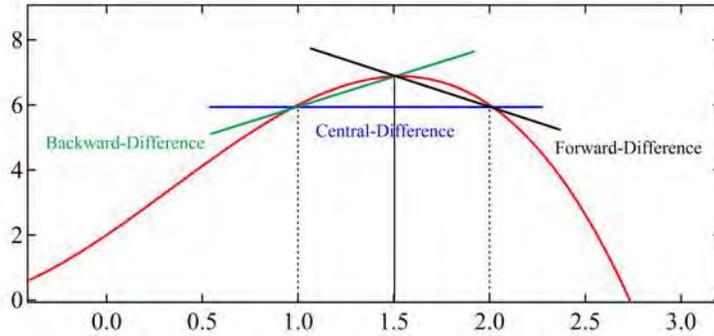


Figura B.1: Las tres diferentes aproximaciones para Π' .

Ya que los errores del lado derecho e izquierdo tienen signos diferentes, se puede usar un promedio entre ambos métodos, dando un mejor resultado que al usar alguno de ellos por sí solo.

Si los puntos están igualmente espaciados (las mediciones son realizadas con el mismo espacio de tiempo por lo que el área se reduce de la misma forma), es decir, $A_{i+1} - A_i = A_i - A_{i-1} = h$, entonces el promediar hacia a la izquierda y hacia la derecha nos lleva a una expresión simétrica (Figura B.1):

$$\Pi'_i \approx \frac{\Pi_{i+1} - \Pi_{i-1}}{2h} \quad (\text{B.4})$$

conocidas como *diferencias centrales*. En los experimentos las variaciones de la presión a grandes áreas por molécula son muy sensibles por lo que a veces no basta con hacer la aproximación de la ecuación B.4, si no que es necesario tomar otros puntos más alejados al punto de interés.

B.2. Integración: Energías de mezclado

En el caso de las energías de Gibbs de mezclado ΔG , usamos el método numérico de la regla del trapecio para aproximar el valor de la integral

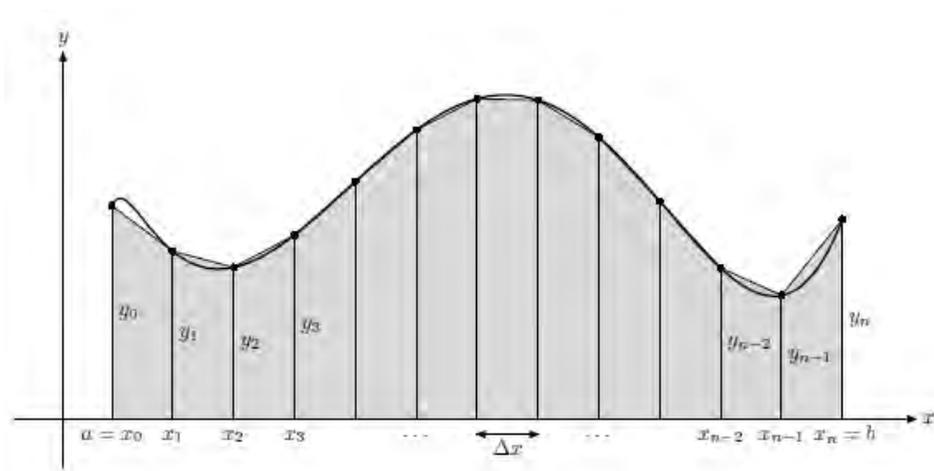


Figura B.2: Subdivisión del intervalo para obtener la integral de la función $A(\Pi)$.

definida de $A(\Pi)$, obtenida experimentalmente:

$$\int_0^{\Pi} A(\pi) d\pi \quad (\text{B.5})$$

Ya que la función está compuesta por un número finito de puntos en el intervalo $[0, \Pi]$, el cual podemos dividir en n subintervalos de igual longitud

$$\Delta\pi = \frac{\Pi}{n} \quad (\text{B.6})$$

Usando los $n + 1$ puntos (Figura B.2)

$$\pi_0 = 0, \quad \pi_1 = \Delta\pi, \quad \pi_2 = 2\Delta\pi, \quad \dots, \quad \pi_n = n\Delta\pi = \Pi$$

Donde podemos obtener cada uno de estos valores de los datos experimentales

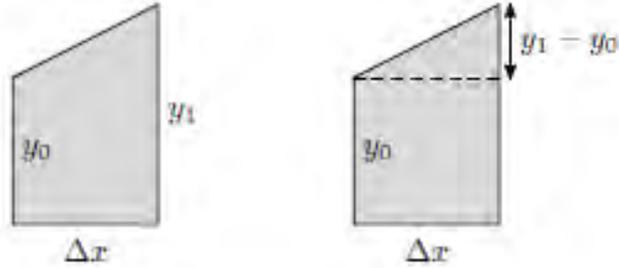


Figura B.3: Áreas de trapezoides separándolos en su correspondiente triángulo y rectángulo.

$$A_0 = A(\Pi_0), \quad A_1 = A(\Pi_1), \quad A_2 = A(\Pi_2), \dots, A_n = A(\Pi_n)$$

Una vez obtenidos los valores A y π podemos aproximar la integral usando los n trapezoides que se forman entre cada par de puntos (π_{i-1}, A_{i-1}) y (π_i, A_i) , para $1 \leq i \leq n$, uniéndolos con una línea recta.

El área de cada trapezoide es obtenida sumando el área del rectángulo y del triángulo formados en cada trapezoide (Figura B.3)

$$Area = A_0 \Delta\pi + \frac{1}{2}(A_1 - A_0)\Delta\pi = \frac{(A_0 + A_1)\Delta\pi}{2}$$

Así, si sumamos las áreas de los n trapezoides, obtenemos la aproximación:

$$\int_0^{\Pi} A(\pi) d\pi \approx \frac{(A_0 + A_1)\Delta\pi}{2} + \frac{(A_1 + A_2)\Delta\pi}{2} \\ + \frac{(A_2 + A_3)\Delta\pi}{2} + \dots + \frac{(A_{n-1} + A_n)\Delta\pi}{2}$$

Que se puede simplificar para obtener la formula para la regla del trapecio

$$\int_0^{\Pi} A(\pi)d\pi \approx \frac{\Delta\pi}{2} (A_0 + 2A_1 + 2A_2 + \cdots + 2A_{n-1} + A_n) \quad (\text{B.7})$$

Apéndice C

Cálculo de áreas condensadas

Las imágenes obtenidas por medio de BAM fueron tratadas con ImageJ. El primer paso es aplanar la imagen usando un filtro bandpass con condiciones diferentes para cada imagen, aunque en general los mismos parámetros funcionan. En algunas ocasiones después del filtro es necesario realzar el contraste entre los dominios y el fondo. Como último paso se convierte la imagen a binaria la cual solo consta de blancos y negros (ver Figura D.9).

Una vez obtenida la imagen binaria se obtienen histogramas sobre los píxeles, del cual usando la ecuación

$$A_c(\%) = \frac{Pix_{blancos}}{Pix_{negros}} \times 100 \quad (C.1)$$

se obtiene el porcentaje de área condensada. Y el porcentaje de área en fase expandida es $A_e = 100 - A_c$.

C.1. Cálculo de Errores

Los errores de la medición de áreas a una presión fija fueron calculados midiendo de 2 a 3 imágenes y en diferentes lugares. Las figuras C.2 y C.3 muestran ejemplos de monocapas de DPPC a las cuales se tomaron 3

imágenes diferentes a la misma presión y se calcularon sus áreas.

Para monocapas de DPPC a una presión de 5.2mN/m, la Figura C.2-Arriba se tiene

$$A_{1c}(\%) = 100 \times \frac{Pix_{blancos}}{Pix_{negros}} = 100 \times \frac{19795}{418704} = 4.728\%$$

Para la Figura C.2-Medio se tiene

$$A_{2c}(\%) = 100 \times \frac{Pix_{blancos}}{Pix_{negros}} = 100 \times \frac{16247}{429026} = 3.898\%$$

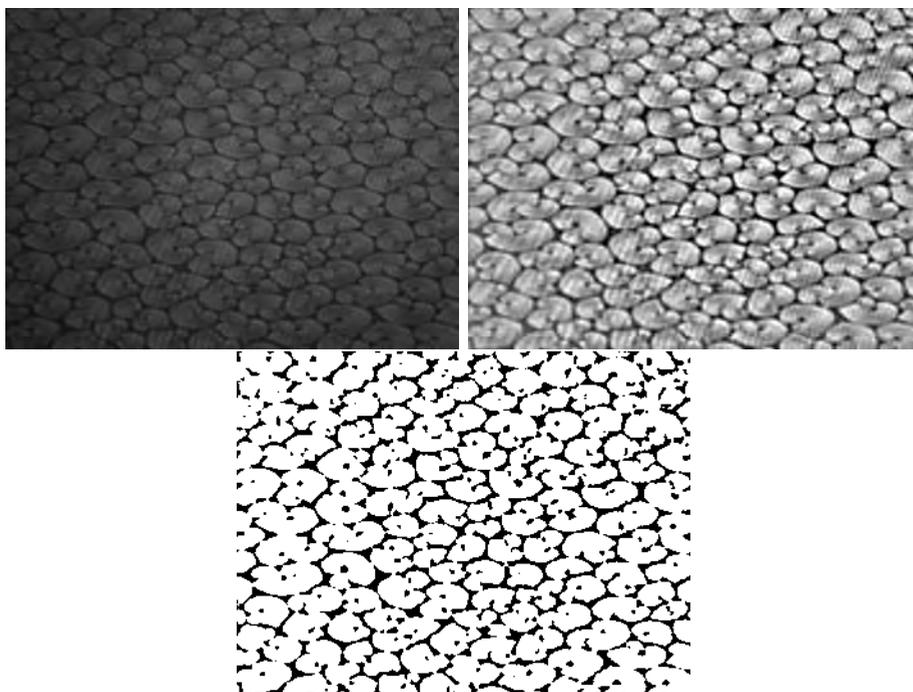


Figura C.1: **Izquierda-Arriba.** Imagen original. **Derecha-Arriba.** Imagen después del filtro. **Abajo.** Imagen binaria.

Para la Figura C.2-Abajo se tiene

$$A_{3c}(\%) = 100 \times \frac{Pix_{blancos}}{Pix_{negros}} = 100 \times \frac{27031}{4209026} = 6.288 \%$$

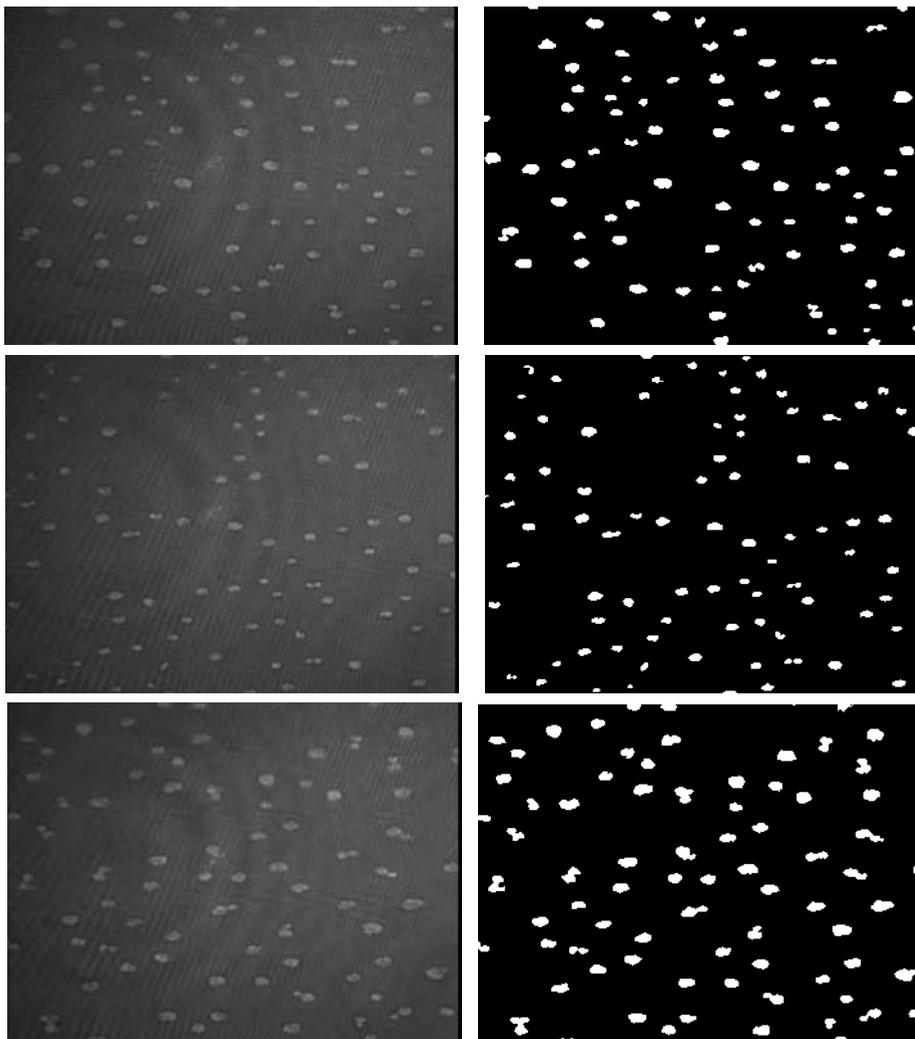


Figura C.2: **Izquierda.** Imágenes originales de monocapas de DPPC a 5.2mN/m de presión superficial. **Derecha.** Imágenes binarias correspondientes.

De estos resultados obtenemos el promedio

$$\bar{A}_c(\%) = \frac{A_{1c}(\%) + A_{2c}(\%) + A_{3c}(\%)}{3} = 4.971\%$$

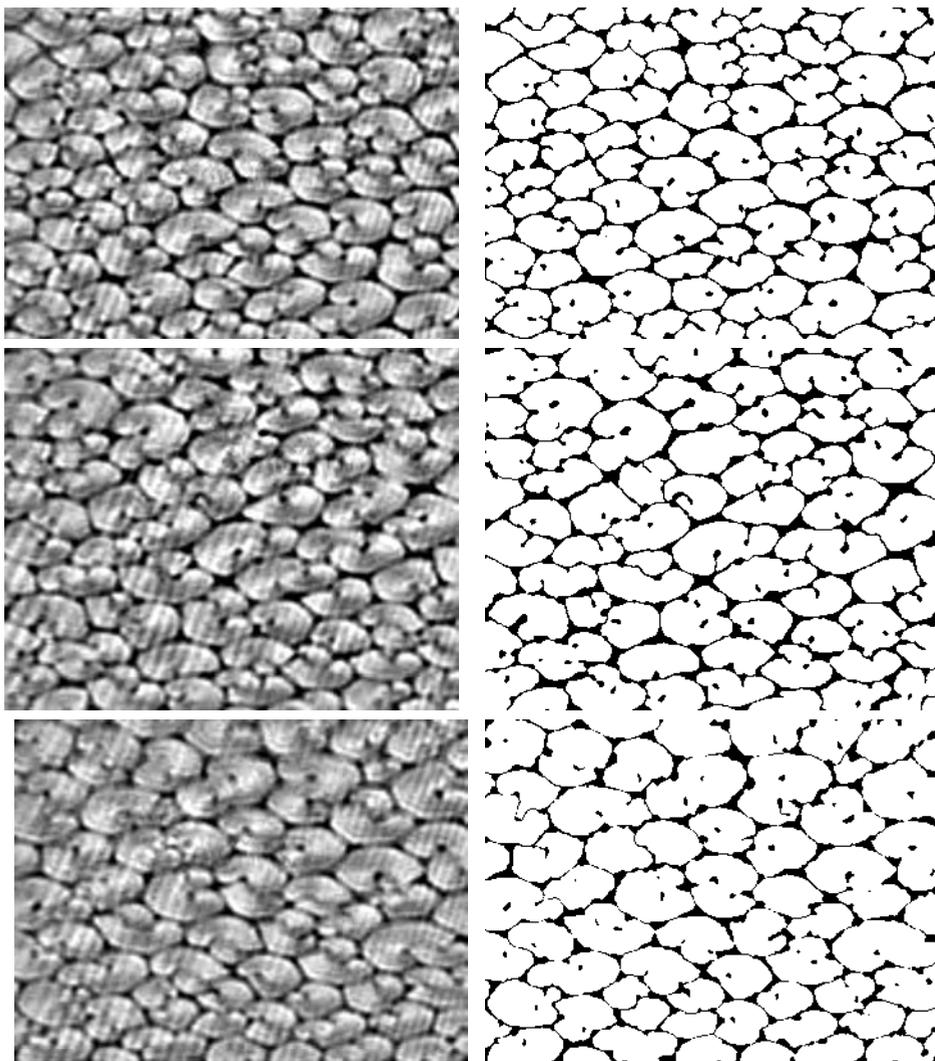


Figura C.3: **Izquierda.** Imágenes después del filtro bandpass y realzado de contraste de monocapas de DPPC a 10.0mN/m de presión superficial. **Derecha.** Imágenes binarias correspondientes.

y también la desviación estándar

$$\Delta A_c(\%) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\bar{A}_c(\%) - A_{ic}(\%))^2}{N-1}} = 1.21\%$$

Para monocapas de DPPC a una presión de 10.0mN/m, la Figura C.3-Arriba se tiene

$$A_{1c}(\%) = 100 \times \frac{Pix_{blancos}}{Pix_{negros}} = 100 \times \frac{145905}{172398} = 84.633\%$$

Para la Figura C.3-Medio se tiene

$$A_{2c}(\%) = 100 \times \frac{Pix_{blancos}}{Pix_{negros}} = 100 \times \frac{146313}{173724} = 84.221\%$$

Para la Figura C.2-Abajo se tiene

$$A_{3c}(\%) = 100 \times \frac{Pix_{blancos}}{Pix_{negros}} = 100 \times \frac{138460}{158355} = 87.436\%$$

De estos resultados obtenemos el promedio

$$\bar{A}_c(\%) = \frac{A_{1c}(\%) + A_{2c}(\%) + A_{3c}(\%)}{3} = 85.43\%$$

y también la desviación estándar

$$\Delta A_c(\%) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\bar{A}_c(\%) - A_{ic}(\%))^2}{N-1}} = 1.74\%$$

Los resultados obtenidos para presiones son

$$A_{ec}(\%) = 4.971 \pm 1.21\%$$

$$A_{ec}(\%) = 85.43 \pm 1.74\%$$

para 5.2mN/m y 10.0mN/m respectivamente. En general el error en el porcentaje de área condensada no supera el 2%.

Apéndice D

Imágenes de BAM

En este apéndice se muestran imágenes de BAM representativas de cada mezcla en las siguientes presiones:

1. 6mN/m
2. 12mN/m
3. 18mN/m
4. 25mN/m
5. 30mN/m
6. 35mN/m
7. 40mN/m

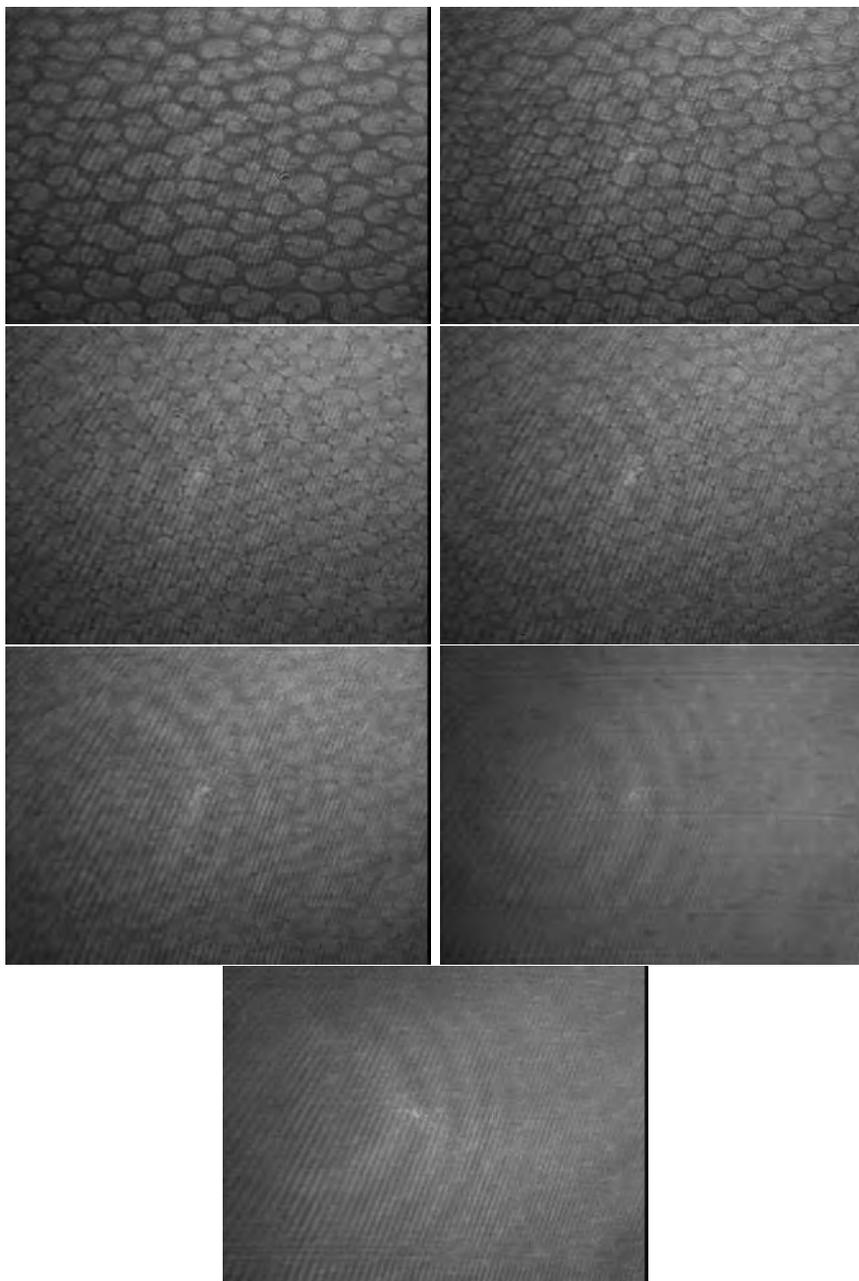


Figura D.1: Imágenes de BAM para la mezcla $\chi_{DPPC} = 1.00$, las imágenes son para presiones alrededor de 6 mN/m, 12 mN/m, 18 mN/m, 25 mN/m, 30 mN/m, 35 mN/m y 40 mN/m.

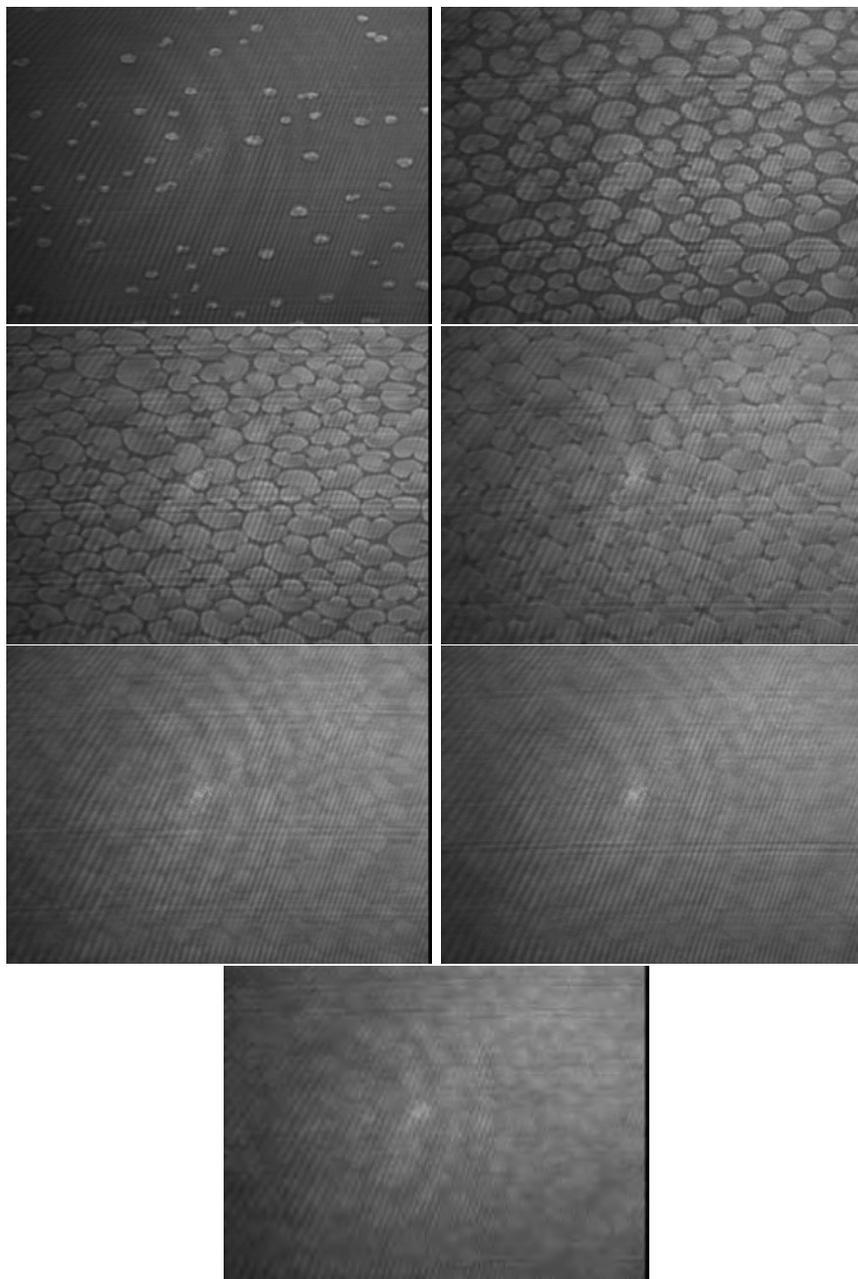


Figura D.2: Imágenes de BAM para la mezcla $\chi_{DPPC} = 0.90$, las imágenes son para presiones alrededor de 6 mN/m, 12 mN/m, 18 mN/m, 25 mN/m, 30 mN/m, 35 mN/m y 40 mN/m.

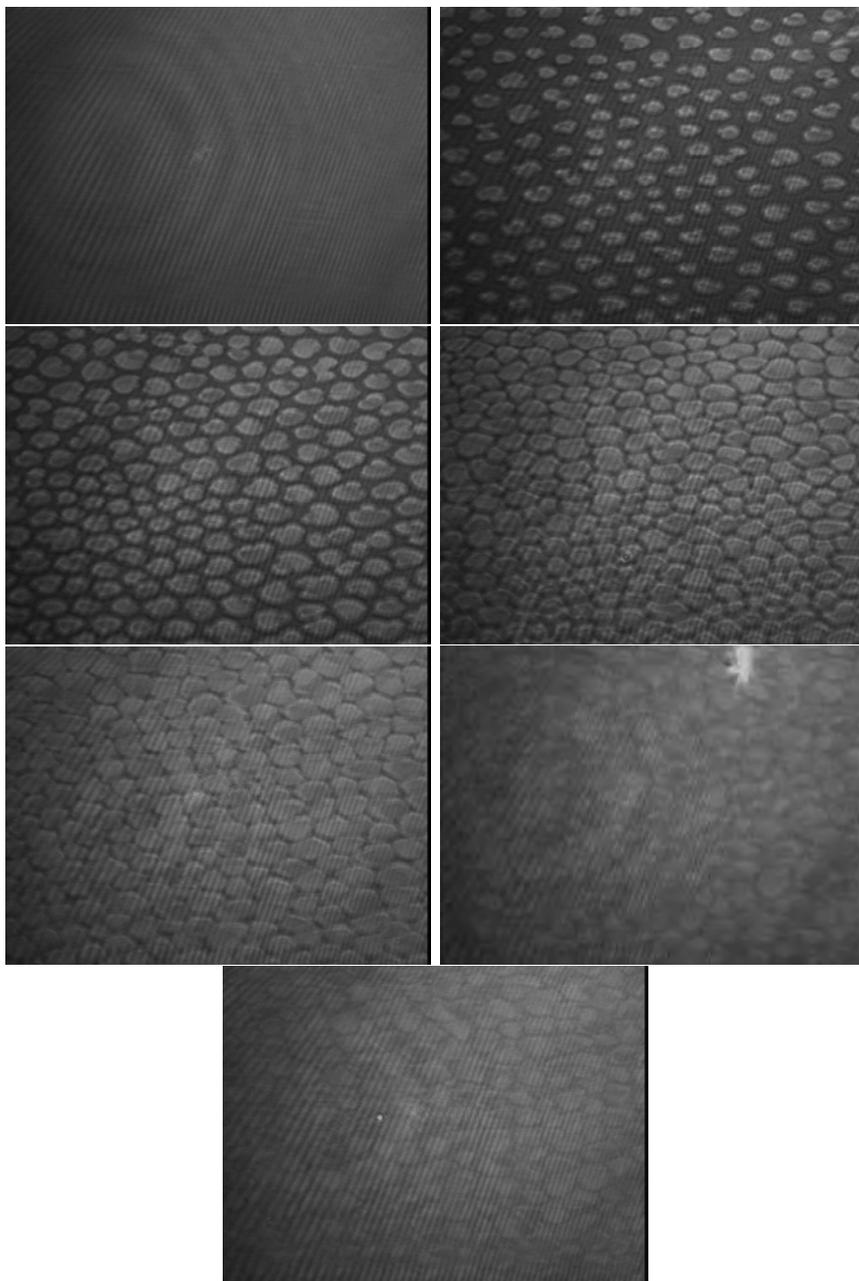


Figura D.3: Imágenes de BAM para la mezcla $\chi_{DPPC} = 0.80$, las imágenes son para presiones alrededor de 6 mN/m, 12 mN/m, 18 mN/m, 25 mN/m, 30 mN/m, 35 mN/m y 40 mN/m.

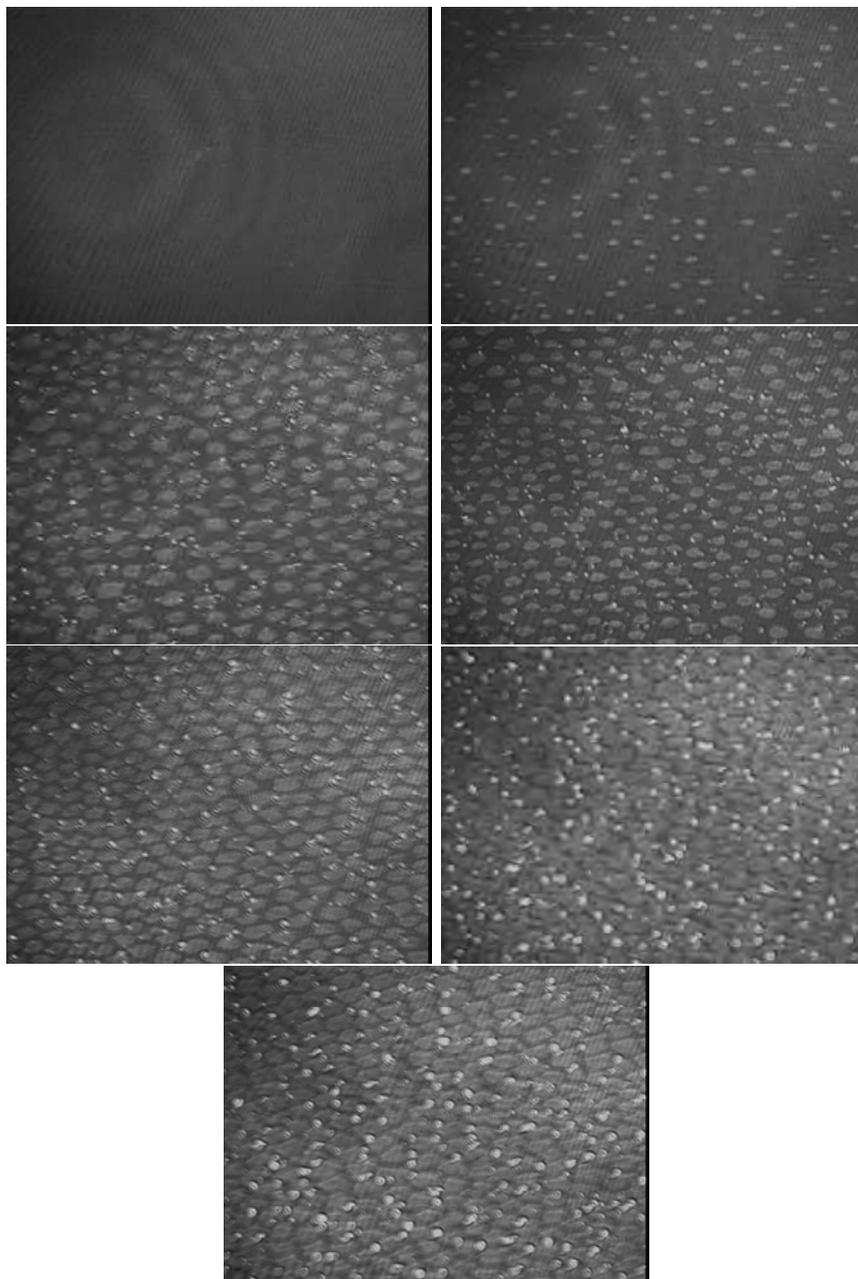


Figura D.4: Imágenes de BAM para la mezcla $\chi_{DPPC} = 0.70$, las imágenes son para presiones alrededor de 6 mN/m, 12 mN/m, 18 mN/m, 25 mN/m, 30 mN/m, 35 mN/m y 40 mN/m.

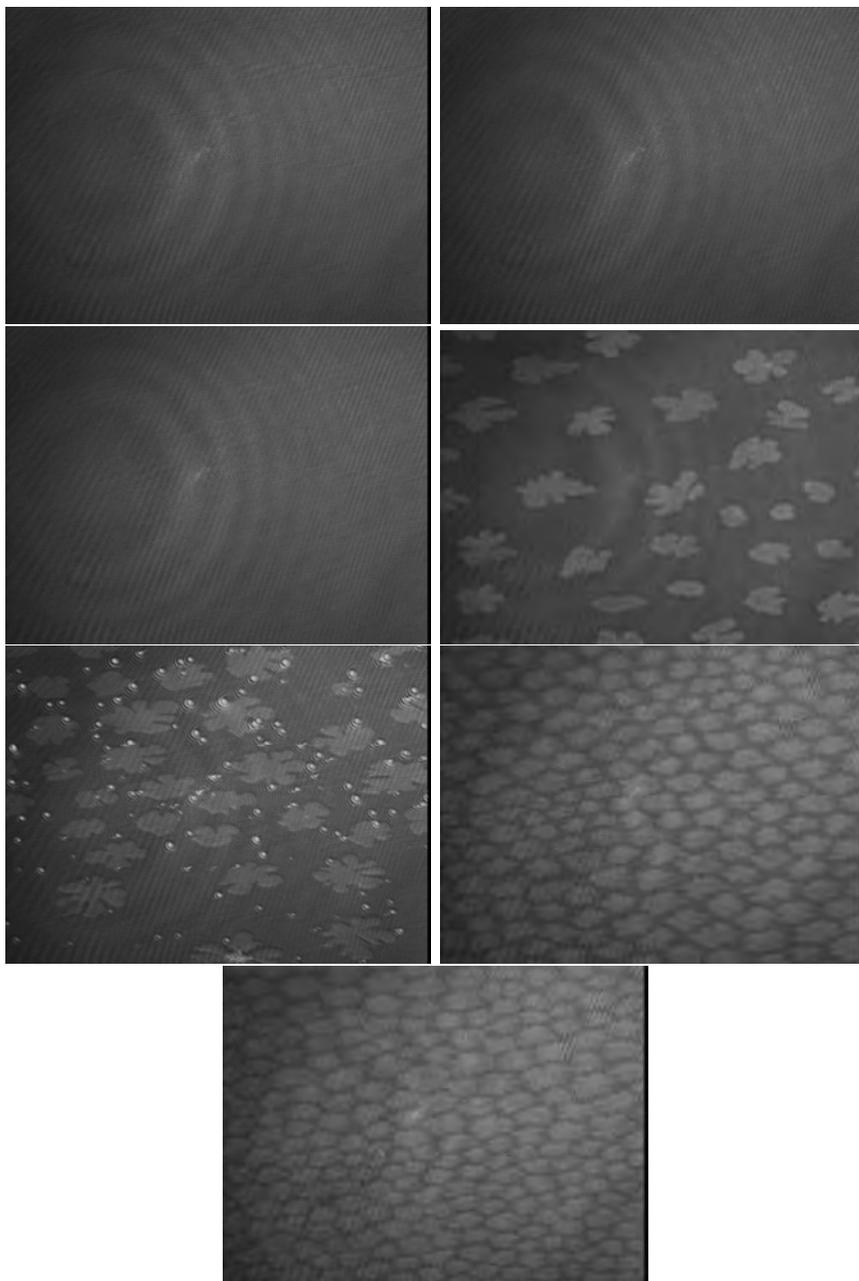


Figura D.5: Imágenes de BAM para la mezcla $\chi_{DPPC} = 0.50$, las imágenes son para presiones alrededor de 6 mN/m, 12 mN/m, 18 mN/m, 25 mN/m, 30 mN/m, 35 mN/m y 40 mN/m.

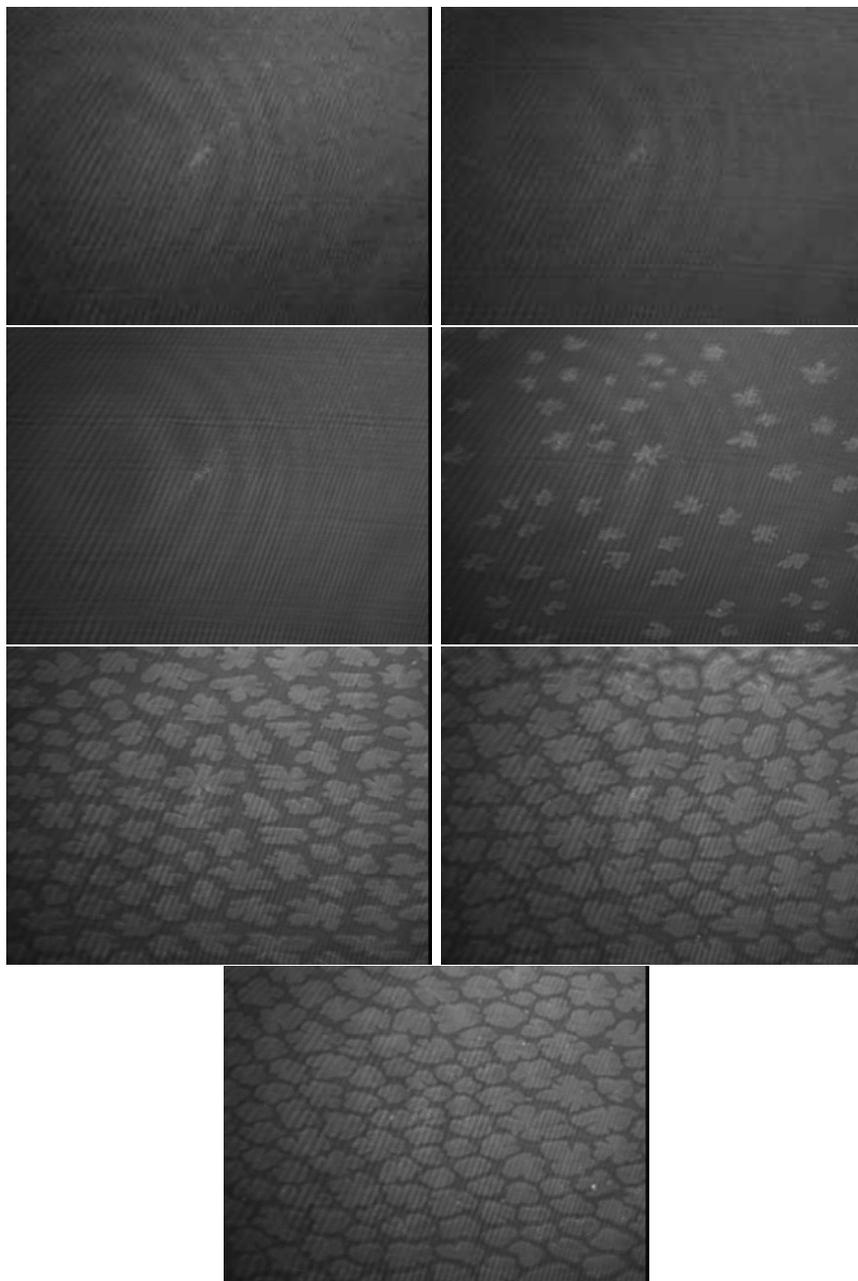


Figura D.6: Imágenes de BAM para la mezcla $\chi_{DPPC} = 0.35$, las imágenes son para presiones alrededor de 6 mN/m, 12 mN/m, 18 mN/m, 25 mN/m, 30 mN/m, 35 mN/m y 40 mN/m.

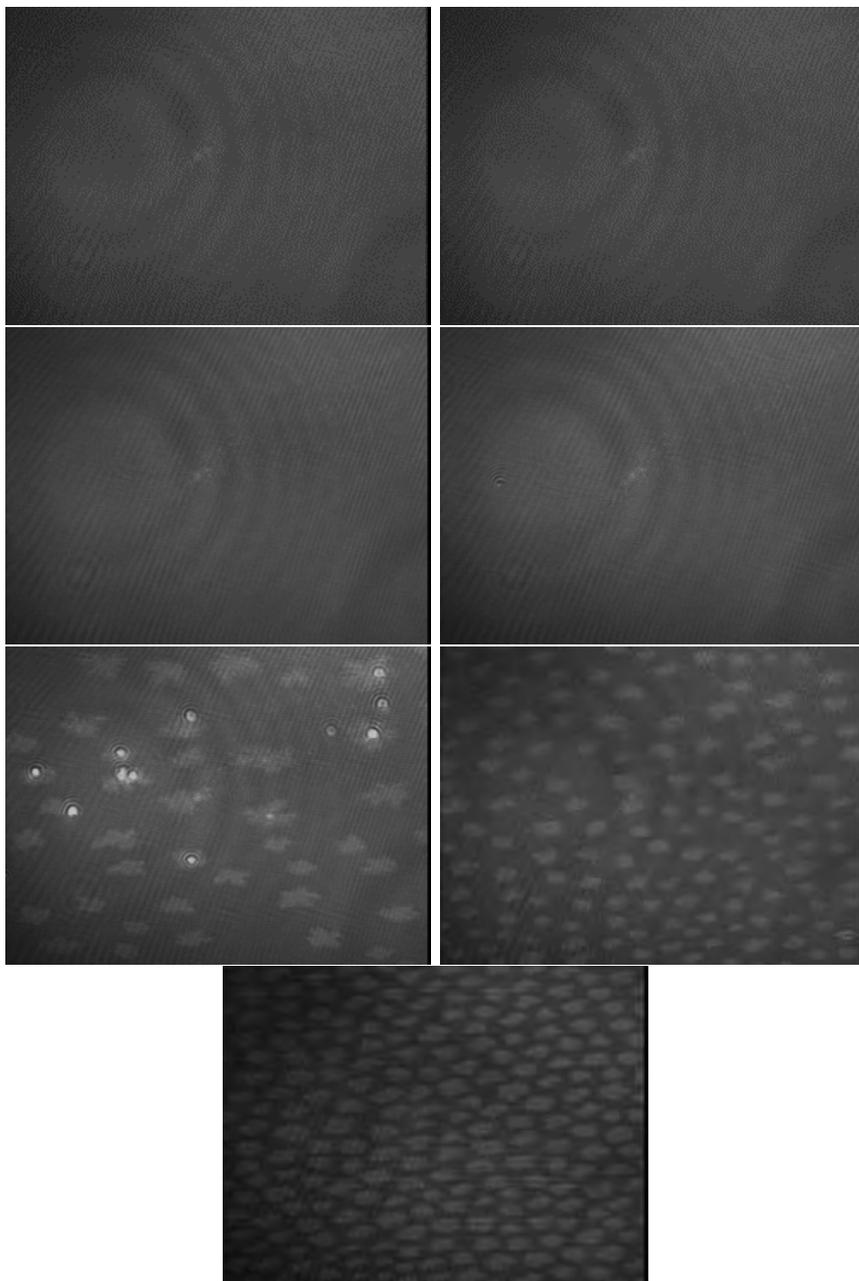


Figura D.7: Imágenes de BAM para la mezcla $\chi_{DPPC} = 0.25$, las imágenes son para presiones alrededor de 6 mN/m, 12 mN/m, 18 mN/m, 25 mN/m, 30 mN/m, 35 mN/m y 40 mN/m.

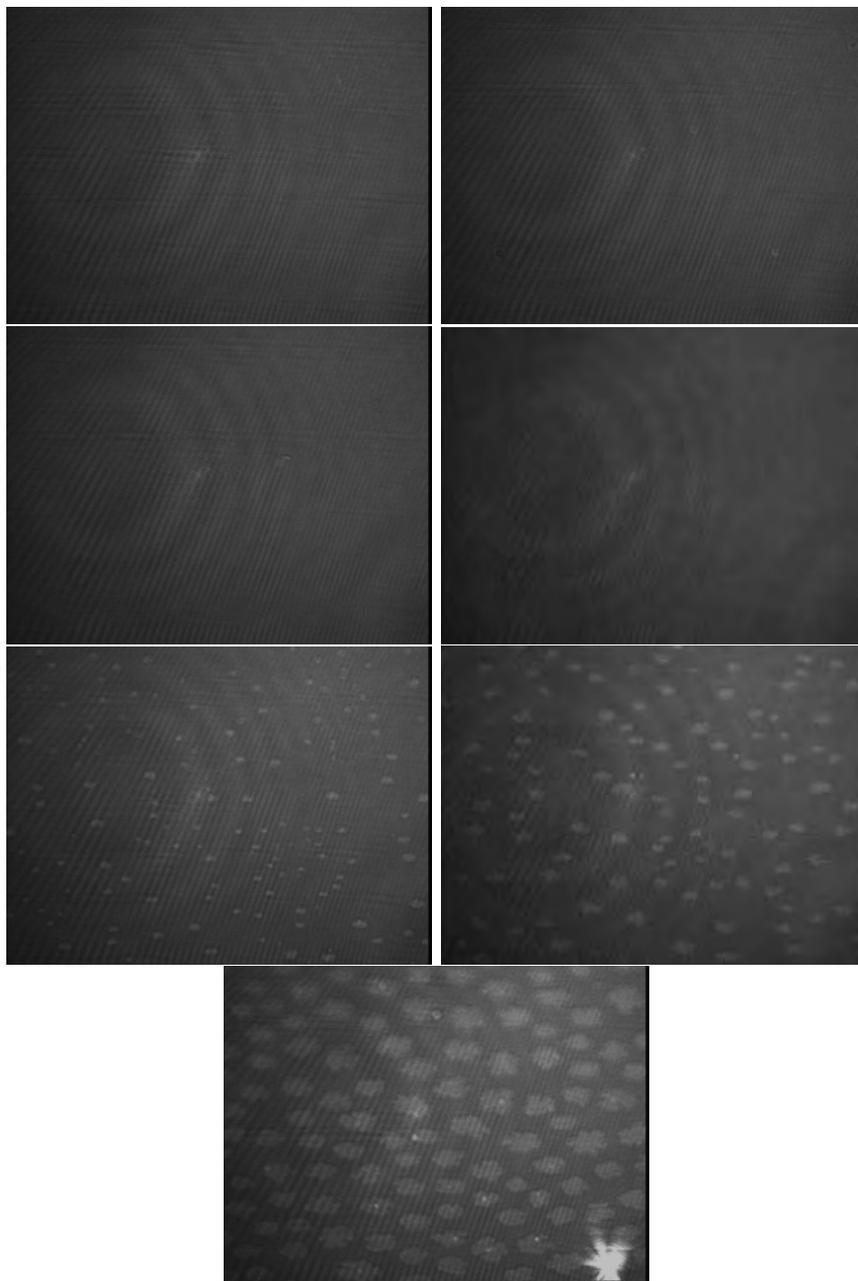


Figura D.8: Imágenes de BAM para la mezcla $\chi_{DPPC} = 0.15$, las imágenes son para presiones alrededor de 6 mN/m, 12 mN/m, 18 mN/m, 25 mN/m, 30 mN/m, 35 mN/m y 40 mN/m.

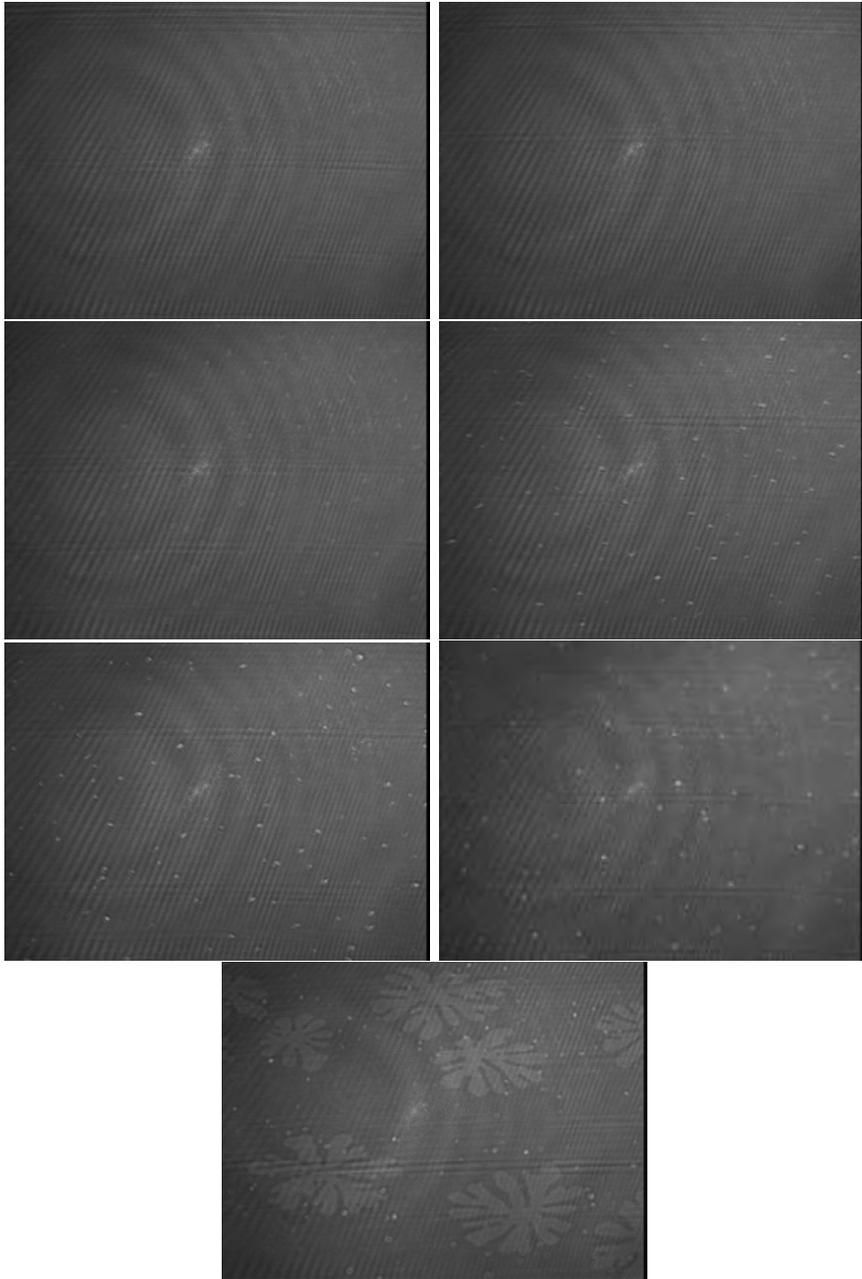


Figura D.9: Imágenes de BAM para la mezcla $\chi_{DPPC} = 0.00$, las imágenes son para presiones alrededor de 6 mN/m, 12 mN/m, 18 mN/m, 25 mN/m, 30 mN/m, 35 mN/m y 40 mN/m.

Bibliografía

- [1] Pliny. Natural history, praefatio, libri i, ii, with and english translation. *Harvard University Press*, Volume I, First printing 1938.
- [2] Giles C. H. Franklins teanspoonful of oil - studies in the early history of surface chemistry, part 1. *Chem. Ind.*, (1616-1624), 1969.
- [3] Benjamin Franklin, William Brownrigg, and Mr. Farish. On the stilling of waves by means of oil. *Philosophical Transactions Royal Society*, 64, 1774.
- [4] Lord Rayleigh. Measurements of the amount of oil necessary in order to check the motions of camphor upon water. *The Royal Society*, 47(364-367), 1890.
- [5] Agnes Pockels. On the relative contamination of the water-surface by equal quantities of different substances. *Nature*, 46(418-419), 1892.
- [6] Agnes Pockels. Surface tension. *Nature*, 43(437-439), 1891.
- [7] Wilhelm Pfeffer. Osmotische untersuchungen: Studien zur zellme chanik. *W. Engelmann*, 187.
- [8] Charles Ernest Overton. Über die osmotischen eigenschaften der lebenden phlazen und tierzelle. *Vierteljahresschrift Naturforsch. Ges. Zürich*, (189-209), 1895.
- [9] Irving Langmuir. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. ii. liquids. *J. American Chemical Society*, 39(1848-1906), 1917.

- [10] Thomas Heimburg. Thermal biophysics of membranes. *Wiley-VCH*, (Capítulo 6), 2007.
- [11] Gorter E. and Grendel F. On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *J. Exp. Med.*, 41(439-443), 1925.
- [12] Danielli J. F. and Davson H. A contribution to the theory of permeability of thin films. *J. Cell Comp. Physiology*, 5(495-508), 1935.
- [13] Robertson J. D. New observations on the ultrastructure of the membranes of frog peripheral nerve fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 3(1043-1047), 1957.
- [14] Singer S. J. and Nicolson G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(720-731), 1972.
- [15] Unwin N. and Henderson R. The structure of proteins in biological membranes. *Scientific American*, 250(78-94), 1984.
- [16] Simons K. and Meers G. V. Perspectives in biochemistry lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*, 175(720-731), 1988.
- [17] Joseph Antoine Ferdinand Plateau. Statique expérimentale et théorique des liquides soumis aux seules forces moléculaires. *Paris: Gauthier-Villars*, 1873.
- [18] Carlo Marangoni. The principle of the surface viscosity of liquids established by mr. j. plateau. *Nuovo Cimento*, 2(239-273), 1872.
- [19] Lord Rayleigh. On the superficial viscosity of water. *Proc. R. Soc. Lond.*, 48(127-140), 1890.
- [20] Joseph Boussinesq. Existence of a superficial viscosity in the thin transition layer separating one liquid from another contiguous fluid. *C. R. Acad. Sci.*, 156(983-989), 1913.
- [21] Steven Vandebril, Aly Franck, Gerald Fuller, Paula Moldenaers, and Jan Vermant. A double wall-ring geometry for interfacial shear rheometry. *Rheologica Acta*, 49(131-144), 2009.

- [22] Gabriel Espinosa, Iván López-Montero, Francisco Monroy, and Dominique Langevin. Shear rheology of lipid monolayers and insights on membrane fluidity. *PNAS*, 2011.
- [23] Saba Ghazvini, Brandon Ricke, J. A. Zasadzinski, and Prajnaparamia Dhar. Monitoring phases and phase transitions in phosphatidylethanolamine monolayers using active interfacial microrheology. *Soft Matter*, 11, 2015.
- [24] Natalia Wilke, D. Vega Mercado, and B. Maggio. Rheological properties of a two phase lipid monolayer at the air/water interface: Effect of the composition of the mixture. *Langmuir*, 26, 13(11050-11059), 2010.
- [25] B. Alberts, D. Bray, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson, and P. Walter. Molecular biology of the cell. 5th edition. *Garland Science, New York*, 2008.
- [26] Björn Lindman and Paschalis Alexandridis. Chapter 1 amphiphilic molecules, small and large. *Amphiphilic Block Copolymers, self assembly and applications.*, Elsevier 2000.
- [27] J. O. Radler, I. Koltover, T. Salditt, and C. R. Safinya. Structure of dna-cationic liposome complexes: Dna intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science*, 275(810-814), 1997.
- [28] Elisa R. Catapano, Laura R. Arriaga, Espinosa, Francisco Monroy, Dominique Langevin, and Iván Lopez-Montero. Solid character of membrane ceramides: a surface rheology study of their mixture with sphingomyelin. *Biophysical Journal*, 101(2721-2730), 2011.
- [29] R. A. Demel and B. Kruyff. The function of sterols in membranes. *Biophysical Journal*, 457(109-132), 2002.
- [30] G. M. Cooper and R. E. Hausman. The cell. a molecular approach. *Sinauer Associates, Sunderland USA*, 5th edition, 2009.
- [31] Kai Simons and Derek Tommre. Lipid rafts and signaling transduction. *Nature reviews*, 1(31-41), 2000.

- [32] D. A. Brown and E. London. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 14(111-36), 1998.
- [33] Geoffrey Zubay. Biochemistry. *Brown, Dubuque, Iowa*, 3rd edition, 1993.
- [34] Ole G. Mouritsen. Life - as a matter of fat. the emerging science of lipidomics. *Springer*, 2005.
- [35] Krister Holmberg, Bo Jonsson, Bengt Kronberg, and Bjorn Lindman. Surfactant and polymers in aqueous solution. *John Wiley and sons, LTD*, Second edition, 2002.
- [36] G. S. Hartley. Aqueous solutions of paraffinic-chain salts. a study of micelle formation. *Plenum Press, New York*, (p. 23), 1936.
- [37] C. Tanford. The hydrophobic effect. *John Wiley and Sons, New York*, 1980.
- [38] D. Myers. Surfactant science and technology. *VCH Publ. Inc., Weinheim, Germany*, 1988.
- [39] Y. Moroi. Micelles: Theoretical and applied aspects. *Plenum Press, New York*, 1992.
- [40] Maurice Kleman and Oleg D. Lavrentovich. Soft matter physics an introduction. *Springer-Verlag New York, Inc.*, 2003.
- [41] T. J. McIntosh. Differences in hydrocarbon chain tilt between hydrated phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine bilayers. *Bipophysical Journal*, 29(237-246), 1980.
- [42] S. Doniach. A thermodynamic model for the monoclinic (ripple) phase of hydrated phospholipid bilayers. *J. Chem. Phys.*, 70(10), 1979.
- [43] D. Lichtenberg. Biomembranes: Physical aspects. *VCH New York*, 1993.
- [44] S. A. Safran, P. Pincus, and A. David. Theory of spontaneous vesicle formation in surfactant mixtures. *Science*, 248(354), 1990.

- [45] Danilo D. Lasic. The mechanism of vesicle formation. *Biochemistry J.*, 256(1-11), 1988.
- [46] Goran Lindblom and Leif Rilfors. Cubic phases and isotropic structures formed by membrane lipids, possible biological relevance. *Biochimica et Biophysica Acta*, 988(221-256), 1989.
- [47] D. Nelson, T. Piran, and S. Weinberg. Statistical mechanics of membrane and surfaces. *World scientific*, 2nd edition, 2004.
- [48] Thomas Heimburg, Nicholas J. P. Ryba, Ulrich Wurz, and Derek Marsh. Phase transition from a gel to a fluid phase of cubic symmetry in dmPC/myristic acid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1025(77-81), 1990.
- [49] M. Caffrey, R. L. Magin, B. Hummel, and Jian Zhang. Kinetics of the lamellar and hexagonal phase transitions in phosphatidylethanolamine. *Biophysical Journal*, 58(21-29), 1990.
- [50] K. Matsuzaki, K. Sugishita, N. Ishibe, M. Ueha, S. Nakata, K. Miyajima, and R. M. Epand. Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2. *Biochemistry*, 37(11856-11863), 1998.
- [51] D Smerdon. Anatomy o the eye and orbit. *Current Anaesthesia and Critical Care*, 11, 6, 2000.
- [52] Herbert B. Callen. Thermodynamics, an introduction to the physical theories of equilibrium thermostatics and irreversible thermodynamics. *John Wiley and sons*, 2nd edition, 1985.
- [53] Gilbert W. Castellan. Physical chemistry. *Addison-Wesley*, 3rd edition, 1983.
- [54] Arthur W. Adamson and Alice P. Gast. Physical chemistry of surfaces. *John Wiley and sons*, 6th edition, 1997.
- [55] KyuHan Kim, Siyoung Q. Choi, J. A. Zasadzinski, and T. M. Squires. Interfacial microrheology of dppc monolayers at the air-water interface. *Soft Matter*, 7(7782), 2011.

- [56] N. R. Pallas and B. A. Pethica. Liquid-expanded to liquid-condensed transitions in lipid monolayers at the air-water interface. *Langmuir*, 1 (4)(509-513), 1985.
- [57] M. Lösche, E. Sackmann, and H. Möhwald. A fluorescence microscopic study concerning the phase diagram of phospholipids. *Phys. Chem.*, 87(848-852), 1983.
- [58] L. R. Arriaga, I. Lopez-Montero, J. Iñes-Mullol, and F. Monroy. Domain-growth kinetic origin of nonhorizontal phase coexistence plateaux in langmuir monolayers: compression rigidity of a raft-like lipid distribution. *J. Phys. Chem. B*, 114 (13)(4509-4520), 2010.
- [59] Greiner, Neise, and Stöcker. Thermodynamics and statistical mechanics. *Springer*, 1994.
- [60] W. D. Harkins. The physical chemistry of surface films. *Reinhold, New York*, Chapter 2, 1952.
- [61] N. K. Adam. The physics and chemistry of surfaces. *Oxford University Press*, 3rd edition, London 1941.
- [62] M.W. Kim and D. S Cannell. Experimental study of a two dimensional gas-liquid phase transition. *Physical Review A*, 13(1), 1976.
- [63] M. W. Kim and D. S. Cannell. Surface potential of a two-dimensional film of pentadecanoic in the coexistence region. *Physical Review A*, 14(3), 1976.
- [64] Beth Stoeckly. Equation of state of fatty-acid monolayers on water. *Physical Review A*, 15(6), 1977.
- [65] J. Popielawski and S. A Rice. A generalized regular solution model of a liquid supported monolayer of long chain amphiphile molecules. *Journal of Chemical Physics*, 88(1279), 1988.
- [66] Susan L. Duncan and G. Larson. Phase transitions in condensed monolayers of normal chain carboxylic acids. *Nature*, 156(239), 1945.

- [67] S. Stållberg-Stenhagen and E. Stenhagen. Phase transitions in condensed monolayers of normal chain carboxylic acids. *Nature*, 156(239), 1945.
- [68] Norman L. Gershfeld. Physical chemistry of lipid films at fluid interfaces. *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 27(349-368), 1976.
- [69] Irving Langmuir. Oil lenses on water and the nature of monomolecular expanded films. *J. Chem. Phys.*, 1(756), 1933.
- [70] Zhong hou Cai and S. A. Rice. Comment on the tilting transitions in langmuir monolayers. *J. Chem. Phys.*, 96(6229-6235), 1992.
- [71] J. Schofield and S. A. Rice. Backbone ordering in amphiphile monolayers. *J. Chem. Phys.*, 103(5792-5801), 1995.
- [72] Richard D. Smith and John C. Berg. The collapse of surfactant monolayers at the air-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 74(273), 1980.
- [73] George R. Sell and Hans Weinberger. The ima volumes in mathematics and its applications. *Springer-Verlag*, 1, 1986.
- [74] A. Mikdam, A. Makradi, S. Ahzi, H. Garmestani, D. S. Li, and Y. Remond. Effective conductivity in isotropic heterogeneous media using a strong-contrast statistical continuum theory. *Journal of Mechanics and Physics of Solids*, 57(76-86), 20009.
- [75] Serge Berthier and Jacques Lafait. Effective medium theory: Mathematical determination of the physical solution for the dielectric constant. *Optics Communications*, 33(3), 1980.
- [76] Said Ahzi, Nadia Bahlouli, Ahmed Makradi, and Salim Belouettar. Composite modeling for the effective elastic properties of semicrystalline polymers. *Journal of Mechanics of Materials and Structures*, 2(1), 2007.
- [77] Benjamin Caruso, Agustón Mangiarotti, and Natalia Wilke. Stiffness of lipid monolayers with phase coexistence. *Langmuir*, 29(10807-10816), 2013.

- [78] I. S. Costin and G. T. Barnes. Two-component monolayers. ii surface pressure-area relations for the octadecanol-docosyl sulphate system. *Journal of Colloid and Interfacial Science*, 51(106-121), 1975.
- [79] D. G. Villalva, M. Diociaiuti, L. Giansanti, M. Petaccia, N. Besker, and G. Mancini. Molecular packing in langmuir monolayeres composed of a phosphatidylcholine and a pyrene lipid. *Journal of Physical Chemistry B*, 120(1126-1133), 2016.
- [80] M. D. Phan and K. Shin. Effects of cardiolipin on membrane morphology: A langmuir monolayer study. *Biophysical Journal*, 108(1977-1986), 2015.
- [81] F. C. Goodrich. Molecular interaction in mixed monolayers. *Proc. 2nd Int. Cong. Surface Act.*, (15:85), 1957.
- [82] Tzung-Han Chou and Chien-Hsiang Chang. Thermodynamic characteristics of mixed dppc-dhdp monolayers on water and phosphate buffer subphases. *Langmuir*, 16(3385-3390), 2000.
- [83] K. Tajima, M. Koshinuma, and Akio Nakamura. Equilibrium penetration of n-dodecyl-alanine into the lecithin and dilaurin monolayers. 1. interaction between polar head groups. *Langmuir*, 7(2764-2773), 1991.
- [84] I. R. Peterson, V. Brzezinski, R. M. Kenn, and R. Steitz. Equivalent states of amphiphilic lamellae. *Langmuir*, 8(2995-3002), 1992.
- [85] Ke Gong, Si-Shen Feng, Mei Lin Go, and Pei Hsing Soew. Effects of ph on the stability and compressibility of dppc-cholesterol monolayers at the air-water interfce. *Colloid and surfaces A*, 207(113-125), 2002.
- [86] I. Rey Gómez-Serranillos, J. Miñones Jr., P. Dynarowicz-Latka, J. Miñones, and O. Conde. Surface behavior of oleoyl palmitoyl phosphatidyl ethanolamine (oppe) and the characteristics of mixed oppe-miltefosine monolayeres. *Langmuir*, 20(11414-11421), 2004.
- [87] E. A. Evans and R. Skalk. Mechanics and thermodynamics of biomembranes. *CRC Press, Boca Raton, Fl.*, 1980.

- [88] R. Aveyard and D. A. Haydon. An introduction to the principles of surface chemistry. *Cambridge University Press*, 1973.
- [89] Fritz Jähnig. Lipid exchange between membranes. *Biophysical Journal*, 46(687-694), 1984.
- [90] R. Aveyard and D. A. Haydon. Thermodynamic properties of aliphatic hydrocarbon-water interfaces. *Journal of Colloid and Interfacial Science*, 1965.
- [91] Derek Marsh. Lateral pressure in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1286(183-223), 1996.
- [92] Ronald G. Larson. The structure and rheology of complex fluids. *University of Michigan, Ann Arbor*, 1999.
- [93] J. Lucassen and M. van der Tempel. Dynamic measurements of dilational properties of a liquid interface. *Chemical Engineering Science*, 27(1283), 1972.
- [94] Masami Kawaguchi. Thermodynamic, structural and rheological properties of polymer films at the air-water interface. *Progr. Polym. Sci.*, 18(341-376), 1993.
- [95] R. Hooke. Lectures "de potentia restitution". 1678.
- [96] Christopher W. Macosko. Rheology: Principles, measurements, and applications. *Wiley-VCH*, 1994.
- [97] Sir I. Newton. Principia mathematica. 1678.
- [98] Y. M. Stokes. Flowing windowpane: fact or fiction? *Proceedings of the royal society A*, 455(2751-2756), 1678.
- [99] A. Maestro, F. Ortega, F. Monroy, J. Krägel, and R. Miller. Molecular weight dependence of the shear rheology of pmma langmuir films: a comparison between two different rheometry techniques. *Langmuir*, 25(7393-7400), 2009.

- [100] Iván López-Montero, Elisa R. Catapano, Gabriel Espinosa, Laura R. Arriaga, Dominique Langevin, and Francisco Monroy. Shear and compression rheology of langmuir monolayers of natural ceramides: Solis character and plasticity. *Langmuir*, 29(6634-6644), 2013.
- [101] Alma J. Mendoza, Eduardo Gúzman, Fernando Martínez-Pedrero, Hernan Ritacco, Ramón G. Rubio, Francisco Ortega, Victor M. Starov, and Reinhard Miller. Particle laden fluid interfaces: Dynamics and interfacial rheology. *Advances in Colloid and Interface Science.*, 206(303-319), 2014.
- [102] J. D. Ferry. Viscoelastic properties of polymers. *Wiley, New York*, 3rd edition, 1980.
- [103] M. van den Tempel and E. H. Lucassen-Reynders. Relaxation processes at fluid interfaces. *Adv. in Colloid and Int. Sci.*, 18(281-301), 1983.
- [104] J. Krägel, S. R. Derkatch, and R. Miller. Interfacial shear rheology of protein-surfactant layers. *Adv. in Colloid and Int. Sci.*, 133(38-53), 2008.
- [105] E. C. Bingham. An investigation of the laws of plastic flow. *US Bureau of Standards Bulletin*, 13(309-353), 1916.
- [106] G. Thomas Mezger. The rheology handbook: for users of rotational and oscillatory rheometers. *Hannover, Vincentz Network*, 2nd edition(p. 34), 2006.
- [107] R. Miller and L. Liggieri. Interfacial rheology 1. *Progress in colloid and interface science, Leiden Boston*, 2009.
- [108] M. C. Petty. Langmuir-blodgett films: An introduction. *Cambridge University Press*, 1996.
- [109] L. Wilhelmy. *Ann. Phys.*, 119(177), 1863.
- [110] A. W. Neumann and W. Tanner. *Tenside*, 4(220), 1967.
- [111] Biolin Scientific. Surface and interfacial tension and their measurement techniques. *Technology Note*, 2.

- [112] Naoki Takeshita, Masanari Okuno, and Taka-Aki Ishibashi. Molecular conformation of dppc phospholipid langmuir and langmuir-blodgett monolayers studied by heterodyne-detected vibrational generation spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19(2060-2066), 2017.
- [113] D. Hönig and D. Möbius. Direct visualization of monolayers at the air-water interface by brewster angle microscopy. *J. Phys. Chem.*, 95(4590), 1991.
- [114] S. Hénon and J. Meunier. Microscope at the brewster angle: Direct observations of first-order phase transitions in monolayers. *Rev. Sci. Instr.*, 62(936), 1991.
- [115] Eugene Hecht. Optics. *Addison Wesley*, 4th edition, 2002.
- [116] R. C. Ahuja, P. L. Caruso, D. Hönig, J. Maack, D. Möbius, and G. A. Overbeck. Morphology of organized monolayers by brewster angle microscopy. *Microchemistry*, edition Elsevier, 1994.
- [117] G. A. Overbec, D. Hönig, and D. Möbius. Stars, stripes and shells in monolayers: simulation of the molecular arrangement in schlieren structures. *Thin solid films*, 242(213), 1994.
- [118] G. A. Overbeck, D. Hönig, L. Wolthaus, M. Gnade, and D. Möbius. Observation of bond orientational order in floating and transferred monolayers with brewster angle microscopy. *Thin solid films*, 242(26), 1994.
- [119] E. Teer, C. M. Knobler, C. Lautz, S. Wurlitzer, J. Kildae, and T. M. Fisher. Optical measurements of the phase diagrams of langmuir monolayers of fatty acid, ester, and alcohol mixtures by brewster-angle microscopy. *J. Chem. Phys.*, 105(1913), 1997.
- [120] Vollhardt. Morphology and phase behavior of monolayers. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 64(143), 1996.
- [121] D. A. Edwards, H. Brenner, and D. T. Wasan. Interfacial transport processes and rheology. *Butterworth-Heineman Boston*, 1991.

- [122] C. F. Brooks, G. G. Fuller, C. W. Frank, and C. R. Robertson. An interfacial stress rheometer to study rheological transitions in monolayers at the air-water interface. *Langmuir*, 15(2450-2459), 1999.
- [123] C. A. Naumann, C. F. Brooks, G. G. Fuller, W. Knoll, and C. W. Frank. Viscoelastic properties of lipopolymers at the air-water interface: A combined interfacial stress rheometer and film balance study. *Langmuir*, 15(7752-7761), 1999.
- [124] Simon J. Slater, Cojen Ho, Frank J. Taddeo, Mary Beth Kelly, and Christopher D. Stubbs. Contribution of hydrogen bonding to lipid-lipid interactions in membranes and the role of lipid order: effects of cholesterol, increased phospholipid unsaturation, and ethanol.
- [125] J. A. Zasadzinski, J. Ding, H. E. Warriner, F. Bringezu, and A. J. Waring. The physics and physiology of lung surfactants. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 6(506-513), 2007.
- [126] S. Malcharek, A. Hinz, L. Hilterhaus, and Hans-Joachim Galla. Multilayer structures in lipid monolayer films containing surfactant protein c: effects of cholesterol and pope. *Biophysical Journal*, 88(2638-2649), 2005.
- [127] R. Dawaliby, C. Trubbia, C. Delporte, C. Noyon, Jean-Marie Ruysschaert, P. Van Antwerpen, and C. Govaerts. Phosphatidylethanolamine is a key regulator of membrane fluidity in eukaryotic cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(3658-3667), 2016.
- [128] Jacob N. Israelachvili. Intermolecular and surfaces forces. *Elsevier*, 3rd edition, 2011.
- [129] R. R. Hilgol. A class of motions with constant stretch history. *Quarterly of Applied Mathematics*, XXIX(1), 1971.
- [130] C. Truesdell. Motions with constant stretch history. *The elements of continuum mechanics, part 1*, 1st edition(65-72), 1966.
- [131] Yongei Wang, Wenhua Jiang, S. Miller, and E. Eckstein. Dissipative particle dynamics simulation of on-chip hydrodynamic chromatography. *Journal of chromatography A*, 1198-1199(140-147), 2008.

- [132] D. A. Edwards, H. Brenner, and D. T. Wasan. Interfacial transport processes and rheology. *Butterworth-Heinemann, Boston*, 1991.
- [133] S. Reynaert, C. F. Brooks, P. Moldenaers, J. Vermant, and G. G. Fuller. Analysis of the magnetic rod interfacial stress rheometer. *Journal of Rheology*, 52(261), 2008.

Índice de figuras

| | | |
|-------|--|-------|
| 1. | Estanque de Clapham, Londres | XVI |
| 2. | Modelo de membrana de Gorter-Grendel | XIX |
| 3. | Modelo de membrana de Danielli-Davson | XX |
| 4. | Trazos de la membrana de Robertson | XXI |
| 5. | Modelo de membrana de Singer-Nicolson | XXIII |
| | | |
| 1.1. | Cabezas polares más comunes | 4 |
| 1.2. | Cadenas hidrocarbonadas más comunes | 5 |
| 1.3. | Esfingolípidos y esteroides más comunes | 7 |
| 1.4. | Proteínas integrales y periféricas | 8 |
| 1.5. | Microdominios lipídicos | 9 |
| 1.6. | Formas de los lípidos | 10 |
| 1.7. | Curvatura en las membranas biológicas | 12 |
| 1.8. | Lípido, micelas y bicapa. | 13 |
| 1.9. | Fases lamelares | 14 |
| 1.10. | Liposomas | 15 |
| 1.11. | Fases cúbicas y hexagonal inversa | 16 |
| 1.12. | Monocapa de Langmuir | 17 |
| 1.13. | Células de los pulmones | 18 |
| | | |
| 2.1. | Presión superficial | 22 |
| 2.2. | Tensión superficial como fuerza por unidad de longitud . . . | 23 |
| 2.3. | Tensión superficial como energía por unidad de área | 25 |
| 2.4. | Isotermas en intercara aire-agua | 27 |
| 2.5. | Isoterma, compresibilidad y fases de la ceramida. | 29 |
| 2.6. | Isotermas de lípidos. | 30 |

| | |
|---|----|
| 2.7. Diagramas de fase de monocapas de ácido behénico | 33 |
| 2.8. Diagrama de Intercara | 38 |
| 2.9. Miscibilidad de especies | 39 |
| 2.10. Área de exceso de una mezcla | 40 |
| 2.11. Exceso de energía libre de Gibbs de mezclado | 43 |
| 2.12. Monocapa de lípidos y nanopartículas de oro | 44 |
| 2.13. Interacciones en una bicapa | 48 |
| 2.14. Interacciones en una monocapa | 50 |
| 3.1. Modos de deformación | 54 |
| 3.2. Deformación extensional | 55 |
| 3.3. Deformación de cizallamiento | 56 |
| 3.4. Tensor de deformación | 57 |
| 3.5. Esquema de una deformación | 58 |
| 3.6. Tensor de esfuerzos | 60 |
| 3.7. Esfuerzos de compresión | 62 |
| 3.8. Deformación de cizallamiento típica | 63 |
| 3.9. Fluido cizallado | 65 |
| 3.10. Viscoelasticidad | 67 |
| 3.11. Módulo viscoelástico | 70 |
| 3.12. Comportamiento plástico | 72 |
| 3.13. Comportamiento pseudoplástico | 73 |
| 3.14. Viscosidad de cizallamiento | 74 |
| 3.15. Resortes y amortiguadores | 76 |
| 3.16. Modelo de Kelvin-Voight | 77 |
| 3.17. Modelo de Maxwell | 78 |
| 3.18. Solución al modelo de Maxwell | 80 |
| 4.1. phospholipidsss | 84 |
| 4.2. pHaguaMQ | 84 |
| 4.3. Deposición de lípidos | 86 |
| 4.4. Microjeringa Hamilton | 87 |
| 4.5. Placa de Wilhelmy | 88 |
| 4.6. Menisco | 89 |
| 4.7. Palangana de Langmuir | 90 |
| 4.8. Isotermas típicas | 92 |

| | |
|--|-----|
| 4.9. Microscopio de ángulo de Brewster | 93 |
| 4.10. Ángulo de Brewster | 94 |
| 4.11. Palangana de Langmuir 2 | 95 |
| 4.12. Esfuerzo y deformación | 96 |
| 4.13. Respuestas de los materiales | 98 |
| 4.14. Reometro interfacial de cizallamiento | 100 |
| 4.15. Menisco | 101 |
| 4.16. IsrNeedle | 102 |
| 5.1. Efecto de la cola en el punto de fusión | 106 |
| 5.2. Efecto de la cola hidrofóbica | 107 |
| 5.3. Efecto de la cabeza hidrofílica | 109 |
| 5.4. Isotherma y compresibilidad mezcla DSPC-POPE | 111 |
| 5.5. Esquema de lípidos | 113 |
| 5.6. Isotherma y compresibilidad mezcla DPPC-POPE | 114 |
| 5.7. Presiones superficiales de la transición de fase en monocapas de DPPC-POPE | 115 |
| 5.8. Máximos del módulo de compresibilidad DPPC-POPE | 117 |
| 5.9. Áreas resultantes en las mezclas DPPC-POPE | 118 |
| 5.10. Energías de mezclado de DPPC-POPE | 119 |
| 5.11. Áreas condensadas en monocapas con respecto a la presión superficial | 120 |
| 5.12. Módulos de compresibilidad por porcentaje de LC | 121 |
| 5.13. Isothermas DPPC-POPE con imágenes de BAM | 123 |
| 5.14. Diagrama de fases | 124 |
| 5.15. Teoría de medio efectivo | 126 |
| 5.16. Módulo de compresibilidad normalizado | 127 |
| 5.17. Linealidad en cizallamiento | 129 |
| 5.18. Módulos de cizallamiento | 131 |
| 5.19. Módulos de cizallamiento | 132 |
| 5.20. Isothermas de DPPC con nanopartículas | 133 |
| 5.21. Linealidad en cizallamiento para monocapas de DPPC-NP | 134 |
| 5.22. Módulos de cizallamiento para el sistema DPPC-NP | 135 |
| A.1. Deformación en cizallamiento | 145 |
| A.2. Número de Weissenberg | 147 |

| | |
|--|-----|
| A.3. Geometría de la aguja magnética | 148 |
| B.1. Aproximaciones de la derivada | 152 |
| B.2. Función integrable | 153 |
| B.3. Áreas de trapezoides | 154 |
| C.1. Proceso de análisis de imágenes | 158 |
| C.2. Proceso de cálculo de errores | 159 |
| C.3. Proceso de cálculo de errores | 160 |
| D.1. Imágenes de BAM para la mezcla $\chi_{DPPC} = 1.00$ | 164 |
| D.2. Imágenes de BAM para la mezcla $\chi_{DPPC} = 0.90$ | 165 |
| D.3. Imágenes de BAM para la mezcla $\chi_{DPPC} = 0.80$ | 166 |
| D.4. Imágenes de BAM para la mezcla $\chi_{DPPC} = 0.70$ | 167 |
| D.5. Imágenes de BAM para la mezcla $\chi_{DPPC} = 0.50$ | 168 |
| D.6. Imágenes de BAM para la mezcla $\chi_{DPPC} = 0.35$ | 169 |
| D.7. Imágenes de BAM para la mezcla $\chi_{DPPC} = 0.25$ | 170 |
| D.8. Imágenes de BAM para la mezcla $\chi_{DPPC} = 0.15$ | 171 |
| D.9. Imágenes de BAM para la mezcla $\chi_{DPPC} = 0.00$ | 172 |

Índice de cuadros

| | |
|---|-----|
| 1.1. Nombres de las colas hidrocarbonadas | 6 |
| 2.1. Tensiones superficiales de diferentes líquidos | 26 |
| 2.2. Temperaturas de fusión de fosfolípidos | 46 |
| 4.1. Propiedades de los lípidos | 85 |
| 5.1. Módulos en límites de transición de fases | 125 |
| 5.2. Valores de percolación | 128 |

Mechanical Properties of DPPC–POPE Mixed Langmuir Monolayers

Alberto S. Luviano,[†] José Campos-Terán,[‡] Dominique Langevin,[§] Rolando Castillo,^{||} and Gabriel Espinosa^{*,†}

[†]Instituto de Física y Matemáticas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58060 Morelia, México

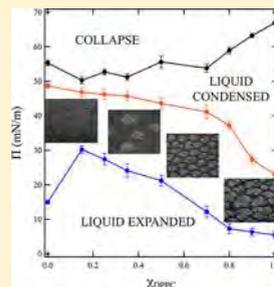
[‡]Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa, 05348 Ciudad de México, México

[§]Laboratoire de Physique des Solides, Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France

^{||}Instituto de Física, Universidad Autónoma de México, P.O. Box 20-264, 01000 Ciudad de México, México

Supporting Information

ABSTRACT: The mechanical properties of lipid monolayers and their responses to shear and compression stresses play an important role in processes such as breathing and eye blinking. We studied the mechanical properties of Langmuir monolayers of a model mixture, composed of an unsaturated lipid, 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-phosphoethanolamine (POPE), and a saturated lipid, 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-phosphocholine (DPPC). We performed isothermal compressions and sinusoidal shear deformations of these mixed monolayers. Also, the different phases were observed with Brewster angle microscopy. We found that the mechanical behavior is affected by the miscibility of both lipids. In the two-phase region, the compression elastic modulus increases with the amount of the LC phase but does not follow the predictions of a simple effective medium model. The discrepancies arise from the fact that, upon compression, the domains grow at a rate faster than the compression rate but not fast enough to reach thermodynamic equilibrium. Before reaching the LC phase, domain percolation is observed and compression and shear moduli become equal to those of the pure LC phase. Most of the monolayers behave as viscoelastic fluids at the frequencies investigated. A minimum in the compression modulus and shear viscosity was observed for mixtures close to equimolar composition, with the minimum being accompanied by a change in domain shapes.



INTRODUCTION

Understanding the physical properties of lipid bilayers is closely related to the biological function of cells.^{1,2} Lipid bilayers provide mechanical stability to the membranes as well as a fluid environment allowing proteins and other molecules to move along or across these membranes. The bilayers are composed of mixtures of lipids with saturated and unsaturated chains in order to be able to modulate the cell mechanical response to various types of stresses. In the breathing process, the lung cell membranes are exposed to huge changes in surface pressure; in the eye blinking process, the lipid surface layer experience a shear stress every 2–10 s.³ Mixed lipid monolayers have proven to be adequate models to tackle cell membrane mechanics.⁴ However, few such studies have been published so far, although they could bring important insights and innovation, for instance in medical treatments of diseases related to dry eye and breathing deficiencies.⁵ Important advances in the understanding of the mechanical behavior of lipid monolayers were published recently.⁶ This motivated us to undertake a study of mixtures of saturated and unsaturated lipids.

Depending on the particular lipid and on temperature, the mechanical response of mixed lipid monolayers is rather complex. Pure lipids and lipid mixtures usually present a so-called *liquid expanded* (LE) phase at low surface pressure and a

liquid condensed (LC) phase at high surface pressure, separated by a phase coexistence region.⁷ The surface pressure is not constant in the coexistence region, a feature that attracted much interest in the past and was first attributed to impurities.⁸ More recently, the role of the liquid condensed domains nucleating in the LE phase was considered. When the domains are not able to incorporate material freely during compression, the monolayer is not in thermodynamic equilibrium, and the compression modulus is not equal to zero as in the thermodynamic limit; the faster the compression, the larger the delay in domain growth, the higher the modulus and the closer the behavior to that of a composite with rigid elements. Such composites are usually described by effective medium theories.⁹ In their simplest version, the compressibility (inverse of elastic compression modulus) of the mixed monolayers is the sum of the compressibility of each coexisting phase weighted by the percentage of area occupied by each phase. In these models, the linear elasticity of heterogeneous materials is not sensitive to the details of the microstructure, and in particular to anisotropy.¹⁰

Received: September 23, 2019

Revised: November 17, 2019

Published: December 2, 2019

Such a description was applied recently to lipid mixtures by Caruso et al. in the region of LE–LC coexistence.⁶ Although the compression modulus was nonzero, the effective medium theory failed to describe their results. In addition, a percolation behavior was observed close to the LC phase, where the LC domains become macroscopically connected and the measured modulus becomes equal to the modulus of the LC phase. Similar approaches were used to describe the shear rheology of lipid monolayers; this problem is simpler because the area of the domains remains constant during a shear deformation. The shear viscosity of mixed lipid monolayers has been modeled in analogy with three-dimensional suspensions of hard spheres in a solvent, and a perfect agreement has been obtained with no adjustable parameters.¹¹

Apart from the study of Caruso et al.,⁶ few studies of mechanical behavior of mixed lipid monolayers have been reported to date. In a former work, we have studied the shear behavior of several representative mixed lipid monolayers composed solely of saturated lipids and evidenced a wide range of behavior, from fluid to viscoelastic and solid, depending on composition.¹² Wilke et al. studied the shear behavior of mixed monolayers of DSPC (distearoylphosphatidylcholine) and DMPC (dimyristoylphosphatidylcholine).¹³ The monolayer shear viscosity was found to be highly dependent on the presence of domains and on the domain density. In turn, the monolayer compressibility was only influenced by the presence of domains for high domain densities, as confirmed later by the work of the same group.⁶ Work is clearly needed to deepen our understanding of the mechanical behavior of mixed monolayers, in particular containing unsaturated lipids, which are adequate models of cell membrane mechanics.

The diversity of lipid composition is enormous and is even different in the inner and outer monolayers of membrane bilayers.¹⁴ In the present study, we have chosen a model system with two lipids, DPPC and POPE (Figure 1). DPPC,

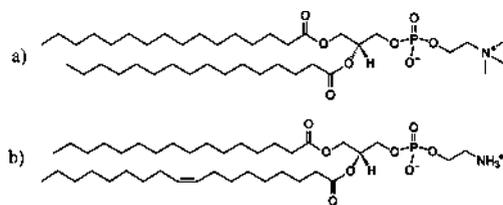


Figure 1. (a) DPPC and (b) POPE chemical structures.

1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, is a common component of lung cell membranes. DPPC is a saturated lipid and its transition temperature is 41 °C.¹⁵ Monolayers and bilayers of this lipid have been widely studied, including their mechanical properties.^{15–20} POPE, 1-palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine, is unsaturated and its transition temperature is 25 °C. This lipid increase bilayer fluidity, because it has a low transition temperature²¹ and also because the amine in the headgroup is not methylated.^{22,23} Monolayer studies of the two pure lipids could be found in the literature, especially for DPPC.^{15–20}

In the present paper, we intend to clarify the mechanical response of mixed lipid monolayers containing DPPC, a saturated lipid, and POPE, an unsaturated one. We studied the

miscibility and the mechanical response to both compression and shear deformations of the mixed monolayers.

MATERIALS AND METHODS

Materials. The lipids 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC, $M_w = 734$, cat. 850355P) and 1-palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-phosphoethanolamine (POPE, $M_w = 718$, cat. 850757P) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). According to the supplier, DPPC is an L-enantiomer. All chemicals were used as received. We prepared stock solutions of each lipid in chloroform (supplied by Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at a concentration of 1 mg/mL. We mixed the DPPC and POPE lipid solutions with different mole fractions of DPPC, χ_{DPPC} . All stock solutions were kept at –20 °C. We formed Langmuir monolayers by spreading a small amount (20 μ L) of the lipid solutions dropwise, with a microsyringe (Hamilton Co.) onto a clean subphase of ultrapure water (Milli-Q, Millipore with a resistivity of 18.2 $M\Omega$ ·cm). The cleanliness of the water/air interface was tested by compressing the interface (by a factor ~ 4), checking that the change in surface tension was less than 0.2 mN/m and that no domains were observed with Brewster angle microscopy (BAM). Prior to all measurements, we waited 20 min to allow for chloroform evaporation.

Surface Compression Isotherms and Compression Modulus. The surface tension was measured with a tensiometer (KSV-NIMA, KN 0051) equipped with a Du Nouy–Padday platinum rod (KSV-NIMA, KN 0004, diameter of 3.317 mm). The surface pressure is defined as $\Pi = \gamma_0 - \gamma$, where γ_0 is the surface tension of water and γ is the surface tension in the presence of the monolayer. Compression isotherms, Π vs area per molecule a , were performed in a Langmuir trough (KSV-NIMA, KN 3003) with area 364 mm \times 75 mm at a low compression rate (3.75 cm²/min), in order to be close to quasi-static conditions. In the case of lipid mixtures, a was calculated dividing the trough area by the total number of molecules deposited at the surface.

The temperature was controlled by recirculating water from a thermostatic bath (Thermo Scientific). The temperature, T , was measured using a thermocouple (KSV-NIMA, KN0054) immersed in the water subphase. In the experiments presented in this paper, $T = (20 \pm 0.02)$ °C. The Langmuir trough was placed inside a transparent plexiglass box to avoid undesired air drift and dust contamination on the liquid surface. This box was set on a table equipped with an active vibration isolation system (Accurion, Vario Basic 40). The surface compression modulus (E) was obtained from numerical derivatives of $\Pi(a)$:

$$E = -a \left(\frac{\partial \Pi}{\partial a} \right) \quad (1)$$

It is known the unsaturated lipids are prone to oxidation. Their double bonds are susceptible to break during oxidation reactions in the presence of reactive oxygen species,²⁴ accelerated in the presence of ozone.²⁵ We investigated the oxidation of POPE lipids in the laboratory atmosphere by monitoring the time evolution of surface pressure. No significant variations were detected less than 90 min after monolayer formation, while the surface pressure begins to change appreciably at elapsed times of 150 min (Figure S1). None of our experiments lasted more than 80 min; therefore, we considered unnecessary the use of an oxygen-free atmosphere.

Brewster Angle Microscopy (BAM). The textures of the lipid monolayers were observed using an Elli2000 (Nanofilm Technologie GmbH, Germany) imaging ellipsometer in microscopy mode. The instrument is equipped with a p-polarized laser beam with an incidence angle of $\sim 53^\circ$ onto the air/water interface and a CCD detector to collect the reflected light, with a 20 \times objective (field of view: 292 μ m \times 235 μ m and a spatial resolution of ~ 1 μ m per pixel).

Interfacial Shear Rheology (ISR). We used a KSV-NIMA interfacial shear rheometer (ISR).^{26,27} The instrument features two Helmholtz coils producing a magnetic field gradient in order to displace a millimetric magnetic needle. The needle has a magnetic core of 7.3 mg inserted in a hollow glass capillary with 23 mm length and 0.4 mm diameter. The magnetic needle is carefully placed onto

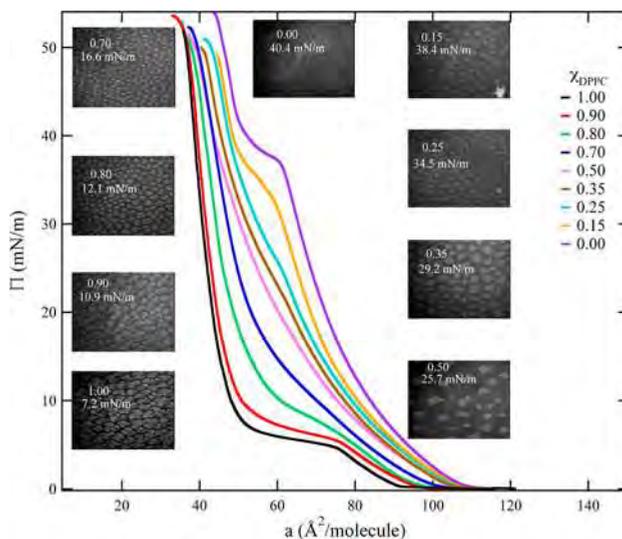


Figure 2. Surface pressure Π - a isotherms of lipid mixtures of POPE-DPPC with different DPPC molar fractions χ_{DPPC} . BAM images are taken in the LE-LC coexistence region; the values of χ_{DPPC} and of the pressures are indicated in each image; the horizontal length of the images is 292 μm .

the air/water interface covered by the spread monolayer in the Langmuir trough. The needle slides inside a glass channel that creates a small wetting meniscus, which is used as a guide for the needle to move along a straight line parallel to the walls of the channel, ensuring uniform flow geometry. The barriers of the Langmuir trough were set to motion automatically in order to maintain constant the monolayer surface pressure during the shear deformation. All the ISR measurements were performed at a constant low angular frequency from $\omega = 0.13 \text{ s}^{-1}$ and using small amplitudes ($<5\%$) in order to remain in the linear viscoelastic regime. Three different measurements were performed in order to evaluate the reproducibility.

The sinusoidal shear stress, σ , applied to the magnetic needle writes:

$$\sigma(t) = \sigma_0 \sin(\omega t + \delta) \quad (2)$$

The stress amplitude, σ_0 , is measured after force calibration. The strain amplitude, denoted by u_0 , is deduced from the displacement of the magnetic needle.^{26,28} When the monolayer is purely elastic, the phase difference δ is zero, while when the monolayer is purely viscous, $\delta = \pi/2$. The complex viscoelastic surface modulus was obtained from

$$G^*(\omega) = \frac{\sigma_0}{u_0} e^{i\delta(\omega)} = G'(\omega) + iG''(\omega) \quad (3)$$

where $G'(\omega)$ is the storage modulus and $G''(\omega)$ is the loss modulus. G'' is related to the surface shear viscosity η_s by $G'' = \omega \eta_s$. When $G' = 0$ and $G'' \neq 0$, the surface layer is fluid with a viscosity η_s ; when $G' \neq 0$ and $G'' = 0$, the layer is purely elastic; when both G' and G'' are nonzero, the layer is viscoelastic.²⁹

RESULTS AND DISCUSSION

Surface Pressure and Phase Transitions. The surface pressure isotherms of mixed POPE-DPPC monolayers are shown in Figure 2 for different DPPC molar fractions (χ_{DPPC}).

The isotherms for monolayers of pure lipids are similar to those reported in the literature.^{30,31} The pure DPPC isotherm is characterized by a liquid expanded (LE) phase at large molecular area. The surface pressure increases during the compression of the LE phase up to the appearance of a liquid

condensed (LC) phase after a characteristic kink at *ca.* 5 mN/m.³² In the LE-LC coexistence region, the surface pressure is not constant and increases slowly. Upon further compression, only the LC phase remains and the surface pressure rises sharply until the monolayer collapses. Adding POPE to DPPC monolayers results in an increase of surface pressure (for a given area per molecule). The kink at the onset of LE-LC phase coexistence is less marked, and the curve gradually shifts toward higher pressures as χ_{DPPC} decreases. The pure POPE isotherm exhibits the largest surface pressures, and again a marked kink in the surface pressure at the onset of LE-LC phase coexistence. The kink occurs at a much higher surface pressure ($\sim 38 \text{ mN/m}$) than in DPPC monolayers ($\sim 5 \text{ mN/m}$).³¹ This is because monolayers of unsaturated lipids are less compressible than saturated ones (their transition temperature is lower).

Brewster angle images of the monolayers were taken between $\Pi \sim 0$ (LE phase) and the monolayer collapse. Above $\Pi = 5 \text{ mN/m}$, triskelion-shaped LE-LC domains are observed in pure DPPC monolayers, while above 38 mN/m, seaweed-shaped domains are observed in pure POPE monolayers. The same type of domain shapes has been observed in previous studies of the pure lipid monolayers.^{33,34} Upon decreasing χ_{DPPC} , the domains evolve progressively from triskelion-like toward seaweed-like (Figure 2 insets). DPPC domains form triskelions at high surface concentrations, evolving from a bean-like shape at low surface concentrations.³⁵ Additional images can be found in Figure S2. These domains are usually not at equilibrium and grow during compression; their shape is therefore controlled by the growth process. At low supersaturation, they are affected by instabilities occurring during domain growth, where Marangoni flow is the key factor.^{36,37} Here, the domains in DPPC monolayers present the characteristic chirality of L-enantiomers.³⁸ Upon POPE addition, above *ca.* $\chi_{\text{DPPC}} \approx 0.70$, the

domains grow without apparent orientational order, as when the line tension of the domains does not present anisotropy.

The pressure Π_e at the onset of appearance of the LC phased the pressure Π_c above which the domains disappear were determined using the BAM images and are reported in Table 1. We also report in this table the surface pressure of the

Table 1. Surface Pressures (in mN/m) at the Onset of Formation of the Liquid Condensed Domains (Π_e) and at which the domains disappear (Π_c), determined using BAM images, and Surface Pressure at the Kink of the Isotherms (Π_k) for Different DPPC Molar Fractions

| χ_{DPPC} | Π_e | Π_k | Π_c |
|----------------------|------------|------------|------------|
| 0.00 | 14.9 ± 0.6 | 37.6 ± 0.6 | 48.8 ± 0.7 |
| 0.15 | 33 ± 1 | 33.1 ± 0.9 | 47 ± 1 |
| 0.25 | 26 ± 1 | 25 ± 1.0 | 46 ± 2 |
| 0.35 | 22 ± 2 | 22 ± 1 | 46 ± 2 |
| 0.50 | 18 ± 2 | 17 ± 1 | 44 ± 2 |
| 0.70 | 12 ± 1 | 11 ± 1 | 41 ± 2 |
| 0.80 | 8.0 ± 0.7 | 7 ± 1 | 37 ± 1 |
| 0.90 | 5.8 ± 0.4 | 6 ± 1 | 27 ± 1 |
| 1.00 | 5.2 ± 0.2 | 4.6 ± 0.8 | 23 ± 1 |

kink (Π_k) observed in the isotherms. As expected, Π_e and Π_k are equal within experimental error, except for the pure POPE monolayers (see Table 1). In this case, small nucleation seeds appear at a pressure of ca. 15 mN/m, much smaller than Π_k , as also observed by other authors.³¹ The increase in Π_k with addition of POPE is expected as the transition temperature of the monolayer decreases: the mixed monolayers become more expanded and less compressible. Π_k was found to vary linearly with χ_{DPPC} as Π_e (excepted for pure POPE) (see Figure S3).

The slope of the isotherms decreases and the width of the coexistence region increases as χ_{DPPC} approaches 0.5, the value for the equimolar mixture. This means that the monolayer becomes more compressible in the vicinity of $\chi_{\text{DPPC}} = 0.5$ and that according to eq 1 the effective modulus E is minimum, as discussed later.

A phase diagram can then be constructed for a given surface pressure, the two χ values at which the boundaries of each homogeneous region are crossed can be determined and are plotted in Figure 3.

Relative Area Occupied by the Surface Domains. The area occupied by the domains in the coexistence regions was determined using image analysis with the NIH ImageJ³⁹ software as detailed in the Supporting Information. The area A_c and A_e occupied by respectively the LC and LE phases were determined using the BAM images for all χ_{DPPC} . The variation of condensed area fraction $A_c/(A_c + A_e)$ with surface pressure is shown in Figure 4 for the different χ_{DPPC} .

The area covered by the condensed phase increases rapidly with surface pressure and saturates at high surface pressures, before but close to the monolayer collapse. At a fixed surface pressure, the fraction of condensed area decreases with addition of POPE.

As in the study of Caruso et al.,⁶ we tested if the lever rule was obeyed, meaning that the composition of the coexisting phases does not change in the coexistence region. This rule writes:

$$\frac{A_e}{A_c} = \frac{a_e \chi_c - \chi_{\text{DPPC}}}{a_c \chi_{\text{DPPC}} - \chi_e} \quad (4)$$

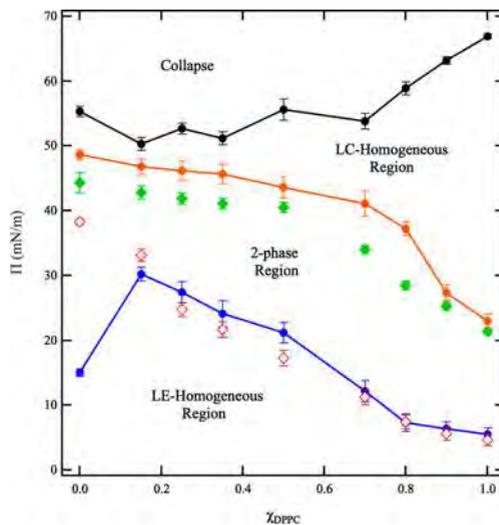


Figure 3. Phase diagram of the mixed monolayers. A homogeneous LE region is found under the blue line ($\Pi = \Pi_e$), a two-phase region between the blue line and the orange line ($\Pi = \Pi_c$), and a collapse region above the black line. The pressure at which domain percolation occurs is also shown (green squares), as well as the pressure of the kink ($\Pi = \Pi_k$, empty red diamonds). Except for Π_k and the collapse line, the points were obtained from BAM image analysis.

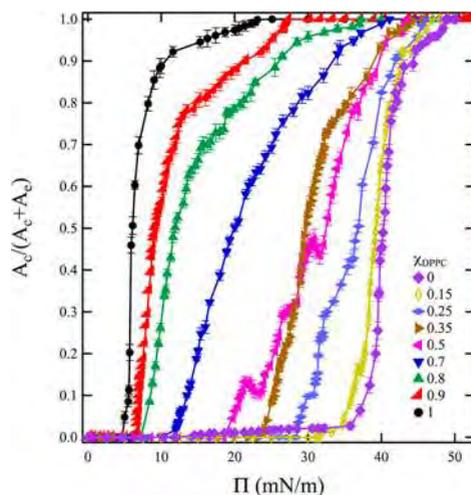


Figure 4. Relative area covered by the LC phase for different monolayer compositions, obtained from analysis of BAM images; A_c and A_e are respectively the surface area of condensed and the expanded phases.

where χ_e and χ_c are, respectively, the molar fractions of DPPC in the expanded and condensed phases, obtained from the phase diagram of Figure 3, while a_e and a_c are respectively the mean molecular area of the expanded and condensed phases, obtained from the compression isotherms of Figure 2 at the

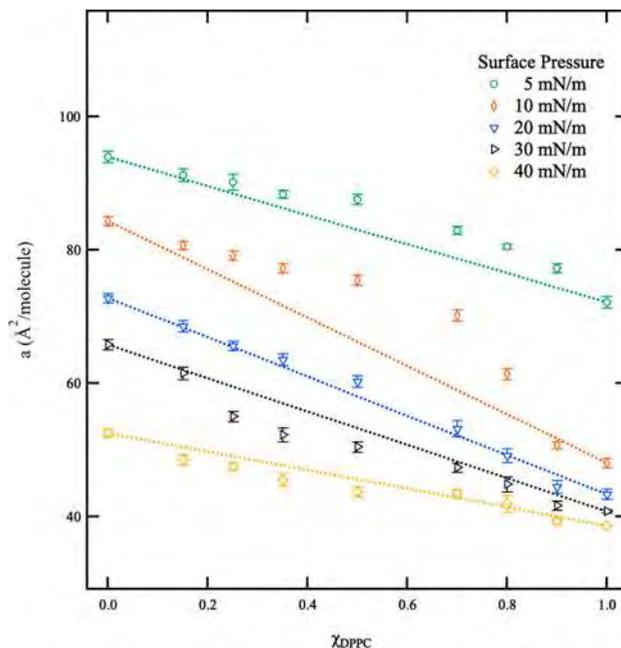


Figure 5. Mean molecular area dependency of DPPC molar fraction. The dashed lines represent the prediction of an ideal mixture.

compositions χ_e and χ_c . The experimental data for χ_e , χ_c , a_e , and a_c corresponding to surface pressures of 15, 20, 30, and 35 mN/m together with the curves calculated using eq 4 are presented in the Supporting Information (Figure S4). We found that the lever rule is obeyed in the monolayers of this study, meaning that at constant surface pressure, the composition of the coexisting phases does not change.

We also evaluated the average size of the domains from image analysis. It does not depend appreciably on surface pressure, but increases slightly with χ_{DPPC} from about 10 μm for small χ_{DPPC} to 20 μm for large χ_{DPPC} .

Gibbs Excess Free Energy of Mixing. Figure 5 shows the area per lipid (a) at fixed pressures versus χ_{DPPC} , determined using the isotherms of Figure 2. For an ideal mixture:

$$a_{\text{ideal}}(\chi) = \chi_{\text{DPPC}} a_{\text{DPPC}} + (1 - \chi_{\text{DPPC}}) a_{\text{POPE}} \quad (5)$$

This linear behavior is not obeyed by the mixed monolayers as it can be seen in Figure 5. Values larger than predicted from eq 5 would indicate that the effective area per molecule is greater than the ideal area, a more loosely packed state regardless of the monolayer phase state, and lower values would indicate a more compact monolayer than the ideal one. Also on each surface pressure the mean molecular area decreases monotonically, the largest deviations from the ideal area occurs at $\Pi = 10$ mN/m.

To evaluate the interaction between lipids in the monolayer and its stability, we calculate the Gibbs excess free energy, ΔG_{exc} , determined from the following relation:^{40,41}

$$\Delta G_{\text{exc}} = \int_0^{\Pi} (a_{\text{mix}} - \chi_{\text{DPPC}} a_{\text{DPPC}} - (1 - \chi_{\text{DPPC}}) a_{\text{POPE}}) d\Pi \quad (6)$$

where a_{mix} , a_{DPPC} , and a_{POPE} represent the real area of mixed system and the respective areas of pure components. In the pure component monolayer, $\Delta G_{\text{exc}} = 0$, this is also true if the mixed monolayers has an ideal behavior. If the monolayer present $\Delta G_{\text{exc}} < 0$, meaning that the interaction between mixed components is more attractive, whereas $\Delta G_{\text{exc}} > 0$, it indicates a more repulsive interaction between the two species. In Figure S5, we observe that ΔG_{exc} is positive for most of the mixtures at the selected surface pressures (5, 10, 20, 30, and 40 mN/m), therefore the miscibility of both lipids is not favorable except for surface pressures of 30 and 40 mN/m and $\chi_{\text{DPPC}} \approx 0.9$, where $\Delta G_{\text{exc}} < 0$, in these conditions we observed an LC homogeneous monolayer (see Figures 5 and S2).

Compression Modulus. The compression modulus (E) obtained from numerical derivation of the isotherms using eq 1 is shown in Figure 6. At low surface pressures (~ 5 mN/m, LE phase), the compression modulus is low, $E < 50$ mN/m, indicating that all the monolayers are quite compressible, pure DPPC being the most compressible monolayer of all of them ($E \sim 5$ mN/m). At high surface pressures ($\Pi \sim 40$ mN/m), close to the LC phase, the pure POPE monolayer is in turn the most compressible and presents the smallest E value of the monolayers in this study. The curve of Figure 6 has been smoothed numerically in order to reduce the noise. As a consequence, the discontinuities associated with the kinks of surface pressure are not visible. The moduli at the phase transitions were calculated without smoothing.

At intermediate surface pressures, E decreases with addition of POPE until $\chi_{\text{DPPC}} = 0.5$, after which it does not significantly change upon further addition of POPE. If we assume that the monolayer behaves as an effective medium in the two-phase region, the compression modulus should obey:

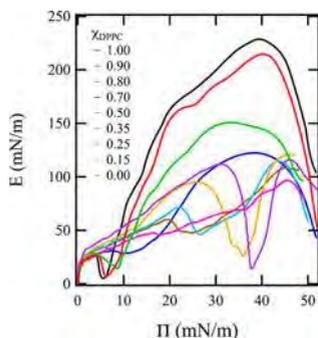


Figure 6. Smoothed curve for the compression modulus (E) vs the surface pressure for monolayers of different DPPC/POPE mixtures.

$$E^{-1} = -\frac{1}{A} \left(\frac{\partial(A_e + A_c)}{\partial \Pi} \right) = \frac{1}{A} \left(\frac{A_e}{E_e} + \frac{A_c}{E_c} \right) \quad (7)$$

where E_c is the compression modulus of the condensed phase and E_e is the compression modulus of the expanded phase. The values of E_e were obtained from the derivatives of the surface pressure at the kink on the high surface area side. The values of E_c were obtained from the derivatives of the surface pressure at Π_c (since in this case, there is no visible discontinuity in surface pressure). These values are given in Table 2 for the different χ_{DPPC} .

Table 2. Calculated Compression Moduli E_e and E_c (in mN/m) at the Transition Pressures Reported in Table 1 for Different DPPC Molar Fractions

| χ_{DPPC} | E_e | E_c |
|----------------------|--------|---------|
| 0.00 | 67 ± 3 | 102 ± 6 |
| 0.15 | 53 ± 3 | 119 ± 6 |
| 0.25 | 65 ± 4 | 110 ± 5 |
| 0.35 | 54 ± 4 | 112 ± 5 |
| 0.50 | 49 ± 3 | 89 ± 4 |
| 0.70 | 28 ± 4 | 121 ± 7 |
| 0.80 | 20 ± 3 | 147 ± 8 |
| 0.90 | 24 ± 3 | 175 ± 8 |
| 1.00 | 27 ± 3 | 177 ± 7 |

The plots of $1/E$ versus $x = A_e/A$ are shown in Figure 7. Portions of linear behavior can be visualized, suggesting that the monolayers might behave as an effective medium, at least within the error bars. However, when $1/E$ is calculated using the values of E_e and E_c of Table 2 and eq 7, large discrepancies are found with the experimental data (red lines in Figure 7). This means that effective medium models are unable to describe the compression behavior of the monolayers, as reported earlier.^{6,9} The difference is unusually large for pure DPPC monolayers, which exhibits a marked kink at the LE–LC transition when arriving at the LE phase; the modulus is thus much smaller in the two-phase region than in the pure LE phase close to the kink, a feature not accounted for by eq 7.

It can be seen in Figure 7 that although the compression elastic modulus increases with the amount of LC phase, it increases less than predicted by a simple effective medium model. This mismatch arises from the fact that upon

compression, the domains grow at a rate faster than the compression rate, but not fast enough to reach thermodynamic equilibrium, in which case the modulus should be zero.

The modulus becomes constant, and equal to E_c before reaching the liquid-condensed phase ($x = 1$), suggesting that the domains percolate and become interconnected over macroscopic distances, as confirmed by the examination of the BAM images. The same behavior was found for other lipids by Caruso et al.⁶ To better visualize this effect, we normalized the compression moduli in order to compare their behavior for different χ_{DPPC} . Each modulus was normalized according to

$$E_{\text{norm}} = \frac{E - E_e}{E_c - E_e} \quad (8)$$

The results are shown in Figure 8.

The values of $x = A_e/A$ at the percolation threshold, above which the normalized elastic modulus becomes close to one and rather constant, are given in Table 3. The percolation threshold does not depend significantly upon χ_{DPPC} although a slight increase is observed between pure POPE and pure DPPC. The values of the percolation threshold determined from the BAM images are also given in Table 3. Within experimental error, they agree with the values taken from the elastic modulus. Percolation is shifted to smaller surface pressures by increasing χ_{DPPC} (see Figure 3). Note that Caruso et al.⁶ found differences between percolation thresholds determined from BAM images and elastic moduli of their lipids; they proposed that the domains appearing in contact in the images were not yet connected.

The values of the percolation threshold either from BAM images and from elastic moduli displayed in Table 3 are large, significantly larger than the 2D percolation thresholds that correspond to close packing for disks or aligned squares, which are about 0.67.⁴² The percolation threshold is larger for elongated objects, but also depends on the interactions between surface domains. These large values were also observed by Caruso et al. and were attributed to these domain interactions.

The smallest compression modulus values are found for $\chi_{\text{DPPC}} \approx 0.3\text{--}0.5$. Figure 9 shows this effect for three different pressures, mostly for monolayers in the two-phase region ($\Pi_e < \Pi < \Pi_c$). Also, as surface pressure increases, the minimum is clearly seen at lower χ_{DPPC} .

Note that for $\chi_{\text{DPPC}} = 0.5$, there is no kink in the surface pressure isotherm (Figure 2) and that at this composition, the domain shapes change from seaweed to triskelion-like, which could be related to the change in the line tension due to the interaction between lipids.

The compressibility E_e^{-1} corresponding to the monolayers just entering the condensed phase (Figure 9 and Table 2) is also maximum at $\chi_{\text{DPPC}} = 0.5$, implying that this homogeneous LC monolayer is also the most compressible one. Following the self-assembly model of Israelachvili et al.^{43,44} and since DPPC and POPE molecules have respectively cone and inverted-cone geometries⁴⁵ (close to cylinders), one can understand why the equimolar mixture has an optimal molecular packing, therefore, the pair interactions might be maximized at a given density. The mean molecular area, a , in Figure 5 shows that at $\chi_{\text{DPPC}} \approx 0.5$ and lower surface pressures ($\Pi \leq 20$ mN/m) there is the highest positive deviation from the ideal mixture (dashed lines in Figure 5), suggesting that at these surface pressures and this molar fraction the monolayer is

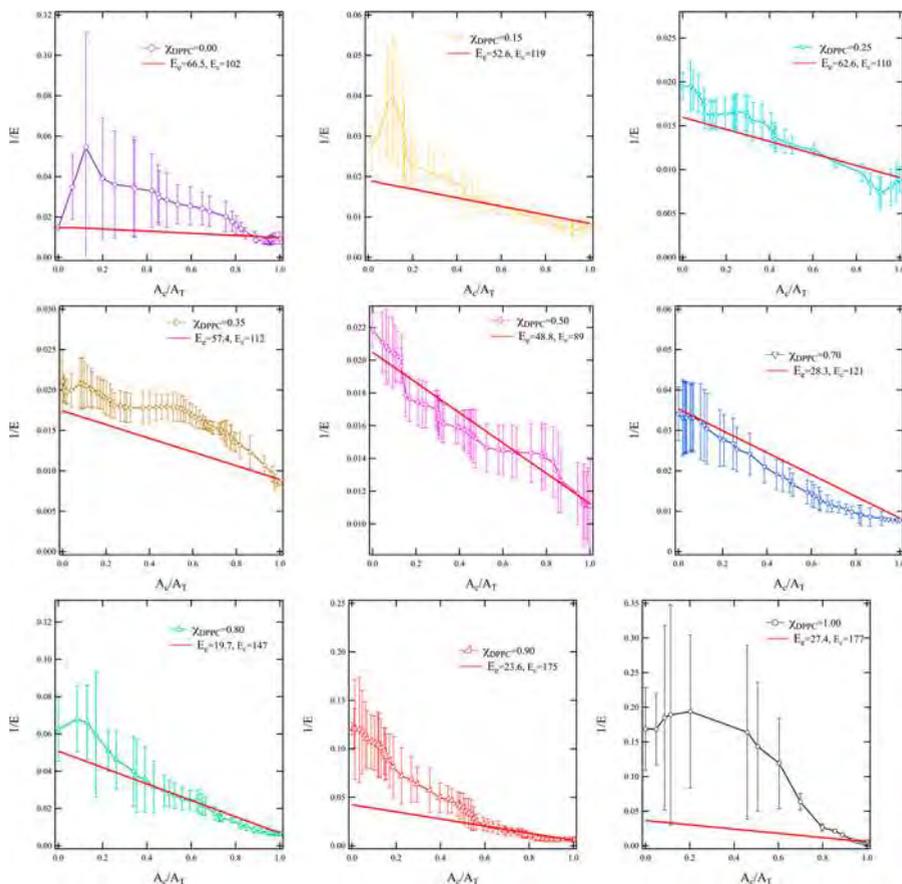


Figure 7. Compressibility as a function of the condensed area to total area ratio: red line: calculated from eq 7 and the parameters of Table 2; experimental points is data extracted from Figure 9 and BAM images.

less packed probably by repulsion between lipids or other contributions may occur, such as disorder of the carbon chains. If there is an excess of area available for each molecule, it might explain the highest compressibility observed in $\chi_{\text{DPPC}} \approx 0.5$. However, for $\Pi = 30$ mN/m, the inverse effect occurs, the area is below the predicted for an ideal mixture, it suggests that the molecules are attracted and forms a more compact monolayer, and the monolayer is less compressible, since there is less available free space for the lipids to be compressed. Finally, at higher surface pressure, $\Pi = 40$ mN/m, the dependency of the area is similar to an ideal mixture. A deeper understanding of this optimum packing could be achieved with molecular simulations in the future.

Interfacial Shear Rheology. We also investigated the mechanical behavior of nonhomogeneous monolayers under sinusoidal shear deformations in a range of angular frequencies (0.13 – 10 s^{-1}). In Figure 10, we show the shear interfacial storage modulus (G') and the shear interfacial loss modulus (G'') as a function of χ_{DPPC} .

The behavior of the mixed monolayers is similar for all the three surface pressures. The monolayer mechanical behavior at

low χ_{DPPC} is fluidlike, with $G' \sim 0$. For higher χ_{DPPC} , G' is larger, but smaller than G'' except in the vicinity of $\chi_{\text{DPPC}} = 0.5$: the layer behaves as a viscoelastic fluid. This behavior changes to that of a viscoelastic solid around $\chi_{\text{DPPC}} = 0.5$, where G' slightly greater than G'' and both are nonzero. Close to $\chi_{\text{DPPC}} = 1$, both G' and G'' no longer change appreciably and have the largest values. This behavior is consistent with the percolation effect reported before with condensed area ~ 0.9 . Minima of G'' are visible close to $\chi_{\text{DPPC}} \sim 0.5$ where the monolayers are the most compressible. These monolayers are the most loosely packed (the more compressible ones), and hence, their shear viscosity is likely smaller for this reason. The reason why G' is larger than G'' at this point is less obvious. An optimum packing could possibly generate attraction between molecules at the surface and result in a viscoelastic solid, possibly a two-dimensional gel. Overall, the shear viscosities $\eta_s = G''/\omega$ are quite small: with $\omega = 0.13$ s^{-1} , η_s ranges between 0.01 and 1 mN·s/m, with the highest values being obtained for DPPC which is in the LC phase at the pressures investigated in this study.

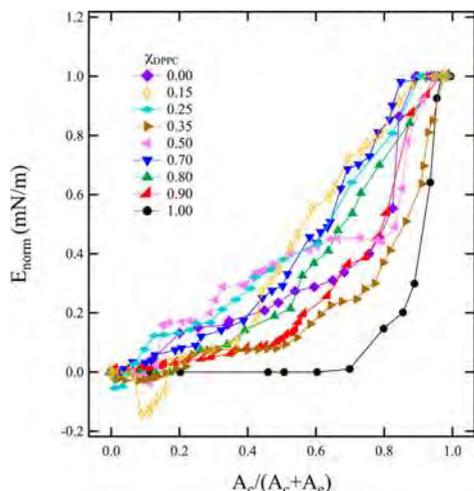


Figure 8. Normalized compression modulus (E_{norm}) as a function of the percentage of the condensed area.

Wilke et al.,¹³ measured the diffusion coefficient D of beads and domains in DMPC-DSPC mixed monolayers at $\Pi = 10$ mN/m and used the data to evaluate the surface shear viscosity. The results depend strongly on the model used in the calculation. In our work we measured the interfacial shear viscosity with the magnetic needle method, where the mechanical model used to obtain the viscosity is more straightforward. The model has been carefully validated using measurements of the velocity profile around the needle and it has been shown to be accurate for many different types of monolayers.⁴⁶

We compared our results with those of Sachan et al.¹¹ who used a similar method (magnetic button instead of needle). They found that the viscosity increases with the area fraction of domains ϕ and is well represented by a Krieger formula for spheres^{29,47} assumed to remain valid for discs:

$$\eta_s = \frac{\eta_{s0}}{\left(1 - \frac{\phi}{\phi_p}\right)^2} \quad (9)$$

where ϕ_p is the area fraction for random close packing and η_{s0} is the viscosity limit for vanishing ϕ . In our experiments, $\phi = A_c/(A_c + A_e)$ and ϕ_p is the area fraction at the percolation threshold. Figure 11 shows the viscosity data taken in the phase coexistence region plotted versus $1 - \phi/\phi_p$.

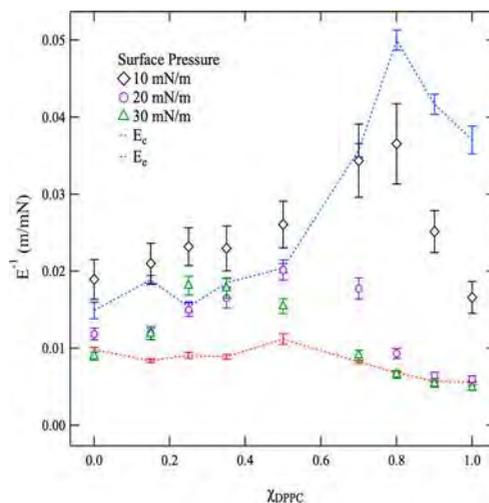


Figure 9. Surface compressibility as a function of DPPC molar fraction at three different surface pressures. The dashed lines correspond to the compressibility at the phase transitions Π_c and Π_e as taken from Table 1.

As in ref 11, part of the data follows eq 9, with a limit η_{s0} that increases slightly with surface pressure. Two exceptions are noticeable: the viscosity of the layers with $\chi_{\text{DPPC}} = 0.5$ and 1 are smaller, as expected in view of the viscosity behavior in Figure 10: the viscosity shows a minimum for $\chi_{\text{DPPC}} = 0.5$ and decreases when χ_{DPPC} approaches 1. The behavior predicted by eq 9 is therefore not general and depends of additional molecular details (possibly on the shape of the domains and on their interactions).

CONCLUSIONS

In this study, we reported the impact of the addition of POPE in DPPC monolayers on their mechanical properties. We found that the LE–LC coexistence phase of pure DPPC shifts to higher surface pressures as the POPE molar fraction increases in the monolayer as corroborated by the BAM images. As in other lipid systems, the surface pressure is not constant in the LE–LC coexistence region. The compression elastic modulus increases with the amount of LC phase, but less than predicted by a simple effective medium model. The differences arise from the fact that, upon compression, the domains grow at a rate faster than the compression rate, but not fast enough to reach thermodynamic equilibrium, in which case the modulus should be zero. Before reaching the LC phase, the condensed phase percolates and the modulus no

Table 3. Percolation Thresholds in Percentage of Condensed Phase for Different DPPC Molar Fractions and Determined Either from the Images or from the Saturation of the Elastic Modulus

| | χ_{DPPC} | | | | | | | | |
|--|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| | 0 | 0.15 | 0.25 | 0.35 | 0.5 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 1 |
| percolation threshold from BAM images | 0.84 ± 0.06 | 0.85 ± 0.06 | 0.85 ± 0.04 | 0.86 ± 0.06 | 0.92 ± 0.03 | 0.88 ± 0.05 | 0.92 ± 0.04 | 0.94 ± 0.02 | 0.95 ± 0.02 |
| percolation threshold from elastic moduli (Figure 8) | 0.79 ± 0.06 | 0.78 ± 0.07 | 0.76 ± 0.07 | 0.87 ± 0.05 | 0.88 ± 0.03 | 0.82 ± 0.03 | 0.89 ± 0.03 | 0.98 ± 0.02 | 0.998 ± 0.02 |

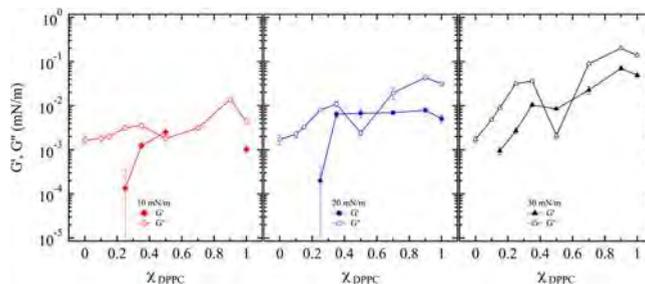


Figure 10. Interfacial shear storage (G') and loss modulus (G'') as a function of DPPC molar fraction at three different surface pressures. The lines are guides for the eye. The experimental error bars are smaller than the symbol size in some cases.

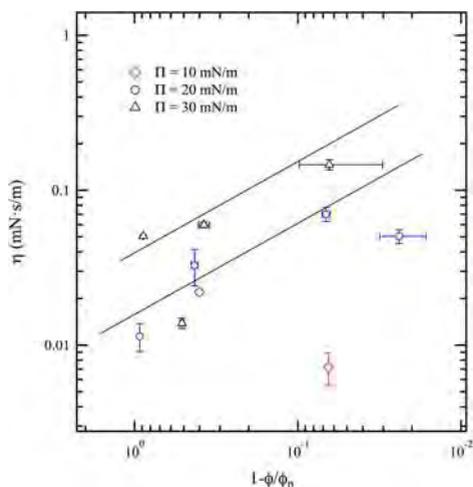


Figure 11. Interfacial shear viscosity as a function of $1 - \phi/\phi_p$ (eq 9) of POPE–DPPC mixed monolayers for three constant surface pressures in the LE–LC phase coexistence region. The two lowest points on the left correspond to $\chi_{\text{DPPC}} = 0.5$ and the two lowest points on the right to $\chi_{\text{DPPC}} = 1$. The lines are predictions from eq 9, and their slope is equal to 2.

longer change significantly. The percolation threshold is quite high, suggesting repulsive interactions between domains. The behavior of the shear moduli is consistent with these findings.

We observed a change in the form of the domains in the coexistence region around $\chi_{\text{DPPC}} = 0.5$, that could possibly be related to a change of the line tension. Around this composition, the kink in the $\Pi(a)$ curve vanishes and both the compression modulus and the shear loss modulus is minimum when the surface pressure is large enough. This behavior could be due to an optimum in molecular packing. Measurements of the time dependence of the mechanical properties, performed using oscillating shear and compression with variable frequencies are currently underway, in order to clarify further this complex mechanical behavior.

To summarize our original findings: we explained the compression behavior of the phase separated domains in the mixed monolayers by a dependence of the mechanical response upon the velocity of compression. Domain

percolation seems to be a general feature, the percolation concentration giving information about the interactions between domains. The mechanical behavior upon compression and shear were found to be correlated.

These results are an important step that will help to better understand the behavior of biological membranes. These membranes contain not only different types of lipids, but also proteins and small molecules such as cholesterol. There is nowadays a considerable activity on lipid rafts that are nothing else than phase separated lipid bilayers and where proteins tend to segregate, facts which seem quite important for the understanding of membrane function.⁴⁸ Clarifying the phase separation process in layers is therefore an important goal.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.langmuir.9b02995>.

Isotherms of POPE monolayers for different times after spreading on the air–water interface, BAM images obtained at different surface pressures spanned in the studied DPPC molar fractions, surface pressure at the kink of the isotherms and the surface pressure at the onset of the liquid expanded phase as observed with BAM, expanded area to condensed area ratio as a function of χ_{DPPC} at $\Pi = 15, 25, 30,$ and 35 mN/m, Gibbs excess free energy for different surface pressures as a function of the monolayer composition, and procedure followed for BAM images analysis to determine condensed and expanded areas (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: gabriel.espinosa@umich.mx.

ORCID

Rolando Castillo: 0000-0001-6331-0311

Gabriel Espinosa: 0000-0003-2581-4273

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Francisco Monroy and Jean-Pierre Hulin for useful suggestions concerning the application of effective medium models. This work was supported by CONACYT Ciencia Basica program Grants CB-2013/220331 to G.E. and CB-2012/182526 to J.C.-T. G.E. acknowledges CIC-UMSNH

for annual grants. A.S.L. was supported by CONACYT doctoral scholarship. The authors are grateful to CONACYT Mexican Soft Matter Network. We thank Salvador Ramos for technical assistance with the BAM experiments.

REFERENCES

- (1) Mouritsen, O. G. *Life - As a Matter of Fat*; Springer, 2004.
- (2) Sprong, H.; van der Sluijs, P.; van Meer, G. How Proteins Move Lipids and Lipids Move Proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2* (7), 504–513.
- (3) Zhang, Y. L.; Matar, O. K.; Craster, R. V. Analysis of Tear Film Rupture: Effect of Non-Newtonian Rheology. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *262* (1), 130–148.
- (4) Marsh, D. Lateral Pressure in Membranes. *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembr.* **1996**, *1286* (3), 183.
- (5) Yokoi, N.; Yamada, H.; Mizukusa, Y.; Bron, A. J.; Tiffany, J. M.; Kato, T.; Kinoshita, S. Rheology of Tear Film Lipid Layer Spread in Normal and Aqueous Tear-Deficient Dry Eyes. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **2008**, *49* (12), 5319.
- (6) Caruso, B.; Mangiarotti, A.; Wilke, N. Stiffness of Lipid Monolayers with Phase Coexistence. *Langmuir* **2013**, *29* (34), 10807–10816.
- (7) Gaines, G. L. *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces*; John Wiley & Sons Inc, 1966.
- (8) Pallas, N. R.; Pethica, B. A. Liquid-Expanded to Liquid-Condensed Transitions in Lipid Monolayers at the Air/Water Interface. *Langmuir* **1985**, *1* (4), 509–513.
- (9) Arriaga, L. R.; López-Montero, I.; Ignés-Mullol, J.; Monroy, F. Domain-Growth Kinetic Origin of Nonhorizontal Phase Coexistence Plateaux in Langmuir Monolayers: Compression Rigidity of a Raft-Like Lipid Distribution. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114* (13), 4509–4520.
- (10) Bornert, M.; Bretheau, T.; Gilormini, P. *Homogenization in Mechanics of Materials*; ISTE, 2008.
- (11) Sachan, A. K.; Choi, S. Q.; Kim, K. H.; Tang, Q.; Hwang, L.; Lee, K. Y. C.; Squires, T. M.; Zasadzinski, J. A. Interfacial Rheology of Coexisting Solid and Fluid Monolayers. *Soft Matter* **2017**, *13* (7), 1481–1492.
- (12) Espinosa, G.; López-Montero, I.; Monroy, F.; Langevin, D. Shear Rheology of Lipid Monolayers and Insights on Membrane Fluidity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108* (15), 6008–6013.
- (13) Wilke, N.; Vega Mercado, F.; Maggio, B. Rheological Properties of a Two Phase Lipid Monolayer at the Air/Water Interface: Effect of the Composition of the Mixture. *Langmuir* **2010**, *26* (13), 11050–11059.
- (14) Harayama, T.; Riezman, H. Understanding the Diversity of Membrane Lipid Composition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19* (5), 281–296.
- (15) Schroeder, R.; London, E.; Brown, D. Interactions between Saturated Acyl Chains Confer Detergent Resistance on Lipids and Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anchored Proteins: GPI-Anchored Proteins in Liposomes and Cells Show Similar Behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91* (25), 12130–12134.
- (16) Krägel, J.; Kretzschmar, G.; Li, J. B.; Loglio, G.; Miller, R.; Möhwald, H. Surface Rheology of Monolayers. *Thin Solid Films* **1996**, *284–285* (1), 361–364.
- (17) Möhwald, H. Phospholipid and Phospholipid-Protein Monolayers at the Air/Water Interface. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1990**, *41*, 441–476.
- (18) Kim, K.; Choi, S. Q.; Zasadzinski, J. A.; Squires, T. M. Interfacial Micro-rheology of DPPC Monolayers at the Air–Water Interface. *Soft Matter* **2011**, *7* (17), 7782.
- (19) Bringezu, F.; Ding, J.; Brezesinski, G.; Zasadzinski, J. A. Changes in Model Lung Surfactant Monolayers Induced by Palmitic Acid. *Langmuir* **2001**, *17* (12), 4641–4648.
- (20) Rawicz, W.; Olbrich, K. C.; McIntosh, T.; Needham, D.; Evans, E. Effect of Chain Length and Unsaturation on Elasticity of Lipid Bilayers. *Biophys. J.* **2000**, *79* (1), 328–339.
- (21) Ahn, T.; Yun, C.-H. H. Phase Properties of Liquid-Crystalline Phosphatidylcholine/Phosphatidylethanolamine Bilayers Revealed by Fluorescent Probes. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *369* (2), 288–294.
- (22) Dawaliby, R.; Trubbia, C.; Delporte, C.; Noyon, C.; Ruysschaert, J. M.; Van Antwerpen, P.; Govaerts, C. Phosphatidylethanolamine Is a Key Regulator of Membrane Fluidity in Eukaryotic Cells. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291* (7), 3658–3667.
- (23) Malcharek, S.; Hinz, A.; Hilterhaus, L.; Galla, H.-J. Multilayer Structures in Lipid Monolayer Films Containing Surfactant Protein C: Effects of Cholesterol and POPE. *Biophys. J.* **2005**, *88* (4), 2638–2649.
- (24) Volinsky, R.; Cwiklik, L.; Jurkiewicz, P.; Hof, M.; Jungwirth, P.; Kinnunen, P. K. J. Oxidized Phosphatidylcholines Facilitate Phospholipid Flip-Flop in Liposomes. *Biophys. J.* **2011**, *101* (6), 1376–1384.
- (25) Voss, L. F.; Bazerbashi, M. F.; Beekman, C. P.; Hadad, C. M.; Allen, H. C. Oxidation of Oleic Acid at Air/Liquid Interfaces. *J. Geophys. Res.* **2007**, *112* (6), 1–9.
- (26) Brooks, C. F.; Fuller, G. G.; Frank, C. W.; Robertson, C. R. An Interfacial Stress Rheometer To Study Rheological Transitions in Monolayers at the Air-Water Interface. *Langmuir* **1999**, *15* (7), 2450–2459.
- (27) Ding, J.; Warriner, H. E.; Zasadzinski, J. A.; Schwartz, D. K. Magnetic Needle Viscometer for Langmuir Monolayers. *Langmuir* **2002**, *18* (7), 2800–2806.
- (28) Naumann, C. A.; Brooks, C. F.; Knoll, W.; Fuller, G. G.; Frank, C. W. Viscoelastic Properties of Lipopolymers at the Air-Water Interface: A Combined Interfacial Stress Rheometer and Film Balance Study. *Langmuir* **1999**, *15* (13), 7752–7761.
- (29) Macosko, C. W. *Rheology: Principles, Measurements and Applications*; Wiley, 1996; Vol. 86.
- (30) Jyoti, A.; Prokop, R. M.; Li, J.; Vollhardt, D.; Kwok, D. Y.; Miller, R.; Möhwald, H.; Neumann, A. W. An Investigation of the Compression Rate Dependence on the Surface Pressure-Surface Area Isotherm for a Dipalmitoyl Phosphatidylcholine Monolayer at the Air/Water Interface. *Colloids Surf.* **1996**, *116* (1–2), 173–180.
- (31) Rey Gómez-Serranillos, I.; Miñones, J.; Dynarowicz-Łątka, P.; Miñones, J.; Conde, O. Surface Behavior of Oleoyl Palmitoyl Phosphatidyl Ethanolamine (OPPE) and the Characteristics of Mixed OPPE-Miltefosine Monolayers. *Langmuir* **2004**, *20* (26), 11414–11421.
- (32) Albrecht, O.; Gruler, H.; Sackmann, E. Polymorphism of Phospholipid Monolayers. *J. Phys. (Paris)* **1978**, *39* (3), 301–313.
- (33) Broniatowski, M.; Mastalerz, P.; Flasiński, M. Studies of the Interactions of Ursane-Type Bioactive Terpenes with the Model of Escherichia Coli Inner Membrane - Langmuir Monolayer Approach. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2015**, *1848* (2), 469–476.
- (34) Mconlogue, C. W.; Vanderlick, T. K. A Close Look at Domain Formation in DPPC Monolayers. *Langmuir* **1997**, *13* (26), 7158–7164.
- (35) Li, J. B.; Miller, R.; Vollhardt, D.; Möhwald, H. Spreading Concentration Effect on the Morphology of Phospholipid Monolayers. *Thin Solid Films* **1998**, *327–329*, 84–86.
- (36) Gutierrez-Campos, A.; Diaz-Leines, G.; Castillo, R. Domain Growth, Pattern Formation, and Morphology Transitions in Langmuir Monolayers. A New Growth Instability. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114* (15), 5034–5046.
- (37) Bruinsma, R.; Rondelez, F.; Levine, A. Flow-Controlled Growth in Langmuir Monolayers. *Eur. Phys. J. E: Soft Matter Biol. Phys.* **2001**, *6* (3), 191–200.
- (38) Krüger, P.; Lösche, M. Molecular Chirality and Domain Shapes in Lipid Monolayers on Aqueous Surfaces. *Phys. Rev. E: Stat. Phys., Plasmas, Fluids, Relat. Interdiscip. Top.* **2000**, *62* (5), 7031–7043.
- (39) Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9* (7), 671.
- (40) Costin, I. S.; Barnes, G. T. Two-Component Monolayers. II. Surface Pressure-Area Relations for the Octadecanol-Docosyl Sulphate System. *J. Colloid Interface Sci.* **1975**, *51* (1), 106–121.

- (41) Gradella Villalva, D.; Diociaiuti, M.; Giansanti, L.; Petaccia, M.; Bešker, N.; Mancini, G. Molecular Packing in Langmuir Monolayers Composed of a Phosphatidylcholine and a Pyrene Lipid. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120* (6), 1126–1133.
- (42) Mertens, S.; Moore, C. Continuum Percolation Thresholds in Two Dimensions. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* **2012**, *86* (6), 061109.
- (43) Israelachvili, J. N.; Mitchell, D. J.; Ninham, B. W. Theory of Self-Assembly of Lipid Bilayers and Vesicles. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1977**, *470* (2), 185–201.
- (44) Israelachvili, J. N. Physical Principles and Modes of Interaction of Membrane Lipids and Amphiphiles. In *Chemistry and Biological Activities of Bacterial Surface Amphiphiles*; Elsevier, 1981; pp 119–123.
- (45) van Meer, G.; Voelker, D. R.; Feigenson, G. W. Membrane Lipids: Where They Are and How They Behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9* (2), 112–124.
- (46) Reynaert, S.; Brooks, C. F.; Moldenaers, P.; Vermant, J.; Fuller, G. G. Analysis of the Magnetic Rod Interfacial Stress Rheometer. *J. Rheol. (Melville, NY, U. S.)* **2008**, *52* (1), 261–285.
- (47) Ding, J.; Warriner, H. E.; Zasadzinski, J. A. Viscosity of Two-Dimensional Suspensions. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *88* (16), 168102.
- (48) Lingwood, D.; Simons, K. Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Science (Washington, DC, U. S.)* **2010**, *327* (5961), 46–50.