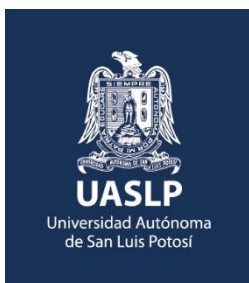


Influencia de polímeros biomiméticos del glucocálix en el movimiento browniano de partículas coloidales. © 2020 by Juan Manuel Hernández Meza is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International





INFLUENCIA DE POLÍMEROS BIOMIMÉTICOS DEL GLUCOCÁLIX EN EL MOVIMIENTO BROWNIANO DE PARTÍCULAS COLOIDALES

Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Interdisciplinarias presenta

Juan Manuel Hernández Meza

Línea de Investigación

Biofísica y Bioingeniería

Director de Tesis

Dr. Bernardo Yáñez Soto, Universidad Autónoma de San Luis Potosí

San Luis Potosí, S. L. P. a 10 de diciembre de 2020



POSGRADO
EN CIENCIAS
INTERDISCIPLINARIAS



Resumen

Las interacciones de partículas con membranas celulares desempeñan un papel importante en diversas aplicaciones biomédicas y biotecnológicas. Entre los principales ejemplos se encuentran la administración de medicamentos y quimioterapia a través de nanoportadores, la fototerapia dirigida y los biosensores. Por otro lado, un aspecto fundamental en los sistemas de materia blanda, tanto desde el punto de vista fundamental como del tecnológico, es la capacidad de determinar el potencial de interacción de las diferentes especies en el sistema. En este trabajo se reportan los potenciales de interacción y los componentes del coeficiente de difusión a bajas fuerzas iónicas y concentraciones muy diluidas de partículas de poliestireno de $1\mu\text{m}$ que difunden por encima del vidrio desnudo, el vidrio recubierto con polielectrolitos o el vidrio recubierto con una monocapa de fosfolípidos. Ya que las partículas son esferas de poliestireno (PS) con una densidad de carga diferente de cero en sus superficies, los sistemas partículas/superficies considerados aquí pueden ser vistos como un modelo simplificado de dominios proteicos o membranas celulares teniendo interacciones no específicas con las paredes.

Para determinar los coeficientes de difusión de partículas, se reconstruyeron las trayectorias de las partículas en 3D analizando las imágenes de las partículas difractadas (función de difusión puntual) junto con el uso de técnicas convencionales de vídeo-microscopía. Con las trayectorias tridimensionales se calcularon los perfiles de potenciales de interacción entre las partículas y la pared y los componentes del coeficiente de difusión D_x , D_y y D_z , en función de la distancia entre las partículas y la pared z . Los potenciales de interacción se obtuvieron mediante la adquisición de los histogramas de altura de las partículas en relación con una pared horizontal, seguido de una interpretación adecuada y ajustada a la correspondiente curva de inversión de Boltzmann.

Encontramos coeficientes de difusión de partículas más pequeños a distancias cortas y largas de la pared en comparación con las predicciones hidrodinámicas teóricas. Estas desviaciones se interpretaron como un aumento aparente de la viscosidad del medio. Estos resultados se comparan con varias aproximaciones asintóticas desarrolladas en las teorías relacionadas con el efecto electroviscoso y el deslizamiento parcial y cuyos efectos producen desviaciones de las conocidas fórmulas hidrodinámicas del Brenner. Por otro lado, una importante contribución de nuestro estudio en relación con la literatura anterior consistió en demostrar que $\langle z \rangle$ también puede cambiar debido a las variaciones de la longitud gravitatoria, $lg=k_B T/mg$, es decir, debido a la transferencia de masa entre las partículas y las paredes funcionalizadas.

En conclusión, los bajos niveles de sal exacerbaron los llamados efectos electroviscosos, restringiendo los coeficientes de difusión por debajo de los valores predichos por la teoría hidrodinámica estándar, tanto a corta como a larga distancia de la pared. Estos resultados fueron comparados a una teoría simplificada o a una elaborada para los EVE. Esta comparación produjo valores de conductividad del mismo orden de magnitud que los encontrados en las mediciones estáticas independientes. Además demostramos que la técnica de videomicroscopía utilizada aquí en combinación con el tamaño de la partícula elegida permite el rastreo de esferas micro-tamaño a distancias de varios diámetros de partícula por encima de la pared, lo que hace que la determinación de la longitud gravitatoria (peso de la partícula) sea más precisa.

Abstract

Particle-cell membrane interactions play an important role in multiple biomedical and biotechnological applications. Major examples include drug delivery and chemotherapy via nanocarriers, targeted phototherapy, and biosensors. On the other hand, an essential aspect in soft matter systems, both from a fundamental as a technological point of view, is being able to determine the interaction potential of the different species in the system. In this work, the interaction potentials and the components of the diffusion coefficient were measured at low ionic forces with highly diluted concentrations of polystyrene particles from 1 μ m that diffused over bare glass, glass coated with polyelectrolytes or glass coated with a phospholipid monolayer. Since the particles are polystyrene spheres with a non-zero charge density on their surfaces, the particle/surface systems considered here can be seen as a simplified model of protein domains or cell membranes having non-specific interactions with walls.

To determine the particle diffusion coefficients, particle trajectories were reconstructed in 3D by analyzing the images of the diffracted particles (point spread function) together with the use of conventional video-microscopy techniques. With the three-dimensional trajectories, interaction potential profiles between the particles and the wall; and the diffusion coefficient components D_x , D_y and D_z were calculated as a function of the distance between particles and the wall z . The interaction potentials were obtained by acquiring particles height histograms in relation to a horizontal wall, followed by an appropriate interpretation and adjustment to the corresponding Boltzmann inversion curve.

In comparison with theoretical hydrodynamic predictions, we found smaller particle diffusion coefficients at short and long distances from the wall. These deviations were interpreted as an apparent increase in the viscosity of the medium. Results are compared with several asymptotic approaches developed in the theories related to the electroviscous effect (EVE) and partial slip, whose effects produce deviations from the known Brenner hydrodynamic formulas. On the other side, compared with previous literature, an important contribution of our study consist in demonstrating that $\langle z \rangle$ can also change due to variations of the gravitational length, $l_g = kBT/mg$, that is, due to the mass transfer between the particles and the functionalized walls.

In conclusion, low salt levels exacerbated the so-called electroviscous effects, restricting the diffusion coefficients below the values predicted by the standard hydrodynamic theory, both at short and long distance from the wall. These results were compared to a simplified theory or to one developed for EVE. This comparison produced conductivity values of the same order of magnitude as found in the independent static measurements. In addition, we demonstrated that the videomicroscopy technique used here in combination with the chosen particle size allows the tracking of micro-sized spheres at distances of several particle diameters above the wall, which makes the determination of the gravitational length (particle weight) more accurate.

Agradecimientos

Han pasado poco más de 12 años desde que llegue por primera vez al Instituto de Física y sigue pareciendo que fue ayer cuando entre por primera vez al salón de clase o a un laboratorio. Es imposible no mirar hacia atrás y encontrar a muchas personas que han contribuido a mi formación académica, profesional y a estas alturas, también personales. A todas y cada una de ellas, gracias.

Ahora que me encuentro terminando una etapa más no quiero perder la oportunidad de extender una gratitud particular a esas personas que me han acompañado en esta aventura llamada “el doctorado”.

Empezando por el Dr. Bernardo, mi tutor y asesor de tesis. Son muchas las cosas que hay que agradecerle, la confianza, el respeto, el apoyo, el trabajo en equipo y el siempre estar impulsando mi formación como profesionista más allá de lo necesario para el laboratorio. Gracias por mostrarme un modo distinto de hacer y trabajar en la ciencia.

Dr. Rodrigo Vélez, gracias por el trato siempre equitativo y humilde, por siempre estar dispuesto a ayudar, por compartir tus conocimientos pero sobre todo, gracias por vernos no solo como estudiantes sino como personas. Gracias por las tardes que compartes con los alumnos, esas que nos ayudan mucho para entender más y mejor la realidad de ciencia.

Dr. José Luis Arauz, gracias por el acceso a su laboratorio, por la confianza para que hiciera uso de los equipos pero, en particular gracias por aquella charla que tuvo conmigo allá por el 2008. Quizá no la recuerde pero para mí esa plática fue un parteaguas que me ayudó a ubicarme como estudiante y posteriormente como investigador.

Dra. Ángeles Ramírez Saito, doctora y amiga. Gracias por la dedicación, la paciencia, el tiempo, las pláticas, por el interés constante en el bienestar de los alumnos, por la integridad y la preocupación que dedicaste a mi trabajo. Sin ti esto hubiese costado muchísimo más trabajo.

A Silvia, mi colega, compañera y mejor amiga. Gracias por seguir siempre firme al pie del cañón. En las altas y en las bajas, por vivir este proceso conmigo y por siempre recordarme que se puede aun cuando se quiere tirar la toalla.

Para finalizar, quiero agradecer a mi familia por el respeto a mis decisiones, por impulsarme a seguir adelante, por escucharme siempre, por no rendirse. Gracias especiales a mamá, que consciente o inconscientemente, con sus palabras, actos y detalles siempre ha sido un ejemplo de perseverancia y no abandono.

Índice

Contenido

Resumen	1
Abstract	2
Índice	4
Influencia de polímeros biomiméticos del glucocálix en el movimiento browniano de partículas coloidales.....	6
Exposición del problema	6
Glucocálix	7
Composición del glucocálix	8
Importancia funcional	9
Ingeniería de superficies	10
Ingeniería de Biosuperficies	11
Objetivos	12
Resultados	12
Referencias	13
Movimiento Browniano de partículas coloidales inmersas en una solución con baja fuerza iónica en la vecindad de superficies blandas	16
Introducción	16
Teoría	18
Teoría hidrodinámica	18
Efectos electroviscosos en partículas que se mueven cerca de una pared	19
Materiales y métodos	23
Resultados y discusión	26
Perfiles de difusividad	28
Longitud de deslizamiento parcial en el sistema de lípidos/partículas	30
Efectos electroviscosos a grandes distancias de partícula/pared	30
Efecto electroviscoso debido al movimiento relativo entre las partículas y la pared	32
Efectos de las fuerzas conservadoras en los coeficientes de difusión	35
Resumen de los EVE en los sistemas de partículas/pared	38
Conclusión	39
Referencias	40
Interacción de partículas coloidales con superficies complejas biológicamente relevantes	43

Introducción	43
Materiales y métodos.....	45
Resultados y discusión.....	47
Perfiles de la funcionalización de superficies.....	47
Las trayectorias de las partículas y las alturas medias	47
Distribuciones de probabilidad de altura.....	50
Potenciales de interacción	53
Conclusiones	58
Referencias.....	60

Influencia de polímeros biomiméticos del glucocálix en el movimiento browniano de partículas coloidales

Exposición del problema

Las interacciones de partículas con las membranas celulares desempeñan un papel importante en diversas aplicaciones biomédicas y biotecnológicas. Entre los principales ejemplos se encuentran la administración de medicamentos y la quimioterapia a través de nanoportadores [1-4], la fototerapia dirigida [5, 6] y las aplicaciones de biosensores [7-9]. Durante la absorción por una célula viva a través de la endocitosis [10-12], las nanopartículas a menudo se acercan a las membranas celulares, lo que altera su movimiento de manera compleja.

En pequeñas escalas de longitud y tiempo de movimiento, la dinámica del fluido alrededor de las partículas suspendidas está gobernada por las ecuaciones de Stokes, siempre y cuando los efectos viscosos dominen sobre los efectos inerciales. En estas condiciones, se logra una descripción completa del movimiento de las partículas por medio de la función de movilidad hidrodinámica que tiende un puente entre las velocidades de las partículas y las fuerzas ejercidas sobre sus superficies. El movimiento de las partículas en masa es bien conocido y se ha estudiado ampliamente desde el trabajo pionero de Stokes [13]. Sin embargo, en situaciones realistas, el movimiento se produce a menudo en configuraciones geométricas en las que la movilidad cambia de manera significativa en relación con su correspondiente valor del bulto.

El primer intento de abordar el efecto de los límites en el movimiento de una partícula suspendida se remonta a Lorentz [14], quien empleó la técnica de solución de imágenes para calcular el flujo de Stokes inducido por una singularidad de fuerza puntual que actuaba cerca de una pared dura plana infinitamente extendida. Esta técnica de solución es aplicable cuando la partícula se encuentra a una distancia moderada de la pared. Una solución completamente analítica ha sido propuesta más tarde por Brenner [15] utilizando coordenadas bisféricas para abordar el movimiento lento de una partícula de tamaño verdaderamente nítido que se mueve axisimétricamente hacia una superficie plana. El movimiento traslacional viscoso paralelo a una pared plana se ha investigado más a fondo utilizando expansiones asintóticas coincidentes [16, 17].

El movimiento de partículas a través de un canal entre dos paredes adyacentes ha recibido la atención de los investigadores desde hace mucho tiempo. Un enfoque diligente ha sido propuesto por Faxen [18] quien calculó la movilidad de las partículas para el movimiento paralelo a las paredes para las situaciones particulares cuando la partícula está en el plano medio entre dos paredes rígidas [19].

Durante los últimos años, el movimiento de las partículas en geometrías confinadas recuperó un mayor interés tras el advenimiento de elaboradas técnicas experimentales que

permiten una medición precisa y fiable de la movilidad cerca de las interfaces. Entre las técnicas más antiguas que se han utilizado se encuentran el láser [20] y las pinzas ópticas [21], la fluorescencia [22] y la video-microscopía digital [23], la dispersión dinámica de luz de onda evanescente [24] y la técnica tridimensional de velocidad de reflexión interna total [25].

Glucocálix

El glucocálix es un recubrimiento glicoproteínas y polisacáridos que rodea las membranas celulares (figura 1). Es una zona rica en carbohidratos, principalmente en glicoproteínas y proteoglicanos. El grosor del glucocálix depende del tejido donde este se encuentre y, puede medir entre unos 100 nm hasta algunos micrómetros [26]. Es una estructura altamente especializada cuya composición, características y roles dependen de la localización, estado de madurez y función de las células que lo poseen. Como ya se mencionó, esta capa consiste de cadenas de carbohidratos, glicoproteínas y glucolípidos, los cuales sirven como estructura de soporte [27]. En general, la porción de carbohidratos de los glucolípidos que se encuentran en la superficie de las membranas plasmáticas ayuda a estas moléculas a contribuir al reconocimiento celular, la comunicación y la adhesión celular.

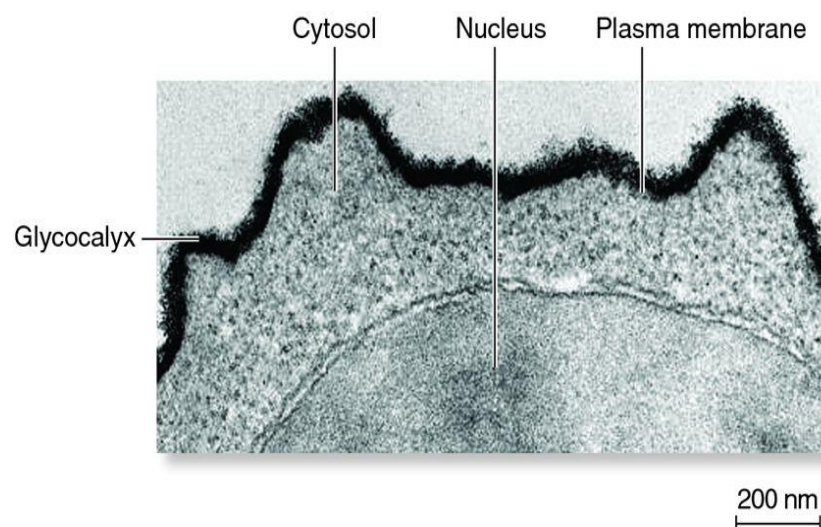


Figura 1. Glucocálix de linfocito. Recubrimiento asociado a la membrana celular basado en polisacáridos que envuelve a diferentes tipos de células.

Las células utilizan al glucocálix como un identificador para distinguir entre sus propias células, las células enfermas, células invasoras y los tejidos trasplantados. Además en la estructura del glucocálix se encuentran las biomoléculas de adhesión celular que permiten a las células reconocerse y adherirse unas con otras y así guiar el movimiento de las células durante el desarrollo embrionario. Al mismo tiempo, la naturaleza química de la membrana y los diversos componentes del glucocálix impiden la adsorción no específica de moléculas extracelulares.

Composición del glucocálix

El glucocálix es una red de fibras altamente hidratada que cubre la monocapa externa de la membrana de células epiteliales, bacterias y otras células. Los proteoglicanos y glicoproteínas son componentes estructurales genéricos del glucocálix, sin embargo la estructura y composición bioquímica precisa son determinadas por el tipo celular y las condiciones mecánicas y fisicoquímicas predominantes (Figura 2) [29]. Algunos ejemplos de la composición y función del glucocálix por tipo celular son:

- Bacterias: el glucocálix puede encontrarse como fibras compactas de polisacáridos (formando una cápsula), o difusa e irregularmente (formando una capa limosa), y entre sus funciones está la de actuar como capa protectora contra los fagocitos y promover la adhesión a superficies inertes [30].
- Células epiteliales: En las glándulas mamarias, tracto reproductivo femenino, pulmones, riñones, vesícula biliar, páncreas o superficie ocular el glucocálix está constituido primordialmente por mucinas, un grupo de glicoproteínas que contienen hasta 50% de su peso en sacáridos. Dentro de sus funciones se encuentra el enmascaramiento de antígenos de superficie, la regulación de la adhesión celular y el mantenimiento de la hidratación de las mucosas, así como las propiedades de inadherencia entre la superficie celular y el moco producido en estos tejidos [31, 32].
- Células endoteliales: Su glucocálix consiste en proteoglicanos y glucosaminoglicanos, y entre sus funciones principales está la de proteger la membrana plasmática de daño mecánico y químico y regula la inflamación previniendo la adhesión/rodamiento de leucocitos en el tejido sano [33].
- Glóbulos rojos: el glucocálix provee a la superficie de una carga neta negativa debido a la presencia de ácido siálico ionizado, que por impedimento estérico y por interacciones electrostáticas previene la agregación de las células. Adicionalmente, los sacáridos del glucocálix forma la base de compatibilidad de transfusiones de sangre [34].
- Células reproductivas: El glucocálix confiere funciones inmunosupresoras a los espermatozoides, inadhesividad en el tracto reproductivo femenino, resistencia a la adsorción de proteínas sobre su superficie, e interviene en el reconocimiento y ligación del espermatozoide al ovulo durante la fecundación [35, 36].
- Enterocitos. En el sistema digestivo, la primera estructura celular que la materia ingerida contacta es el glucocálix, y por lo tanto, una de sus funciones es la de actuar como filtro de dichos materiales. Adicionalmente, la presencia de sacáridos con carga negativa protegen las proteínas de la membrana celular de la digestión por las enzimas pancreáticas [37].

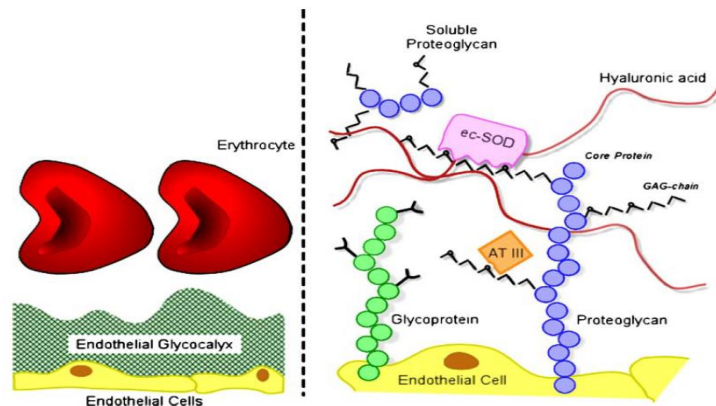


Figura 2. Representación esquemática de la composición de glucocáliz de células epiteliales.

La composición de la red de proteoglicanos, glicoproteínas y glucosaminoglicanos unida a la membrana y los glucosaminoglicanos solubles no pueden ser vistos como un sistema estático. El glucocáliz es muy dinámico, con moléculas unidas a la membrana que se reemplazan constantemente y sin un límite definido entre los elementos localmente sintetizados y asociados [38]. Estas características altamente dinámicas le brindan al glucocáliz otras funciones además de las ya mencionadas.

Importancia funcional

El glucocáliz es capaz de inhibir las interacciones célula-célula por impedimento estérico, control de la implantación del embrión al endometrio y desarrollo embrionario, y la regulación de las señales celulares como ligandos para las selectinas [39]. En arterias mesentéricas de rata haciendo uso de moléculas de dextran fluorescentes de varios pesos moleculares se demostró que el glucocáliz endotelial es capaz de limitar el acceso de ciertas moléculas hacia la membrana celular [40]. La eliminación parcial del glucocáliz por acción enzimática causa una caída en la permeabilidad mediada por esta estructura en capilares del miocardio de la rata favorece la formación de edemas [41].

El glucocáliz de las células epiteliales puede controlar el espacio entre los receptores de la E-selectina en la superficie de las células epiteliales y los ligandos de selectina en las células tumorales (Figura 3). El cambio en la estructura del glucocáliz por procesos inflamatorios puede favorecer la metástasis tumoral mediada por receptores de E-selectina [42].

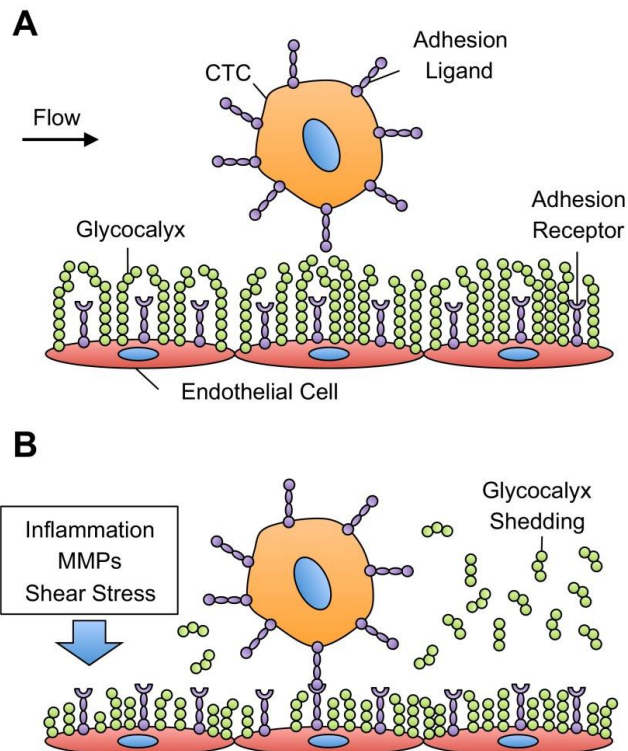


Figura 3. Efecto del glucocálix en la adhesión de células tumorales circulantes. A. Bajo condiciones fisiológicas normales, el grosor del glucocálix es mayor que la longitud de los receptores y actúa como una barrera para la adhesión celular. B. Alteraciones por shear stress, por condiciones inflamatorias y por acción de la matriz metaloproteínase pueden causar el shedding y/o remodelamiento del glucocálix, incrementando el número de receptores disponibles para unir a ligandos de adhesión en las células tumorales circulantes [43].

Todas estas características han hecho del glucocálix un sistema de suma importancia para su estudio. El estudio de las propiedades superficiales así como la ingeniería de superficies, brindan herramientas para el estudio, descripción y control de la superficie celular y/o el diseño de materiales biomiméticos.

Ingeniería de superficies

La ingeniería de superficie es una sub-disciplina de la ciencia de materiales. La ingeniería de superficie incluye una gran variedad de tratamientos y procesos superficiales, dirigidos a la modificación de las propiedades de superficies de los materiales [44]. Entre los diferentes tratamientos cabe citar:

- Acondicionamiento y funcionalización de superficies mediante plasma o iones (metales, cauchos, plásticos, textiles), etc.
- Difusión superficial de especies atómicas y moleculares (mediante tratamiento térmico en atmósfera controlada, aplicación de plasmas, radiación láser o implantación iónica)

- Depósito de recubrimientos y capas delgadas

El estudio de todos estos procesos ha despertado un enorme interés en los últimos años, tanto a nivel académico como industrial, debido sobre todo al continuo crecimiento de las aplicaciones industriales. Entre los sectores industriales más beneficiados están, el sector mecánico y del automóvil, aeronáutico, energético, químico y bioquímico, electrónico y optoelectrónico, etc.

A la modificación de superficies biológicas o el conferir propiedades de superficies biológicas a superficies no biológicas se le conoce como ingeniería de biosuperficies.

Ingeniería de Biosuperficies

Los organismos biológicos son sistemas muy complejos y altamente organizados. Una forma en que la biología logra este alto orden de organización es el uso redes extracelulares controladas espacialmente y temporalmente. Los recientes desarrollos en química de superficie, micro y nanofabricación y biología celular permiten recrear algunas de estas redes organizativas de una manera espacialmente controlada. Con estas herramientas, se pueden crear superficies activas que mimeticen el comportamiento de estas redes extracelulares. Además, estos sistemas de biosuperficies simplificados facilitan la caracterización de las propiedades superficiales del glucocálix.

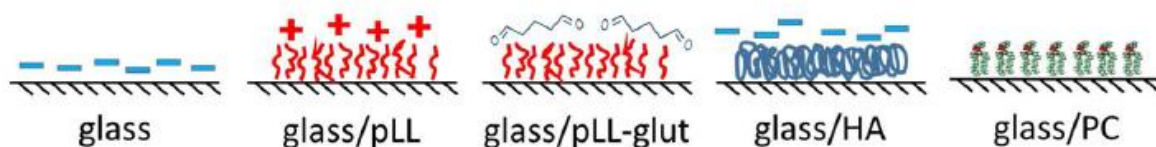


Figura 4. Representación esquemática de las cinco condiciones superficiales caracterizadas en este trabajo.

Una de las razones principales por las que existe un gran interés en el estudio del glucocálix celular es que para una amplia variedad de fenómenos celulares el glucocálix representa una primera barrera con la cual interactuar y/o superar. Varios métodos se han desarrollado para la creación de superficies que mimeticen los patrones y/o propiedades de la superficie celular. Estos pueden ser divididos en dos categorías. Los que son derivados de técnicas litográficas y los que dependen de la segregación física, aunque existen algunos entrecruzamientos entre ambos métodos [45]. Los sistemas basados en fotolitografía típicamente utilizan algún tipo de capa orgánica, desde polímeros hasta monocapas, los cuales son iluminados para crear la funcionalización. La segunda categoría, la segregación física, que implica la colocación de moléculas o células en la superficie [45].

La funcionalización de superficies con células o moléculas biomiméticas del glucocálix permite caracterizar la influencia de los componentes que constituyen al glucocálix sobre

las propiedades de la superficie celular, tales como, heterogeneidad química y física, la energía superficial, el trabajo de sticción.

Se han propuesto varios modelos para el estudio del glucocálix y la adhesión celular mediada por receptores. Estos modelos incluyen típicamente estudios sobre los efectos de la fuerza de interacción receptor-ligando, las densidades del receptor y el ligando, movilidad de receptor/ligando en sus respectivas superficies, etc. y aunque se dispone de modelos para representar propiedades bioquímicas de glucocálix, no está disponible un modelo de propiedades de superficie del glucocálix capaz de predecir y/o determinar cuantitativamente el efecto de las modificaciones en la estructura del mismo y por consiguiente en sus propiedades de superficiales. Sin embargo, este tipo interacciones no específicas entre superficies juegan un papel importante en la interpretación de la adhesión de biopolímeros que forman el glucocálix, así como la difusión de biomoléculas, toxinas y factores de crecimiento. Por esta razón, este trabajo es una propuesta para la caracterización de las propiedades de superficies modificadas químicamente con biopolímeros de interés biológico y presentes en el glucocálix midiendo la difusión de partículas de poliestireno moviéndose en la vecindad de estas superficies. Esta metodología nos permitió caracterizar el efecto de la heterogeneidad topográfica y química sobre la difusividad de las partículas. Además pudimos cuantificar el potencial de interacción entre partícula-pared como consecuencia de las diferentes funcionalizaciones y el efecto que estas tienen en la longitud gravitacional de la partícula.

Objetivos

El objetivo principal de este trabajo fue caracterizar el efecto de la funcionalización con biopolímeros sobre el movimiento browniano de partículas coloidales de 1 μm en una solución de baja fuerza iónica. Lo cual se logró a través de los siguientes objetivos específicos

1. Fabricación de un sistema apropiado que facilitara la captura del movimiento browniano difundiendo lejos y en la vecindad de las superficies.
2. Incorporación del ácido hialurónico y del fosfolípido a las superficies a través de reacciones químicas que permitieron la unión covalente de estos biopolímeros, además la funcionalización con poli-L-lisina y glutaraldehído mediante interacciones electrostáticas.
3. Uso de video-microscopía, software para el procesamiento de imágenes y datos para la reconstrucción y análisis de las trayectorias de las partículas.

Resultados

En el presente trabajo investigamos el efecto de la funcionalización de cubreobjetos con polímeros biomiméticos de interés biológico en el movimiento browniano de partículas de poliestireno (PS). Cinco condiciones de superficie fueron estudiadas: vidrio sin funcionalizar,

vidrio cubierto con poli-L-lisina (PLL), vidrio cubierto con PLL pasivado con glutaraldehído (glut), vidrio cubierto con ácido hialurónico (HA) y vidrio cubierto con una monocapa de fosfolípidos (PC). Se confirmó la funcionalización de las superficies mediante la caracterización topográfica a través de microscopia de fuerza atómica (AFM). Las imágenes de AFM confirman un incremento en la altura del vidrio, principalmente en las funcionalizaciones con ácido hialurónico y PLL (PLL pasivada con glutaraldehído es sumamente similar a PLL sola). Las imágenes de la funcionalización con lípido revelan la formación de una monocapa discontinua. Tanto las topologías como los perfiles de altura de todas las funcionalizaciones revelan heterogeneidades o dominios distribuidos aleatoriamente en la superficie que se formaron durante los procesos de funcionalización.

Posteriormente, las superficies funcionalizadas fueron grabadas por video-microscopia dentro de una celda llena con una solución agua desionizada y una muy baja concentración de partículas de PS. Se observó que para el vidrio sin funcionalizar, y para las funcionalizaciones PLL-glut y HA, las partículas difunden por encima de la superficie sin hacer contacto con ella, lo que denota una interacción repulsiva entre la partícula y la pared. En el caso de la funcionalización con lípido, también se mueve en las vecindades de la superficie pero puede tocar por un breve periodo la superficie y volver a alejarse. En el caso de la funcionalización con PLL la partícula se acerca a la pared como consecuencia del movimiento browniano pero eventualmente es adsorbida de forma irreversible.

Partiendo de los datos experimentales de la difusión de las partículas para las cinco condiciones superficiales, se evaluaron los efectos de las mismas sobre la longitud gravitatoria de la partícula comparando el caso teórico, longitud gravitatoria efectiva de esfera dura $\langle z \rangle_{HS}$, que implica la ausencia de interacciones entre partícula y pared con respecto al valor $\langle z \rangle$ encontrado en nuestros sistemas. Encontramos que para los sistemas con PLL-glut, HA y PC, que el valor medio $\langle z \rangle$ está por debajo del valor del vidrio. La diferencia en esos casos es una combinación de las interacciones directas de las paredes de las partículas y una variación en la masa de la partícula.

Referencias

- [1] R. Langer, Drug delivery and targeting," Nature 392, 5-10 (1998).
- [2] S. Naahidi, M. Jafari, F. Edalat, K. Raymond, A. Khademhosseini, and P. Chen, "Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery," J. Control. Release 166, 182-194 (2013).
- [3] H. Al-Obaidi and A. T. Florence, "Nanoparticle delivery and particle diffusion in confined and complex environments," J. Drug Deliv. Sci. Technol. 30, 266-277 (2015).
- [4] J. Liu, T. Wei, J. Zhao, Y. Huang, H. Deng, A. Kumar, C. Wang, Z. Liang, X. Ma, and X.-J. Liang, "Multifunctional aptamer-based nanoparticles for targeted drug delivery to circumvent cancer resistance," Biomaterials 91, 44-56 (2016).
- [5] D. K. Kirui, D. A. Rey, and C. A. Batt, "Gold hybrid nanoparticles for targeted phototherapy and cancer imaging," Nanotechnology 21, 105105 (2010).

- [6] M. Nurunnabi, Z. Khatun, G. R. Reeck, D. Y. Lee, and Y.-K. Lee, "Photoluminescent graphene nanoparticles for cancer phototherapy and imaging," *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6, 12413-12421 (2014).
- [7] Y. Xia, "Nanomaterials at work in biomedical research," *Nat. Mater.* 7, 758 (2008).
- [8] I. I. Slowing, B. G. Trewyn, S. Giri, and V.-Y. Lin, "Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery and biosensing applications," *Adv. Funct. Mater.* 17, 1225-1236 (2007).
- [9] J. S. Suk, Q. Xu, N. Kim, J. Hanes, and L. M. Ensign, "Pegylation as a strategy for improving nanoparticle based drug and gene delivery," *Adv. Drug Deliv. Rev.* 99, 28-51 (2016).
- [10] G. J. Doherty and H. T. McMahon, "Mechanisms of endocytosis," *Annu. Rev. Biochem.* 78, 857-902 (2009).
- [11] A. Meinel, B. Tränkle, W. Römer, and A. Rohrbach, "Induced phagocytic particle uptake into a giant unilamellar vesicle," *Soft Matter* 10, 3667-3678 (2014).
- [12] J. Agudo-Canalejo and R. Lipowsky, "Critical particle sizes for the engulfment of nanoparticles by membranes and vesicles with bilayer asymmetry," *ACS Nano* 9, 3704-3720 (2015).
- [13] G. G. Stokes, *On the effect of the internal friction of fluids on the motion of pendulums*, Vol. 9 (Pitt Press, 1851).
- [14] H. A. Lorentz, "Ein Allgemeiner Satz, die Bewegung einer reibenden Flüssigkeit betreffend, nebst einigen Anwendungen desselben," *Abh. Theor. Phys.* 1, 23 (1907).
- [15] H. Brenner, "The slow motion of a sphere through a viscous fluid towards a plane surface," *Chem. Eng. Sci.* 16, 242-251 (1961).
- [16] M. E. O'Neill and K. Stewartson, "On the slow motion of a sphere parallel to a nearby plane wall," *J. Fluid Mech.* 27, 705-724 (1967).
- [17] A. J. Goldman, R. G. Cox, and H. Brenner, "Slow viscous motion of a sphere parallel to a plane wall-i motion through a quiescent fluid," *Chem. Eng. Sci.* 22, 637-651 (1967).
- [18] H. Faxen, *Einwirkung der Gefäßswände auf den Widerstand gegen die Bewegung einer kleinen Kugel in einer zähen Flüssigkeit*, Ph.D. thesis, Uppsala University, Uppsala, Sweden (1921).
- [19] J. Happel and H. Brenner, *Low Reynolds number hydrodynamics: with special applications to particulate media*, Vol. 1 (Springer Science & Business Media, 2012).
- [20] A. Meyer, A. Marshall, B. G. Bush, and E. M. Furst, "Laser tweezer microrheology of a colloidal suspension," *J. Rheol.* 50, 77-92 (2006).
- [21] B. Lin, J. Yu, and S. A. Rice, "Direct measurements of constrained Brownian motion of an isolated sphere between two walls," *Phys. Rev. E* 62, 3909-3919 (2000).
- [22] K. D. Kihm, A. Banerjee, C. K. Choi, and T. Takagi, "Near-wall hindered Brownian diffusion of nanoparticles examined by three-dimensional ratiometric total internal reflection fluorescence microscopy (3-d r-tirfm)," *Exp. Fluids* 37, 811-824 (2004).
- [23] B. Cui, H. Diamant, and B. Lin, "Screened hydrodynamic interaction in a narrow channel," *Phys. Rev. Lett.* 89, 188302 (2002).
- [24] T. G. Mason and D. A. Weitz, "Linear viscoelasticity of colloidal hard sphere suspensions near the glass transition," *Phys. Rev. Lett.* 75, 2770 (1995).
- [25] A. Banerjee and K. D. Kihm, "Experimental verification of near-wall hindered diffusion for the brownian motion of nanoparticles using evanescent wave microscopy," *Phys. Rev. E* 72, 042101 (2005).

- [26] Bennett HS. Morphological aspects of extracellular polysaccharides. *Journal of histochemistry & cytochemistry* 1963; 11(1):14-23.
- [27] McKinley, M. & V.D. O'Loughlin. *Human Anatomy*. McGraw-Hill, 2012. 3rd ed. p. 30-31
- [28] Yañez-Soto B, Mannis MJ, Schwab IR, Li JY, et al. Interfacial Phenomena and the Ocular Surface. *The Ocular Surface* 2014; 12(3):178-201.
- [29] Modeling Momentum and Mass Transport in Cellular Biological Media: From the Molecular to the Tissue Scale
- [30] Costerton J, Irvin R, Cheng K. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annual Reviews in Microbiology* 1981; 35(1):299-324.
- [31] Gendler S, Spicer A. Epithelial mucin genes. *Annual review of physiology* 1995; 57(1):607-634.
- [32] Yañez-Soto B, Mannis MJ, Schwab IR, Li JY, et al. Interfacial Phenomena and the Ocular Surface. *The Ocular Surface* 2014; 12(3):178-201.
- [33] Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MA, et al. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 2007; 454(3):345-359.
- [34] Neu B, Meiselman HJ. Depletion-mediated red blood cell aggregation in polymer solutions. *Biophysical journal* 2002; 83(5):2482-2490.
- [35] Schröter S, Osterhoff C, McArdle W, Ivell R. The glycocalyx of the sperm surface. *Human reproduction update* 1999; 5(4):302-313.
- [36] Aplin JD. MUC-1 glycosylation in endometrium: possible roles of the apical glycocalyx at implantation. *Human Reproduction* 1999; 14(suppl 2):17-25.
- [37] Egberts H, Koninkx J, Van Dijk J, Mouwen J. Biological and pathobiological aspects of the glycocalyx of the small intestinal epithelium. A review. *Veterinary Quarterly* 1984; 6(4):186-
- [38] Reitsma S., Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MJ., & Egbrink M. G. A. The endothelial glycocalyx: composition, function and visualization. Springer – Verlag 2007; 454:345-359
- [39] Devuyst O. Glycocalyx: The Fuzzy Coat Now Regulates Cell Signaling. *Peritoneal Dialysis International* 2014; 34(6):574-575.
- [40] van Haaren PM, VanBavel E, Vink H, Spaan JA (2003) Localization of the permeability barrier to solutes in isolated arteries by confocal microscopy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H2848–H2856
- [41] van Haaren PM, VanBavel E, Vink H, Spaan JA (2005) Charge modification of the endothelial surface layer modulates the permeability barrier of isolated rat mesenteric small arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H2503–H2507
- [42] Michael J. Mitchell, Michael R. King *American Journal of Physiology - Cell Physiology* Published 15 January 2014 Vol. 306 no. 2, C89-C97 DOI: 10.1152/ajpcell.00285.2013
- [43] Red de Ingeniería de Superficies y Capas Delgadas (INGESNET). (2017). Ingeniería de Superficies. España. Recuperado de <http://www.ingesnet.org>
- [44] Molnar P. et al (2006). Biosurface engineering. *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation*, Second Edition. Pp 409-416

Movimiento Browniano de partículas coloidales inmersas en una solución con baja fuerza iónica en la vecindad de superficies blandas

Introducción

La interacción de una esfera sólida que se mueve lentamente en relación con una pared por medio de fuerzas hidrodinámicas es uno de los temas principales del libro clásico de Happel y Brenner [1]. Aunque esa teoría hidrodinámica de partículas/paredes se desarrolló originalmente para analizar el movimiento relativo de los objetos macroscópicos, en años posteriores se confirmó que los llamados factores de corrección de resistencia también entran en la componente de Stokes de la ecuación de Stokes-Einstein, que relaciona una propiedad estocástica (difusividad) con una determinística (movilidad) por medio de fuerzas térmicas. [2] Los términos térmicos y de arrastre acoplados en esta ecuación abrieron así la posibilidad de analizar el movimiento browniano de las partículas coloidales pasivas cerca de una pared. [3,4] La concordancia con las fórmulas hidrodinámicas de Faxen o Brenner ha sido confirmada para el caso de las partículas brownianas que abarcan tamaños de 1 a $10\mu\text{m}$ en diámetro y estabilizadas con sal. [3,5-7] Por otra parte, dado que estas fórmulas se obtuvieron exclusivamente para los fluidos newtonianos y considerando una condición de frontera sin deslizamiento en las interfaces sólido/líquido, también se espera que se encuentren desviaciones de la teoría estándar cuando tales premisas no se cumplan completamente. Dejando de lado las fusiones de polímeros o los efectos no newtonianos en general, hay al menos tres efectos que pueden producir una desviación de la teoría hidrodinámica estándar en los fluidos newtonianos, a saber: la existencia de una condición de límite de deslizamiento parcial en las interfaces, caracterizada comúnmente por los efectos electroviscosos de longitud de deslizamiento de Navier b , [8-10], que aparecen en sistemas con baja conductividad y superficies cargadas, [11,12] y problemas de lubricación que consideran la interacción de las partículas porosas (superficies de polímeros injertados). [13] Este último efecto se considera típicamente en la descripción de las partículas cubiertas por cepillos de polímero e interactuando en estrecha proximidad [14] ($O(100\text{ nm})$) y no se tiene en cuenta en este trabajo, ya que las distancias de equilibrio típicas en nuestros sistemas de partículas/paredes están alrededor de $3\mu\text{m}$.

Mientras que los primeros estudios de Brenner consideran la condición de límite de deslizamiento perfecto, $b \rightarrow \infty$, fueron los trabajos de Vinogradova [8], Lauga y Squires [10] los que consideraron una longitud de deslizamiento finita en sus cálculos. Un punto clave en estas formulaciones, específicamente en la proporcionada por Lauga y Squires, es que permiten la estimación de la longitud de deslizamiento rastreando el movimiento difuso de una sonda Browniana cerca de una pared con la ventaja de reducir los efectos de la tasa de cizallamiento en la primera. Una consideración importante en este enfoque es que el tamaño del trazador Browniano debe ser del orden de la longitud del deslizamiento para poder sentir los efectos del segundo. Aunque todavía son pocos, hay reportes que ya han

estimado la longitud del deslizamiento con sondas Brownianas; por ejemplo, Joly et al. [15] midieron la longitud del deslizamiento en superficies no mojables con sondas coloidales nanométricas. La medición de la longitud de deslizamiento en los sistemas de partículas/paredes es un tema relevante porque hasta hoy no existen reglas definidas que permitan explicar la longitud de deslizamiento en términos de las propiedades físico-químicas y la geometría de las interfaces. Por ejemplo, mientras que algunos informes correlacionan el aumento de la longitud de deslizamiento con la reducción de la mojabilidad de la superficie y/o la rugosidad de la superficie, otros trabajos informan exactamente de la tendencia opuesta [9,10].

Los efectos electroviscosos (EVE) [12] se refieren, en general, al aumento de la resistencia aparente de una partícula o paquete de fluidos a moverse debido a la doble capa eléctrica que los rodea. [16 -20] En la literatura podemos distinguir varias afirmaciones del término, dependiendo de si el objeto es una partícula aislada, [16,18,21] una partícula que se mueve en relación con una pared, [11,22-24] o un electrolito que fluye en un canal (flujos impulsados por la presión) [17,25]. Si una partícula cargada rodeada por su doble capa eléctrica se mueve en un líquido inactivo, ocurre una pequeña distorsión de su nube iónica eléctrica en la dirección del movimiento que induce un campo eléctrico microscópico que tiene el efecto de ralentizar el movimiento de la partícula [19]. Un efecto similar ocurre durante el movimiento de una partícula cargada cerca de una superficie (cargada o no): el movimiento relativo induce un transporte de especies cargadas generando un potencial de flujo (debido a la conservación de la carga) y en última instancia retrasando el movimiento de la partícula en movimiento [23]. Los EVE están presentes si al menos una de las dos superficies está cargada eléctricamente y si la conductividad del medio es baja (condiciones de baja fuerza iónica) [24]. Experimentalmente, la presencia de EVE ha generado resultados intrigantes y a veces confusos en configuraciones aparentemente simples [12]. Una de las primeras observaciones de EVE en suspensiones coloidales confinadas fue la reportada por Feitosa y Mesquita [26], que mostró que el coeficiente de difusión paralela era menor que el predicho por la teoría hidrodinámica. En su discusión argumentaron que "no podemos descartar la posibilidad de una fricción adicional debido a las interacciones eléctricas entre las partículas, el electrolito y la superficie del vidrio". A lo largo de los años se siguieron observando difusión restringida debido a la fricción iónica o EVE en suspensiones coloidales confinadas en condiciones de baja fuerza iónica [12,27]. Además, se ha observado fricción iónica en partículas cargadas sin límites, lo que ha dado lugar a coeficientes de difusión tan bajos como el 50% de los valores esperados [28]. Una excepción a la regla fueron los experimentos reportados por Faucheux et al, [29] quienes observaron un concordancia con la teoría hidrodinámica aunque su sistema consistía en la misma configuración confinada sin sal agregada. Aunque todas estas observaciones son más o menos coherentes con los mecanismos fundamentales de EVE, en general no se ha obtenido un acuerdo cuantitativo entre los experimentos y la teoría, en parte porque la teoría se basa en expansiones asintóticas de las variables espaciales relevantes [22,30] y en parte porque los experimentos

no suelen mostrar el aumento del factor de arrastre en función de la distancia de separación de la partícula/pared. Uno de nuestros objetivos en este trabajo es contribuir al análisis de los componentes del coeficiente de difusión en función de la distancia de separación entre las partículas y las paredes en los sistemas que promueven los EVE.

Los sistemas de partículas/paredes que elegimos para estudiar consistían en una suspensión muy diluida de partículas de poliestireno de 1µm suspendidas en agua pura (condiciones de baja fuerza iónica) e interactuando con diferentes funcionalizaciones de la superficie. Las interacciones de pares incluían partículas que se difundían por encima del vidrio desnudo, vidrio cubierto con un polielectrolito cargado negativamente (hialuronato), vidrio cubierto con un polielectrolito pasivado (poli-L-lisina + glutaraldehído) y vidrio cubierto con una monocapa lipídica. El polielectrolito o el lípido mono/bi o multicapa se han utilizado como modelos de superficie para estudiar las interacciones de las superficies cargadas o casi neutras que se asemejan a las membranas biofísicas [14, 31, 32]. Recientemente, Everett y Bevan [32] estudiaron la interacción de las sondas Brownianas en las bicapas lipídicas soportadas en condiciones fisiológicas. En ese trabajo los autores informaron sobre los potenciales de interacción entre las diferentes configuraciones de revestimiento lipídico utilizando la TIRM (Microscopía de Reflexión Interna Total), aunque no se informó sobre los perfiles de difusividad. En este trabajo informamos sobre los componentes del coeficiente de difusión de las partículas que se difunden por encima de una monocapa lipídica.

Teoría

Teoría hidrodinámica. Los factores de corrección de arrastre, $K(z)$, generados por una partícula esférica que se mueve en relación a una pared y que tiene una condición de límite antideslizante, aparecen en la relación de Stokes modificada [1].

$$F_{\parallel,\perp} = \gamma_{\parallel,\perp} U = 6\pi\mu a K_{\parallel,\perp}(z) U, \quad (1)$$

donde F es la fuerza necesaria para mover una partícula de radio a a una velocidad constante U dada la resistencia $\gamma_{\parallel,\perp}$. Aquí μ es la viscosidad del disolvente, z la distancia entre la pared y el centro de la partícula (en lo que sigue $h = z - a$ se define como la distancia de separación de pared a pared) $\gamma_{\parallel,\perp}$ denota los componentes paralelos o perpendiculares, respectivamente.

La resistencia hidrodinámica de la partícula/pared también aparece en la relación Stokes-Einstein para una partícula coloidal que se difunde cerca de una pared:

$$D_{\parallel,\perp} = \frac{k_B T}{\gamma_{\parallel,\perp}} = \frac{k_B T}{6\pi\mu a} K_{\parallel,\perp}^{-1}(z) = D_o K_{\parallel,\perp}^{-1}(z), \quad (2)$$

donde D_o es el coeficiente de autodifusión sin límites. Para el movimiento paralelo, $K_{\parallel}^{-1}(z)$ viene dado por la corrección de Faxén [1]:

$$K_{\parallel}^{-1}(z) = 1 - \frac{9}{16} \left(\frac{a}{z}\right) + \frac{1}{8} \left(\frac{a}{z}\right)^3 - \frac{45}{256} \left(\frac{a}{z}\right)^4 - \frac{1}{16} \left(\frac{a}{z}\right)^5, \quad (3)$$

Para el movimiento perpendicular, $K_{\perp}^{-1}(z)$ viene dado por la fórmula de suma infinita de Brenner. Alternativamente, usaremos la fórmula de interpolación de Schäffer a la serie de Brenner, [33] dada por:

$$K_{\perp}^{-1}(z) = 1 - \frac{9}{8} \left(\frac{a}{z}\right) + \frac{1}{2} \left(\frac{a}{z}\right)^3 - \frac{57}{100} \left(\frac{a}{z}\right)^4 + \frac{1}{5} \left(\frac{a}{z}\right)^5 + \frac{7}{200} \left(\frac{a}{z}\right)^{11} - \frac{1}{25} \left(\frac{a}{z}\right)^{12}, \quad (4)$$

exacto al 0,1% de la fórmula de Brenner para $a/z \geq 1.1$.

El problema de una esfera que se mueve en relación con una pared y que tiene una condición de límite de deslizamiento parcial caracterizada por una longitud de deslizamiento b fue resuelto por Lauga y Squires [10] en el límite $z \gg a$, es decir, para las partículas que se mueven "lejos" de la pared (aunque se espera que la teoría funcione para distancias tan cortas como $z \approx 3a$). En el límite adicional donde $b \ll z$, los factores de corrección correspondientes pueden expresarse como:

$$K_{\parallel}^{-1}(z) = 1 - \frac{9}{16} \left(\frac{a}{z}\right) \left[1 - \frac{b}{z}\right], \quad (5)$$

$$K_{\perp}^{-1}(z) = 1 - \frac{9}{8} \left(\frac{a}{z}\right) \left[1 - \frac{b}{z}\right], \quad (6)$$

Obsérvese que para las longitudes de deslizamiento cero, los factores de corrección recuperan la forma de los dos primeros términos en los polinomios de Faxen y Schäffer.

Efectos electroviscosos en partículas que se mueven cerca de una pared. La descripción teórica de los efectos electroviscosos es difícil porque requiere la solución de al menos tres ecuaciones acopladas: [22] las ecuaciones de Stokes con el término de fuerza eléctrica, la ecuación de convección-difusión-migración [20] de las especies cargadas para tener en cuenta la conservación de los electrolitos (o la conservación de la carga) y la ecuación de Poisson. Por este motivo, la estrategia tradicional para abordar teóricamente este problema incluía dos caminos: estudiar la fricción electrolítica de una sola partícula esférica cargada inmersa en una solución electrolítica sin límites [16], o estudiar la fricción electrolítica de una esfera que se mueve en relación con una pared, pero considerando el límite de lubricación junto con la aproximación de la doble capa eléctrica fina [11,24]. Sólo recientemente se han desarrollado algunas expresiones semi-analíticas y enfoques numéricos para distancias arbitrarias de separación de partículas/pared, aunque la aproximación de doble capa fina todavía se utiliza en tales formulaciones [24]. Veremos que dicha versión simplificada es tan buena como las teorías más elaboradas o completas (pero formalmente limitadas al límite de lubricación) para ajustar los datos experimentales. Nuestra primera simplificación consiste en descartar cualquier efecto de los términos de curvatura o gradiente de presión de la partícula. De esta manera, simplemente analizaremos el flujo de Couette entre dos superficies, una de ellas con un potencial de superficie $\psi = \zeta$. Como se muestra en la figura 1, fijaremos el origen de las coordenadas a

esta superficie (S1) con velocidad cero, $u = 0$. Dado que los EVE aparecen si sólo una de las dos superficies está cargada eléctricamente [24], para simplificar, estableceremos $\psi = 0$ en la superficie móvil S2 que tiene una velocidad $u = \sigma h / \mu$, donde σ es el esfuerzo cortante necesario para mover la pared a la velocidad U . La tercera simplificación consiste en asumir que la doble capa eléctrica formada sobre S1 es mucho más pequeña que la distancia de separación entre las paredes (aproximación de doble capa fina). 11 Esta es una simplificación clave porque nos permite desacoplar las ecuaciones de Stokes: mientras que el flujo de cizallamiento produce un transporte horizontal de especies cargadas como se muestra en la figura 1 (dirección z), se supone que la doble capa eléctrica es tan delgada que su perfil x no se ve perturbado y se considera que en equilibrio en ausencia de flujo.

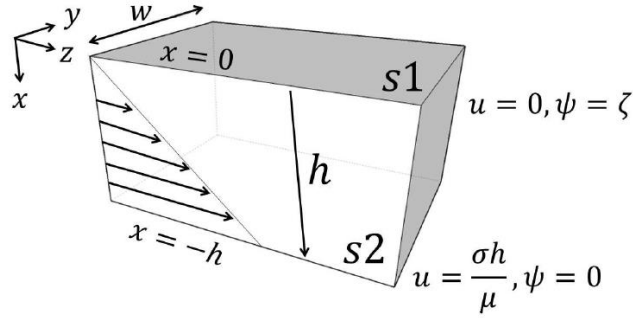


Figura 1: Sistema de coordenadas y condiciones de límite utilizadas para resolver el arrastre electroviscoso entre dos superficies separadas por una solución electrolítica. La superficie S2 se mueve en relación con S1 en la dirección z , produciendo un gradiente de velocidad en la dirección x . Se considera que el espesor de la doble capa eléctrica formada sobre la superficie cargada S1 es mucho menor que la distancia de separación entre las paredes, h .

El componente z de las ecuaciones de Stokes, $E\rho + \mu \nabla^2 u = 0$, después de usar la ecuación de Poisson $\rho = -\epsilon \nabla^2 \psi$:

$$\epsilon E_z \frac{\partial^2 \psi}{\partial x^2} + \mu \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} = 0, \quad (7)$$

donde E_z es el campo eléctrico aún desconocido en la dirección z , ρ la densidad de carga de equilibrio y ϵ la permitividad eléctrica del medio. Resolviendo esta ecuación y aplicando las condiciones límite descritas en la figura 1 se obtiene:

$$u(x) = \frac{\epsilon E_z}{\mu} (\psi - \zeta) - \left(\frac{\sigma}{\mu} - \frac{\epsilon E_z \zeta}{\mu h} \right) x \quad (8)$$

Entonces podemos calcular la velocidad media en la dirección x , $\langle u \rangle = -\left(1/h\right) \int_0^{-h} f(x) dx$, obteniendo:

$$\langle u \rangle = \frac{\sigma h}{2\mu} \left[1 - \frac{\epsilon E_z \zeta}{h\sigma} \right], \quad (9)$$

donde hemos asumido que el promedio del potencial eléctrico a través del espesor de h es cero, de acuerdo con la aproximación de la doble capa delgada [17]. La ecuación 9 puede ser reordenada en la forma de una relación constitutiva:

$$\frac{\sigma}{2\langle u \rangle/h} = \mu_{app} = \mu \left[1 - \frac{\epsilon \zeta E_z}{h \sigma} \right]^{-1}, \quad (10)$$

donde el lado izquierdo representa la relación entre el esfuerzo de corte y la velocidad y el lado derecho una viscosidad aparente que depende de la distancia h . Para deducir E_z escribimos la ecuación de conservación de la carga como [20, 22]:

$$I = \int_A (\rho n \cdot u + E_z \lambda) dA = 0, \quad (11)$$

donde I es el flujo neto de carga y λ la conductividad del bulto. Nuestra cuarta simplificación ha hecho omitiendo los términos difusos de las especies iónicas en la ecuación de conservación 11. Forzando nuevamente la aproximación de doble capa fina, el perfil de velocidad en la ecuación 11 se establece en $u = -\sigma x/\mu$ como si no hubiera ninguna perturbación del flujo inducido por el campo eléctrico E_z (omitendo la retroalimentación electroosmótica). Utilizando de nuevo la ecuación de Poisson e integrando en una superficie $[-h, 0] \times [0, w]$, la ecuación 11 produce (Este resultado no es invariable y en general se debería imponer una condición para $\partial\psi/\partial x$ en las paredes cargadas):

$$-\frac{\sigma \epsilon \zeta}{\mu} + E_z \lambda h = 0, \quad (12)$$

De la ecuación 12 obtenemos la proporción $E_z/\sigma = (\epsilon \zeta / \lambda \mu h)$, que a su vez puede ser insertada en la ecuación 10 para finalmente obtener:

$$\frac{\mu_{app}}{\mu} = \left[1 - \frac{(\epsilon \zeta)^2}{\lambda \mu h^2} \right]^{-1}, \quad (13)$$

Esta ecuación es similar a la relación electroviscosa primaria que se encuentra en los flujos impulsados por la presión [17, 34] y predice un aumento de la viscosidad aparente cuando una pared cargada se mueve en relación con otra. Como se ha mencionado anteriormente, en varios estudios teóricos se ha realizado un análisis más elaborado de la resistencia electroviscosa teniendo en cuenta, entre otros, los términos de curvatura y gradiente de presión, la difusividad de las especies iónicas en la solución electrolítica, un potencial no nulo en ambas paredes y la retroalimentación electroosmótica [11, 23-25]. Tabatabaei et al [23] resolvieron, por ejemplo, la fuerza electroviscosa de una esfera cargada que se mueve paralelamente a una pared cargada usando ambas, las aproximaciones de la doble capa delgada y la lubricación. Para obtener la correspondiente proporción μ_{app}/μ utilizando la expresión de Tabatabaei, añadimos el arrastre de Stokes, ecuación 1, a su término de fuerza electroviscosa. Su ecuación entonces dice:

$$\frac{\mu_{app}}{\mu} = 1 + \frac{4}{15} \frac{K_{||}^{-1}(z)\epsilon^2}{\lambda_1 \mu h^2} \left(\frac{k_B T}{e}\right)^2 f(\zeta_p, \zeta_w, S), \quad (14)$$

donde hemos considerado que $K_{||}^{-1}(z \approx a) = 0.32\lambda_1$ es la conductividad de la contraión, e la carga elemental, $f(\zeta_p, \zeta_w, S)$ una función de la partícula correspondiente y al potencial ζ de la pared, previamente reportados [24], y $S = D_1/D_2$ la relación de difusividad de las contraiones (1) y los coiones (2), respectivamente. Como la ecuación original se expresó en términos del coeficiente de difusión de las especies iónicas, utilizamos la definición de la conductividad [20]:

$$\lambda = \frac{e^2}{k_B T} \sum_i z_i^2 D_i n_i = \frac{2e^2 D n_\infty}{k_B T}, \quad (15)$$

para convertir D en valores de conductividad. Aquí n_∞ es la densidad de partículas de la especie iónica i — th . Para un electrolito monovalente simétrico ($z_1 = z_2 = 1$), λ toma el valor de la segunda igualdad.

En el caso de una esfera que se mueve perpendicularmente a una pared, Bike y Prieve [11] propusieron una solución teórica para el arrastre electroviscoso. La correspondiente μ_{app}/μ puede escribirse como:

$$\frac{\mu_{app}}{\mu} = 1 + \frac{3(\bar{\epsilon}\bar{\zeta})^2}{\lambda \mu h^2}, \quad (16)$$

después de utilizar la ecuación 15 y $D = k_B T / 4\pi\mu a_i$ para convertir su radio iónico a_i a $\bar{\lambda}$ ($\bar{\zeta}$ y $\bar{\lambda}$ en la ecuación 16 se consideran los valores aritméticos medios de ambos potenciales de la superficie y entre las conductividades de los contraiones y coiones, respectivamente, aunque los autores realmente consideraron la media armónica para λ).

En la sección de resultados ajustamos las ecuaciones 13, 14 y 16 a los datos experimentales únicamente con la conductividad λ . En todos los casos los valores ajustados de la conductividad pueden compararse con los calculados a partir de mediciones estáticas independientes utilizando una fórmula alternativa para la conductividad:

$$\lambda = \frac{2\Lambda n_\infty}{1000 N_A}, \quad (17)$$

y relacionando n_∞ con la longitud de Debye-Hückel

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\frac{\epsilon k_B T}{2e^2 n_\infty}}, \quad (18)$$

encontradas a partir de las curvas de potencial de interacción. En la ecuación 17 Λ es el valor simple o promedio de la conductividad molar de la especie iónica, reportada previamente reportada [35], y N_A el número de Avogadro. Por último, nótese que la ecuación 13 puede expresarse alternativamente, después de utilizar las ecuaciones 15 y 18, como

$\frac{\mu_{app}}{\mu} \sim [1 - 0.1(\kappa^{-1}/h)^2]^{-1}$ para los potenciales de superficie adimensional $\hat{\zeta} = \frac{\zeta e}{k_B T} = \mathcal{O}(1)$ y las relaciones del radio del ion con respecto a la longitud de Bjerrum ($e^2/4\pi\epsilon k_B T$) de orden $\mathcal{O}(0.1)$ en agua.

Materiales y métodos

Se utilizaron partículas fluorescentes de ThermoScientific de 1 μm (orange fluorescent polystyrene particles, FluoSpheres F13082) dispersas en agua pura en una fracción final de volumen de 1.7×10^{-7} con la finalidad de asegurar la presencia de únicamente una partícula en el campo visible. El valor de conductividad del agua reportado por el sistema de purificación Barnstead fue de 7,4 $\mu\text{S/m}$. Según las especificaciones del proveedor, las partículas tienen una densidad de grupos carboxílicos en su superficie, lo que les confiere una carga negativa a pH 7. Para verificar la homogeneidad de carga de las partículas realizamos un ensayo de titulación de la suspensión con agua destilada utilizando NaOH/HCl. Las curvas del pH frente al volumen de HCl revelaron dos mesetas (Figura 2): una a pH=2.3 y otra a pH=10.7. Por lo tanto, confirmamos la existencia de un grupo cargado negativamente que se protona a valores de pH muy bajos (2.3). Sin embargo, hay un segundo grupo funcional con un pka muy alto (10.7), lo que sugiere la existencia de un grupo con carga positiva a pH=7 y, por lo tanto, implica que las esferas no tienen grupos igualmente cargados en la superficie, aunque a pH=7,0 puedan adquirir una carga neta negativa.

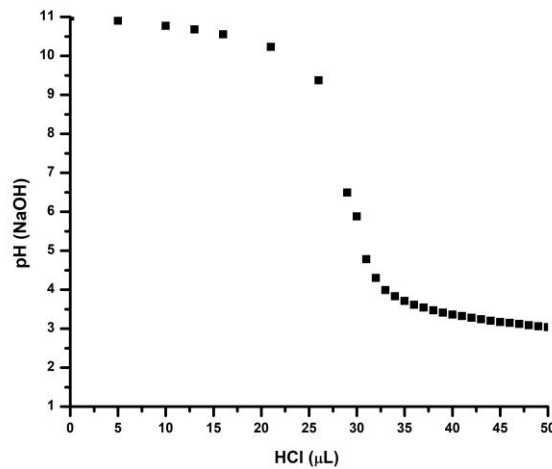


Figura 2. Curva de titulación de pH de solución de partículas usadas en los ensayos.

La suspensión de partículas se colocó en portaobjetos de microscopio previamente funcionalizados con diferentes moléculas. Todas las funcionalizaciones fueron hechas en cubreobjetos de vidrio lavados en una solución 2:1 de ácido sulfúrico/ peróxido de hidrogeno por 15 min, enjuagados con agua desionizada, secados a 35 °C y limpiados en plasma por 1 min. El ácido hialurónico (Sigma Aldrich, MW: $7.5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$) fue unido a la

vidrio covalentemente a grupos aminosilanos [(3-aminopropyl) triethoxysilane, Sigma Aldrich] siguiendo una reacción química EDC/NHS (Figura 3). Después de exponer las superficies al plasma cleaner, las superficies fueron incubadas en vacío por una hora y después incubadas toda la noche en horno a 60 °C. Después de depositó sobre la superficie una solución de EDC (7.6 mg/mL), NHS (2.3 mg/mL) y HA (0.1 mg/mL) y de nuevo incubada toda la noche. Finalmente se retira el exceso de solución con buffer de fosfatos. El fosfolípido (aPC) se unió covalentemente a través de una reacción entre grupos silanos y un grupo acrilato presente en una de las cadenas policarbonadas del lípido. El fosfolípido modificado, DPPC [1-palmitoyl-2-[16-(acryloyloxy)palmitoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine] de Avanti Polar Lipids se disolvió en agua a una concentración final de 5.7×10^{15} moléculas/mL. La superficie fue tratada con grupos silanos [(3-Mercaptopropyl) trimethoxy silne, Sigma Aldrich] por una hora en vacío y posteriormente incubada toda la noche a 60 °C (Figura 4). Finalmente se depositaron sobre la superficie 500 μ L de una solución de aPC y se incubo por 1 hr.

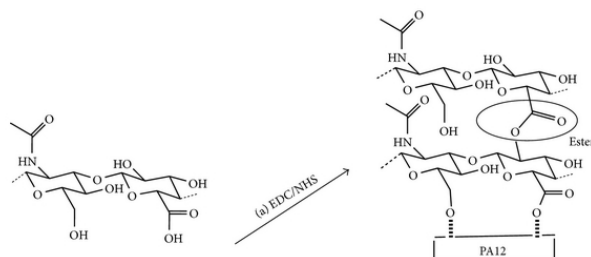


Figura 3. Esquema de reacción para el recubrimiento de la superficie con HA.

La reconstrucción de las trayectorias 3D completas de las partículas en se hizo analizando los patrones de difracción de las partículas (discos Airy o función de dispersión puntual) junto con el uso de técnicas estándar de vídeo-microscopía [37]. Cuando una partícula se desenfoca debido a un desplazamiento z (perpendicular al plano focal), el correspondiente patrón Airy del objeto esférico muestra un aumento de los radios de los anillos concéntricos [6, 3]. Así pues, la distancia de la partícula al plano focal puede correlacionarse (función polinómica) con el radio máximo del anillo concéntrico del patrón de difracción. Esta asociación uno a uno (el plano focal se coloca típicamente en $\sim 50\mu\text{m}$ por encima de la pared inferior de manera que las partículas siempre se mueven por debajo de este plano) se establece (Figura 5) en un procedimiento de calibración previo [6]. La adquisición de la imagen se llevó a cabo en un microscopio Olympus con una platine motorizada en z (100nm de resolución) usando el paquete FluoView. Los patrones de difracción observados en el campo oscuro fueron generados por la emisión de fluorescencia de las propias partículas. Una vez que se conoce la distancia z_{rel} entre las partículas y el plano focal para cada cuadro (velocidades de registro de 24Hz), la distancia z_{abs} de la partícula/pared se calcula utilizando la relación $z_{abs} = z_{cell} - (z_{rel} + z_{focal})$, donde z_{cell} es el ancho total de la celda de observación y z_{focal} la distancia a la que se sitúa el plano focal en relación con el

origen $z_0 = 0$. Esta posición de z_0 se establece en el "techo" de la celda de observación (el cubreobjetos), que se identifica marcando el vidrio con partículas fluorescentes verdes de $0,203\mu\text{m}$ de diámetro. El "suelo" también se marca con estas partículas fluorescentes para obtener el ancho total de la celda, z_{cell} .

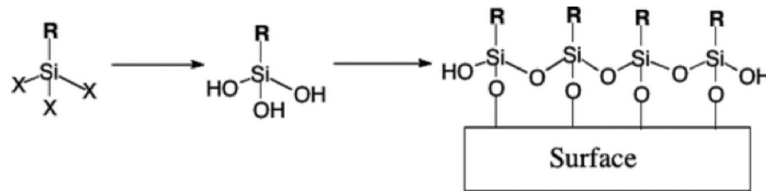


Figura 4. Esquema de la funcionalización con grupos silanos para la fijación covalente de la fosfatidilcolina.

Los desplazamientos en el plano xy (focal) se calcularon utilizando técnicas estándar de video-microscopía basadas en algoritmos de procesamiento de imágenes de búsqueda de centros [37]. Con las trayectorias tridimensionales se calcularon los perfiles de interacción potencial entre las partículas y la pared y los componentes del coeficiente de difusión D_x , D_y y D_z , en función de la distancia entre las partículas y la pared z . Los potenciales de interacción se calcularon usando la inversión de Boltzmann, $(\phi(z) - \phi_0)/k_B T = \ln[p(z_{max})/p(z)]$, donde $p(z)$ y $\phi(z)$ denotan la distribución de probabilidad y el potencial de interacción, respectivamente, mientras que $p(z_{max})$ es tomada en la posición z de la máxima probabilidad. Los coeficientes de difusión se calcularon utilizando la relación $MSD = \langle (r_2(\Delta t) - r_z(0))^2 \rangle = 2D_r(z)\Delta t$, con $r = (x, y, z)$. El subíndice "z" del Desplazamiento Cuadrático Medio denota la dependencia de cada componente de desplazamiento con respecto a la altura z : a cualquier distancia z_i , el componente de difusión correspondiente se calcula tomando la pendiente $MSD/2t$ utilizando z_i como posición de partida. Para fines estadísticos, los valores de z_i se clasifican en compartimentos discretos que tienen un tamaño típico de $a/2$, mientras que t se tomó como $t = \frac{6}{24\text{Hz}} = 0.25\text{s}$.

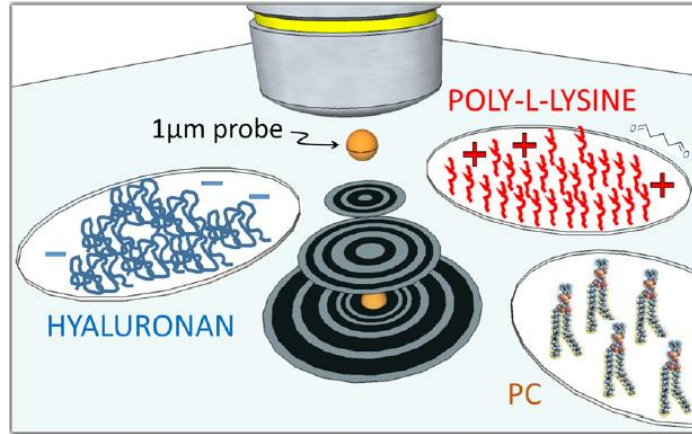


Figura 5. Diagrama del sistema de grabación. El plano focal se coloca típicamente en $\sim 50\mu\text{m}$ por encima de la pared inferior de manera que las partículas siempre se mueven por debajo de este plano

Resultados y discusión

Los potenciales de interacción normalizados, $(\phi(z) - \phi_0)/k_B T$, en función de la distancia partícula/ pared en z se muestran en la figura 6 para todos los sistemas estudiados en este informe. La principal motivación para complementar las gráficas de difusividad, que se muestran a continuación, con sus correspondientes potenciales de interacción, fue comparar los valores de conductividad dados por ambas medidas, dinámica y estática, utilizando las ecuaciones 13 o 17. Las curvas se presentan sin la contribución gravitatoria [39] y se desplazan $1k_B T$ entre sí como ayuda visual. En casi todos los casos las curvas experimentales están bien ajustadas por la fórmula genérica de las interacciones electrostáticas $(\phi(z) - \phi_0)/k_B T = (Z_1/k_B T) \exp(-\kappa z)$, donde κ^{-1} es la longitud del Debye-Hückel y Z_1 el parámetro asociado a los potenciales efectivos de la superficie. [40] Los valores correspondientes también se muestran en la Tabla 1.

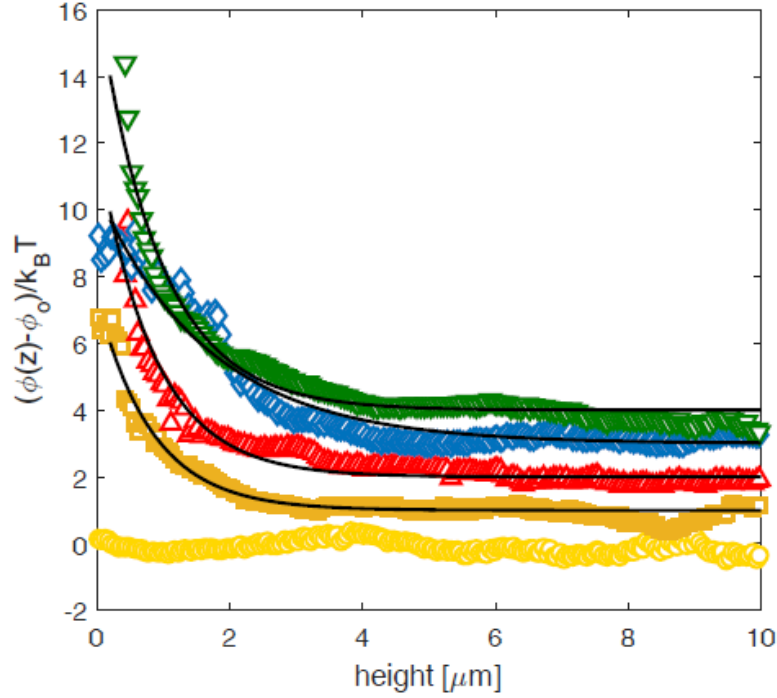


Figura 6: Potenciales de interacción en función de la altura z sin la contribución gravitatoria. Grupo de lípidos A (círculos), grupo de lípidos B (cuadrados), poli-L-lisina/glutaraldehído (pLLglut, triángulos), vidrio desnudo (diamantes), hialuronato (HA, triángulo invertido). Las curvas se desplazan $1 k_B T$ como ayuda visual. Las líneas negras se ajustan a la función $(\phi(z) - \phi_0)/k_B T = (Z_1/k_B T) \exp(-\kappa z)$.

Como era de esperar, el mayor valor de κ^{-1} corresponde al sistema de partículas/vidrio, asociado con el menor valor de fuerza iónica, n_∞ , seguido de los recubrimientos de polielectrolitos. La disminución de κ^{-1} en estos casos puede atribuirse al aumento de las especies iónicas liberadas por las funcionalizaciones de la superficie (Na^+ para el caso del revestimiento de hialuronato, por ejemplo). Es importante decir que, dadas las fracciones de bajo volumen empleadas en nuestros experimentos ($\sim 10^{-7}$), las curvas de potencial de partículas/paredes están libres de comportamientos colectivos o correlaciones partícula/partícula. Obtener la interacción de potenciales nos permitió notar una característica relevante en el sistema de lípidos/pared. En este los histogramas de altura no mostraron un máximo único en las posiciones z como se observó en los otros sistemas, revelando la existencia de sub-ensambles o grupos de partículas cuyo comportamiento difiere de cada uno de ellos a pesar de proceder del mismo lote de preparación (los potenciales de interacción se obtuvieron en todos los casos promediando las trayectorias de diferentes partículas, alrededor de 40, a diferentes lugares). Así pues, reconocimos dos comportamientos distintos en este sistema, denotados por las correspondientes curvas de potencial incluidas en la figura 6: una primera (grupo A) en la que el potencial electrostático está completamente ausente, y otra (grupo B) en la que los efectos de repulsión electrostática se ven claramente. A continuación veremos que estos distintos comportamientos tienen relación con las correspondientes curvas de difusividad. Otros estudios han encontrado también comportamientos

distintos de las partículas a pesar de que provienen del mismo lote de preparación. [14, 41, 42] El origen de estas variaciones se ha atribuido a la presencia de heterogeneidades geométricas, multivalencia o polidispersidad a escala molecular o coloidal [41] y no necesariamente se correlacionan con los valores de potenciales ζ de las partículas. [14] Por ejemplo, Swavola *et. al.* [14] informaron de toda una familia de curvas de potencial de interacción en coloides recubiertos con polielectrolitos e interactuando con superficies recubiertas con moco bovino. En otro informe, Wang *et. al.* [42] distinguieron tres grupos de partículas al estudiar la interacción de los coloides recubiertos de proteínas con cepillos de polímeros: un grupo de libre difusión que tenía una fuerte interacción de repulsión con la pared, un segundo grupo caracterizado por mostrar repulsión más una débil atracción con la pared, y un tercer grupo que estaban irreversiblemente depositados en la superficie. Esta distinción encontrada en nuestro sistema de partículas/lípidos se conservó informando así los valores de difusividad de forma independiente.

Tabla 1: Parámetros electrostáticos y electrocinéticos de los sistemas de partículas/paredes. $Z_1/k_B T$ y κ^{-1} fueron encontrados ajustando los perfiles de interacción potencial, representados en la figura 6, con el modelo de repulsión electrostática; D_∞ significa coeficiente de difusión de "larga distancia", mientras que D_o es el coeficiente de autodifusión e igual a $0,425\mu\text{m}^2/\text{s}$. Las conductividades λ se ajustaron a partir de la viscosidad aparente con la ecuación 13, mientras que el " λ estático" se calculó con las ecuaciones 17 y 18 considerando únicamente la conductividad molar de H^+ o Na^+ como opciones de contraión, así como el cálculo del promedio incluyendo el valor del coión OH^- (valores entre paréntesis).

	$Z_1/k_B T$	$\kappa^{-1} [\mu\text{m}]$	κa	$D_{\parallel\infty}/D_o$	$D_{\perp\infty}/D_o$	$\lambda [\mu\text{S}/\text{m}]$	static λ	
							$[\text{H}^+]$	$[\text{Na}^+]$
glass	7.56	1.69	0.3	0.75	0.75	0.3	1.1(1.7)	0.16(0.8)
HA	12.4	0.94	0.54	0.91	0.8	2	3.6(5.73)	0.5(2.6)
pLL/glut	10.06	0.85	0.6	0.8	0.67	—	—	—
lipid A	—	—	—	0.98	0.98	—	—	—
lipid B	6.4	0.83	0.61	0.9	0.85	1.65	4.7(7.35)	0.6(3.3)

Perfiles de difusividad. La figura 7 muestra los componentes de los coeficientes de difusión, D_x , D_y y D_z , en función de la distancia z y normalizada con el valor de Stokes-Einstein al tamaño de partícula correspondiente ($D_o = 0,425\mu\text{m}^2/\text{s}$). Los gráficos también incluyen los factores de corrección de Faxen y Schäffer, ecuaciones 3 y 4, para las componentes paralelas y perpendiculares (líneas negras, siendo $D_{\parallel} > D_{\perp}$). Podemos ver que los valores experimentales de difusividad, con la excepción de los datos de la partícula/lípidos grupo A, no sólo caen por debajo de las predicciones teóricas a distancias cercanas a la pared, sino que también parecen alcanzar una meseta a grandes distancias por debajo de lo que debería ser el coeficiente de autodifusión D_o . Estos resultados contrastan con estudios anteriores realizados por nuestro grupo [6] utilizando la misma técnica de microscopía de vídeo y partículas de $1\mu\text{m}$ diluidas en una solución de NaCl 10mM: en ese caso los valores

experimentales $D_r(z)$ siguieron las curvas teóricas hidrodinámicas estándar. Los perfiles de difusividad que se muestran en la figura 7 constituyen el principal resultado de nuestro estudio y en el resto del trabajo discutiremos su comportamiento de la siguiente manera: primero discutiremos los valores de difusividad encontrados en la partícula/grupo de lípidos A, luego analizaremos los bajos valores de difusividad encontrados en los sistemas de partículas/vidrio, partículas/polielelectrolitos y partículas/grupos de lípidos B a largas y cortas distancias de la pared. Por último, centramos nuestra atención en la forma atípica de los valores de $D_z(z)$ que se encuentran en el sistema de partículas/hialuronato a distancias cortas partícula/pared (un aumento inesperado de sus valores, como se muestra en la figura 7b, $\square$ símbolos).

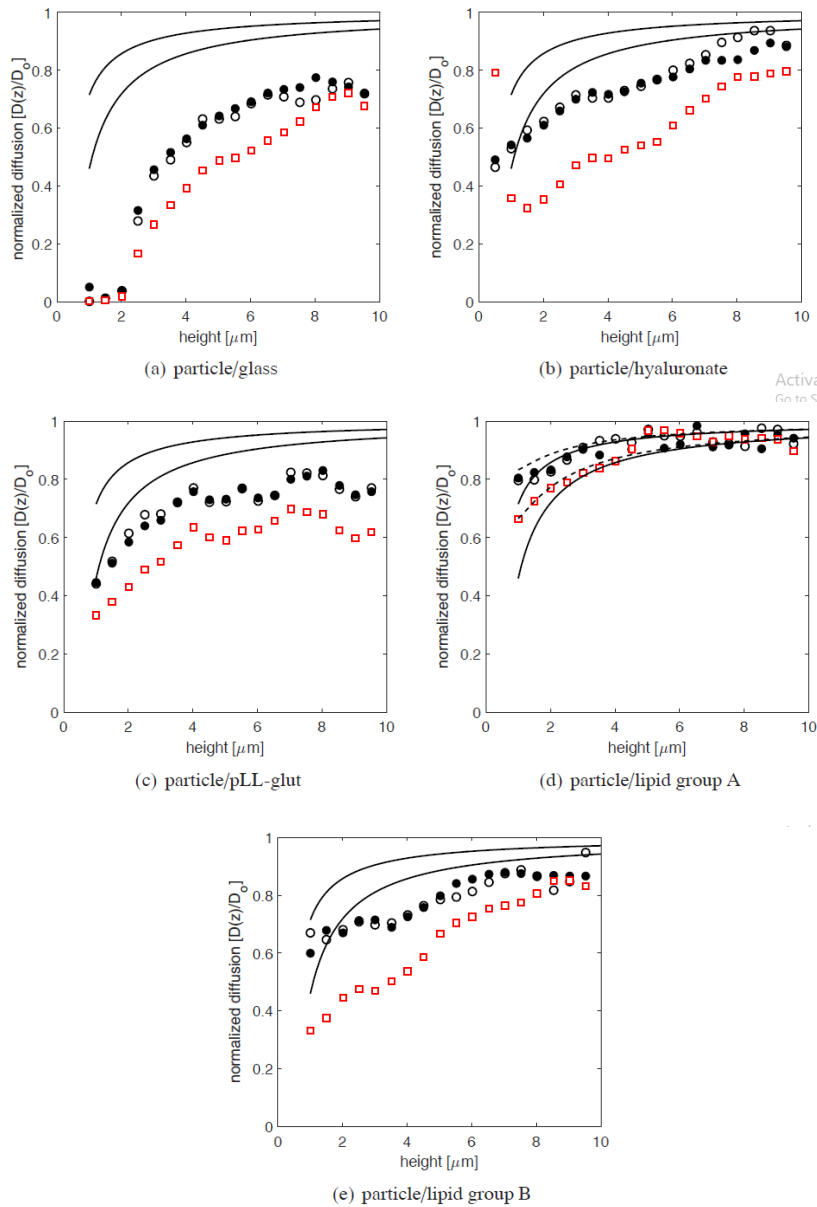


Figura 7: Coeficientes de difusión normalizados D_x ($\circ$), D_y ($\bullet$) y D_z ($\square$)

Longitud de deslizamiento parcial en el sistema de lípidos/partículas. Los valores de difusividad del sistema de partículas/lípidos del grupo A fueron los que mostraron una mayor coincidencia con la teoría hidrodinámica. Sin embargo, podemos observar que los valores cercanos a la pared muestran un valor ligeramente superior al predicho por la teoría, lo que sugiere la presencia de una longitud de deslizamiento no nula en las interfaces. El mejor ajuste a los factores de corrección de Lauga y Squires, ecuaciones 5 y 6, produce una longitud de deslizamiento $b = 418\text{nm}$ (líneas discontinuas en la figura 7d). Aunque no pudimos encontrar otro informe con el que comparar este valor de longitud, hay algunos estudios en el campo de la tribología que han informado de coeficientes de fricción muy bajos entre superficies cubiertas con el mismo grupo funcional fosforilcolina) como el contenido en el lípido DPPC [43, 44] (una conexión entre la longitud de deslizamiento y el coeficiente de fricción puede encontrarse en la referencia 45). Los coeficientes de fricción reportados por Kobayashi y Takahara [43], por ejemplo, fueron tan bajos ($\sim 0,02$) como los encontrados entre superficies hielo/hielo o teflón/teflón, y prevalecen incluso cuando las superficies se deslizaron sólo en presencia de aire húmedo (los grupos de fosforilcolina son tan hidrófilos que absorben suficiente agua del aire para permitir el proceso de lubricación). En nuestro caso el sistema de partículas/pared consiste en una monocapa lipídica y partículas de poliestireno que tienen cierta densidad de carga en su superficie, por lo tanto, para apoyar el argumento de la condición de deslizamiento parcial, tenemos que asumir que algunos lípidos no unidos se adsorben en las partículas coloidales durante sus excursiones por encima de la pared inferior, permitiendo la condición de deslizamiento entre ambas superficies. La adsorción de lípidos en las partículas de poliestireno ya ha sido demostrada en varios informes [32, 46-48] y es el escenario más probable que puede explicar los dos comportamientos diferentes observados en el sistema de partículas/lípidos, como se discute más adelante. En cualquier caso, la presencia de una longitud de deslizamiento parcial en el sistema de partículas/lípidos del grupo A sugiere que esta condición límite es posible en superficies muy húmedas incluso a bajas tasas de cizallamiento. La independencia entre la longitud de deslizamiento y la tasa de cizallamiento ya se ha observado en el caso de las superficies cubiertas con surfactante mediante el uso de la microscopía de fuerza nanorreológica y atómica [49].

Efectos electroviscosos a grandes distancias de partícula/pared. Salvo el sistema de lípidos/partículas del grupo A que se ha examinado anteriormente, el resto de los valores de difusividad que se muestran en la figura 7 se encuentran por debajo de las predicciones hidrodinámicas. La hipótesis principal de este trabajo es que este obstáculo a la difusión se debe a los efectos de la electroviscoso. Ahora, ya que los tratamientos teóricos de EVE ofrecen expresiones que consideran ya sea una esfera cargada inmersa en una solución electrolítica sin límites, por un lado, o un esfera cargada que se mueve en relación a una pared pero en el límite de distancias de separación muy pequeñas; decidimos analizar primero los valores de difusividad a grandes distancias de la pared, $D_{||\infty}$, $D_{||\perp}$, y luego

normalizar el resto de los valores de difusividad con estos coeficientes de difusión a larga distancia para aislar de alguna manera los efectos de la proximidad de la pared.

Los coeficientes de difusión a larga distancia (tomando el valor medio de los coeficientes de difusión paralelos, D_x y D_y) normalizados con el valor de Stokes-Einstein, $D_{||,\perp,\infty}/D_o$, están tabulados en la Tabla 1 y trazados en función de a/κ^{-1} en la figura 8 para los sistemas de partícula/vidrio, partícula/polielectrolitos y partícula/lípidos del grupo B. Hemos comparado estos valores experimentales de difusividad con la teoría de Ohshima [16] para la fricción de electrolitos en esferas móviles aisladas (líneas sólidas). Encontramos que nuestros valores experimentales eran más bajos (fricción electrolítica más alta de lo esperado) que las predicciones de Ohshima usando su solución asintótica para pequeños potenciales de superficie. Su expresión para el amplios límite de κa (para cualquier valor de ζ) dio, sin embargo, valores similares a los encontrados en nuestros experimentos usando valores típicos de los potenciales ζ de la partícula medidos con un zetametro (ZetaPlus, Brookhaven Ins. Corp.). Este acuerdo cuantitativo debe considerarse una coincidencia más que una predicción válida, ya que nuestros valores de κa no son grandes (ver Tabla 1 y Figura 8). En cualquier caso, no somos los primeros en informar un desajuste con las expresiones clásicas de Ohshima. Tawari *et. al.* [28] informaron, por ejemplo, que los coeficientes de difusión encontrados en sus suspensiones de arcilla laponita cargadas eran menores hasta en un 50% con respecto a las predicciones de Ohshima. Los autores atribuyeron esta discrepancia a las distorsiones de doble capa más altas experimentadas por sus partículas en contraste con el tratamiento de distorsiones asintóticamente pequeñas utilizado en el trabajo de Ohshima. En nuestro caso, no está claro por qué los valores de difusividad están por debajo de los teóricos. Nuestra primer propuesta es que la pared puede causar una mayor distorsión de la nube iónica no contemplada por el tratamiento linealizado de Ohshima: aunque la pared todavía puede estar lo suficientemente lejos de las partículas como para producir tensiones de corte entre ellas, su mera presencia puede causar una distorsión anisotrópica de la nube iónica que se superpone a las distorsiones inferidas por el propio movimiento de las partículas.

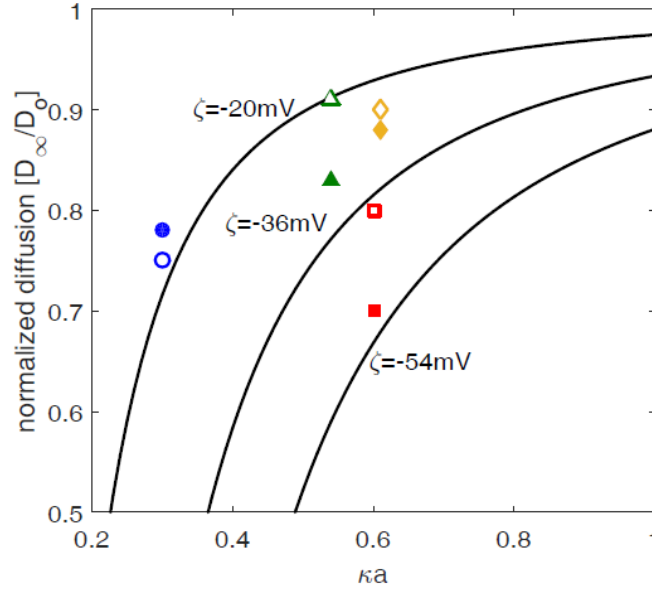


Figura 8: Coeficientes de difusión a larga distancia normalizados con el valor de Stokes-Einstein, $D_{||,\perp,\infty}/D_0$, representados como una función del radio de la partícula más la longitud inversa de Debye-Hückel, κa . Sistemas de partículas/vidrio (círculos), partículas/hialuronato (triángulos), partículas/PLL-glut (cuadrados) y partículas/lípidos del grupo B (diamantes). Símbolos vacíos: componente paralelo, símbolos rellenos: componente perpendicular. Líneas continuas: predicciones de Ohshima [16] para el límite $\kappa a \rightarrow \infty$ utilizando potenciales ζ típicos de las partículas.

Efecto electroviscoso debido al movimiento relativo entre las partículas y la pared. De acuerdo con las ecuaciones 13, 14 y 16, los EVE producidos por el movimiento relativo entre dos paredes cargadas pueden expresarse genéricamente como $\mu_{app}/\mu = \left[1 + f(\zeta_w, \zeta_p)h^{-2}\right]^c$, siguiendo la aproximación de doble capa delgada. Esta expresión dice que la fricción del electrolito aumenta a medida que la distancia partícula/pared se reduce y se desvanece cuando $h \rightarrow \infty$ (ya sabemos que lejos de la pared, las partículas todavía experimentan un arrastre electroviscoso). Para tener una idea más detallada del efecto que el movimiento relativo entre las partículas y la pared tiene sobre el arrastre electroviscoso, trazamos nuevamente los valores de difusividad en función de z pero ahora normalizando con los coeficientes de difusión de larga distancia. Las relaciones $D_{||,\perp}(z)/D_{||,\perp,\infty}$, contra la distancia z se muestran en la figura 9 para los sistemas de partículas/vidrio, partículas/hialuronato, partículas/pLL-glut y partículas/lípidos de grupo B. Incluso con esta normalización todavía observamos una clara desviación de las curvas hidrodinámicas estándar a distancias de separación pequeñas. Sin embargo, ahora vemos que la capa de polielectrolito pasivado (pLL-glut) que interactúa con las partículas sigue de cerca los factores de corrección hidrodinámicos. Esto tiene sentido, ya que la detección de carga de los grupos poli-L-lisina positivos con glutaraldehído reduce la carga efectiva de la pared y, por lo tanto, reduce las EVE.

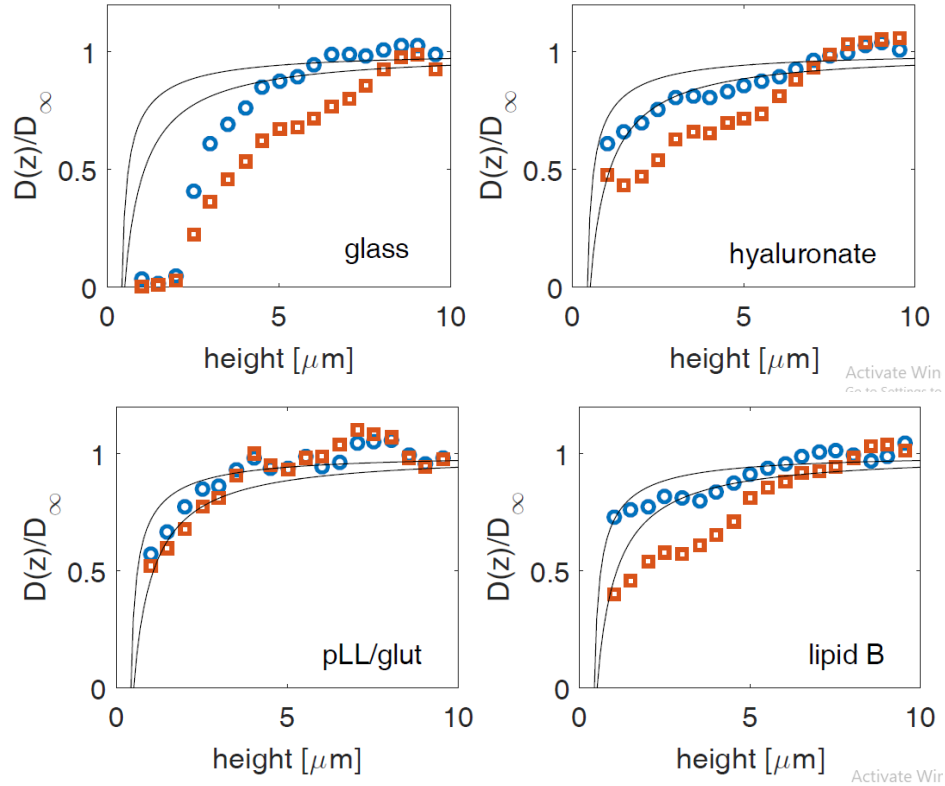


Figura 9: Coeficientes de difusión normalizados con los valores de difusividad de larga distancia: componentes paralelos (círculos) y perpendiculares (cuadrados). Las líneas continuas son las expansiones polinomiales de Faxen o Schäffer, ecuaciones 3 y 4, respectivamente.

El siguiente paso en nuestro análisis fue calcular la viscosidad requerida por la relación de Stokes-Einstein, ecuación 2, para producir los valores de difusividad experimental observados. En otras palabras, interpretamos las desviaciones de la teoría hidrodinámica como un aumento aparente de la viscosidad asumiendo que todavía se aplican los factores de corrección de Faxen o Schäffer. Los valores de las relaciones de viscosidad experimentales, μ_{app}/μ , frente a la distancia z se muestran en la figura 10. Los ajustes teóricos para el movimiento paralelo, ecuación 13 (líneas continuas) o ecuación 14 (líneas discontinuas), así como para el movimiento perpendicular, ecuación 16 (líneas continuas), también se muestran en la figura. El único parámetro ajustable utilizado en los ajustes fue el valor de la conductividad del medio, λ . Es evidente que el mayor aumento de la viscosidad aparente fue el del sistema partículas/vidrio. Esto apoya la hipótesis de que los EVE son los fenómenos relevantes en nuestras observaciones y que otros efectos que pueden jugar un papel en la disminución de D , como la presencia de macromoléculas cerca de las superficies o efectos hidrodinámicos debido a la conformación extendida de las cadenas de polímero a bajas fuerzas iónicas tienen menor importancia. La evidencia más fuerte que tenemos para apoyar el EVE es que los valores de las conductividades encontradas de los ajustes usando la ecuación 13 (componente paralela) están muy cerca de los valores calculados de las mediciones estáticas usando las ecuaciones 17 y 18 y los valores de doble capa,

κ^{-1} , proporcionados por los potenciales de interacción (como se muestra en la Tabla 1, los valores de λ son del mismo orden de magnitud que los calculados a partir de mediciones estáticas que consideran H^+ o Na^+ como contrarrestadores). Además, también obtuvimos una estrecha concordancia entre estos valores de λ y los obtenidos con la teoría de Bike y Prieve, [11] la ecuación 16, para el movimiento perpendicular (los valores correspondientes de $\bar{\lambda}$ son 0.25, 1.63 y 0.3 $\mu S/m$ para la partícula/vidrio, la partícula/hialuronato y la partícula/lípido-B respectivamente). Según la teoría de Tabatabaei [23], la ecuación 14, dio valores más bajos de λ en todos los casos en comparación con los otros modelos (los valores correspondientes son 0,014, 0,05 y 0,1 para los sistemas de partículas/vidrio, partículas/hialuronato y partículas/lípidos-B, respectivamente, utilizando un valor típico de $\zeta = -40mV$ para la pared de vidrio y una relación de difusividad de contracción a coión de $S = 1,7$). No nos queda claro por qué la teoría de Tabatabaei no arrojó valores de λ similares a los predichos por la teoría de Bike y Prieve ya que, hasta donde sabemos, ambos autores emplearon un formalismo similar (se equipararon las expansiones asintóticas asumiendo una doble capa eléctrica delgada así como la aproximación de la lubricación). Es pertinente mencionar que en la teoría de Tabatabaei el llamado número de Hartmann se consideraba de orden uno, $Ha = 2n_{\infty}ak_BT/\mu U \approx O(1)$, es decir, los campos inducidos por el movimiento son comparables a la escala térmica [22].

Cabe hacer una mención final sobre la forma de las curvas de μ_{app}/μ . Los efectos electroviscosos fueron formulados originalmente para entender el arrastre añadido en esferas aisladas y el observado en soluciones electrolíticas que fluyen entre dos paredes cargadas [17,22]. El análisis teórico de Levine *et. al.* [25] demostró, por ejemplo, que cuando dos paredes están muy cercanas entre sí de manera que sus dobles capas eléctricas comienzan a superponerse (efectos electroviscosos secundarios), el aumento de μ_{app}/μ en función de la distancia de separación entre las paredes tiene un máximo pero luego cae a cero como $h \rightarrow 0$. En nuestro caso, el movimiento de una pared (la partícula) en relación con otra, las paredes funcionalizadas, es de alguna manera similar al estudiado en los flujos impulsados por la presión, aunque no parece producirse ninguna disminución de μ_{app}/μ a medida que la partícula se aproxima a la pared.

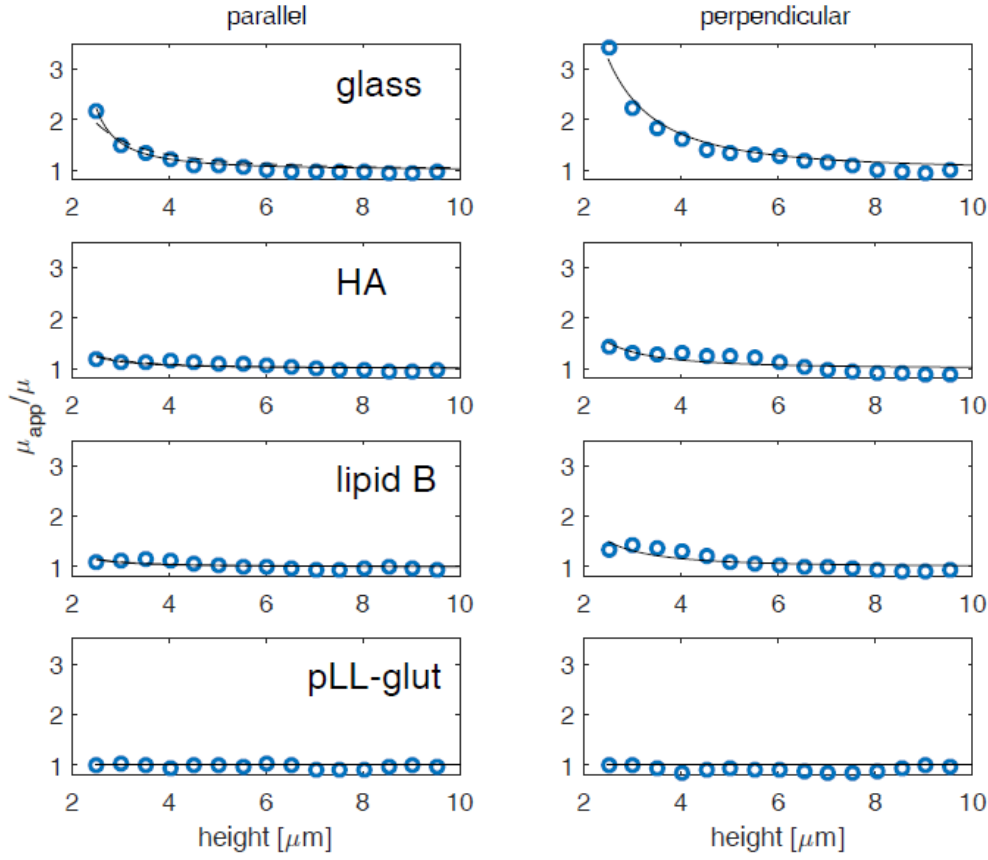


Figura 10: Valores de la viscosidad aparente normalizados con la viscosidad del medio ($1\text{mPa} \cdot \text{s}$). La columna de la izquierda corresponde al componente paralelo mientras que la columna de la derecha al componente perpendicular. Las líneas continuas en los datos de componentes paralelos corresponden a ajustes teóricos usando la ecuación 13, las líneas discontinuas corresponden a ajustes usando la teoría de Tabatabaeis, 23 ecuación 14. Las líneas sólidas en los datos de componentes perpendiculares corresponden a ajustes teóricos usando la teoría de Bike y Prieve, 11 ecuación 16. En el gráfico pLL-glut la línea es solo una línea recta $\mu_{app}/\mu = 1$.

Efectos de las fuerzas conservadoras en los coeficientes de difusión. Una parte de los datos experimentales que aún no hemos aclarado es el aumento algo misterioso de $D_z(z)$ (componente perpendicular) cerca de la superficie en el sistema de partículas/hialuronato (véase la figura 7b). Algunos autores [50] han propuesto la idea de que el potencial de interacción observado entre la partícula y la pared puede influir en los valores de difusividad de la primera. Por lo tanto, es tentativo para nosotros sugerir que el alto valor del encuentro de $D_z(z)$ cerca de la pared se debe a la interacción electrostática altamente repulsiva observada en este sistema: después de todo, fue en este caso donde obtuvimos el valor más alto del prefactor $Z_1/k_B T$ en el modelo de potencial de interacción (véase la Tabla 1). Para examinar más de cerca este problema nos damos cuenta de la necesidad de tener una expresión explícita de D en función de tales fuerzas conservadoras. En primer lugar, tenemos que estar seguros de que la ecuación de Smoluchowski para la evolución de la

distribución de probabilidad $p(z, t)$ se aplica al caso de la partícula/hialuronato. Como se ha mencionado en otros trabajos [3], el uso de la ecuación de Smoluchowski se justifica si se cumplen las siguientes condiciones: 1) el intervalo de tiempo más corto en los experimentos debe ser mayor que el tiempo de relajación característico m/γ ($t > m/\gamma$), m siendo la masa virtual de las partículas; y 2) el campo de fuerza no debería cambiar apreciablemente en distancias comparables o menores que $\sqrt{mk_B T}/\gamma$. Para los valores típicos de la masa de la partícula $m \sim 10^{-17} \text{ kg}$, la energía térmica $k_B T \sim 4 \times 10^{-21} \text{ J}$ y el coeficiente de arrastre $\gamma \sim 6 \pi \mu a \sim 10^{-8} \text{ kg/s}$ (o superior); el tiempo de relajación produce $\sim 1 \text{ ns}$ y $\sqrt{mk_B T}/\gamma \sim 0.02 \text{ nm}$. Por lo tanto, confiamos plenamente en que la ecuación de Smoluchowski rige la dinámica del sistema actual, ya que la ventana de tiempo más corta utilizada en los experimentos fue de 41ms y las fuerzas eléctricas de repulsión varían en una escala de longitud del orden de $\kappa^{-1} \sim 1 \mu\text{m}$. Ahora bien, es bien sabido en la comunidad de la materia blanda que la solución aproximada de la ecuación de Smoluchowski

$$\frac{\partial p(z, t)}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial z} \left[D_z \frac{\partial p(z, t)}{\partial z} - \frac{D(z)f(z)}{k_B T} p(z, t) \right], \quad (19)$$

da, hasta el primer orden en el paso de tiempo Δt [51]:

$$MSD = \langle \Delta z(\Delta t)^2 \rangle = 2D_z(z)\Delta t = \frac{2k_B T \Delta t}{\gamma(z)} \quad (20)$$

La expresión 20 es la ecuación fundamental que utilizan los experimentalistas para calcular los coeficientes de difusión a partir de los desplazamientos cuadráticos medios; obsérvese, sin embargo, que esta ecuación no contiene ninguna información sobre la dependencia de D de las fuerzas conservadoras $f(z)$. Por otra parte, también es bien sabido que el primer momento tiene una dependencia de las fuerzas conservadoras en $O(\Delta t)$ en la forma $\langle \Delta z(\Delta t)^2 \rangle = \partial D / \partial z + Df(z)/k_B T$ [51]. Motivados por esta última expresión procedemos a calcular el siguiente término de orden $O(\Delta t^2)$ en el desplazamiento cuadrático medio para ver si obtenemos alguna dependencia de $D(z)$ de las fuerzas $f(z)$. Hasta ahora no hemos podido encontrar un documento donde este cálculo ya haya sido publicado. El cálculo es sencillo pero largo: hay que expandir $p(z, t)$ de Taylor en t hasta el segundo orden, y luego sustituir la ecuación de Smoluchowski en $\partial / \partial t (\partial p / \partial t)$ considerando que $D(z)$ y $f(z)$ son estacionarios, multiplicando por z^2 e integrando sobre z . Las integrales que contienen los términos $\partial^n / \partial z^n p(z, t)|_{t=0} \delta^n(z)$ se evalúan utilizando la identidad $\int g(z) \delta^n dz = - \int \frac{\partial g(z)}{\partial z} \delta^{(n-1)}(z) dz$ y observando que para cualquier potencia m , $\int z^m \delta(z) = 0$. Aquí $\delta(z)$ es la función del delta de Dirac. Hasta el orden $O(\Delta t^2)$ obtuvimos por lo tanto que el MSD es:

$$\langle \Delta z^2 \rangle = 2D(z)\Delta t + \left[\left(\frac{Df}{k_B T} \right)^2 - \frac{D^2}{k_B T} \frac{\partial D}{\partial z} - \frac{\partial D}{\partial z} \left(\frac{\partial D}{\partial z} + \frac{Df}{k_B T} \right) \right] \Delta t^2 \quad (21)$$

Obsérvese que si el paso de tiempo es pequeño, las fuerzas externas cero y el coeficiente de difusión una constante (ausencia de la pared), la ecuación 21 recupera la relación estándar entre MSD y el coeficiente de difusión (ecuación 20). Considerando la ecuación de Stokes-Einstein como una prueba para los términos $\partial D/\partial z$ de la ecuación 21, notamos que estos términos eran más pequeños que los otros. Por lo tanto, usamos la nueva relación aproximada

$$D_z(z) = \frac{\langle \Delta z^2(\Delta t) \rangle}{2\Delta t} - \frac{1}{2} \left[\left(\frac{Df}{k_B T} \right)^2 - \frac{D^2}{k_B T} \frac{\partial f}{\partial z} \right] \Delta t \quad (22)$$

para recalcular los componentes de difusión perpendicular del MSD, pero ahora utilizando los valores de $f(z) = -\partial\phi/\partial z$ obtenidos de los perfiles de potencial de interacción (figura 6, triángulos invertidos). Los nuevos valores de $D_z(z)$, representados en la figura 11 (símbolos cuadrados), son casi idénticos a los anteriores (círculos) excepto por los valores a distancias cortas, donde ahora se mantiene el perfil bajo como $z \rightarrow 0$. En palabras ordenadas, lo que encontramos después de considerar una relación apropiada entre el MSD , D y $f(z)$ es que los valores anteriores de D usando la relación $MSD = 2Dt$ fueron mal calculados, y es el MSD pero no la difusividad lo que manifiesta la influencia de las fuerzas conservadoras de la partícula/pared. También calculamos los valores de difusividad con la ecuación 20 utilizando otros valores de $\Delta t = n(1/24Hz)$ (para $n = 6, 5, 4$ y 3). Los valores de D calculados eran muy similares entre sí y sólo se observó una ligera disminución del valor más cercano a la pared al disminuir el paso del tiempo (véase la figura 11, para $n = 2$ no pudimos obtener buenos datos estadísticos).

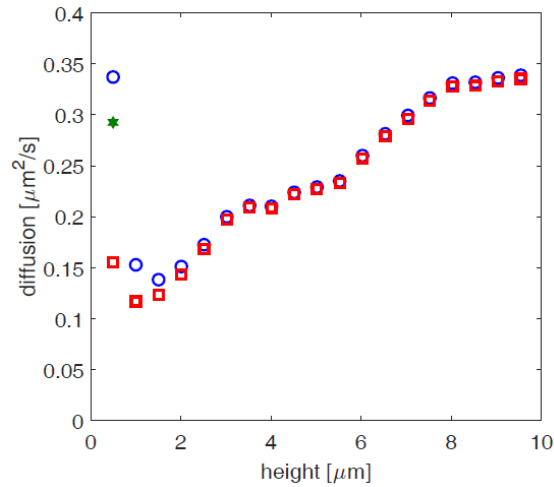


Figura 11: Coeficiente de difusión perpendicular $D_z(z)$ obtenido para el sistema de partículas/hialuronato mediante la ecuación 20 (círculos) o la ecuación 22 (cuadrados). El paso de tiempo es $\Delta t = 6(1/24Hz)$, el símbolo de la estrella representa un valor obtenido cerca de la pared usando $\Delta t = 3(1/24Hz)$.

Resumen de los EVE en los sistemas de partículas/pared. Una vez analizados en detalle los mecanismos que controlan los coeficientes de difusión a corta y larga distancia de la pared, estamos preparados para proporcionar una explicación general de las interacciones entre las partículas y la pared estudiadas en este trabajo y su impacto en los perfiles de difusividad. En la figura 12 hemos clasificado los sistemas según las características de la carga eléctrica en ambas superficies. En primer lugar, los sistemas de partículas/vidrio y partículas/hialuronato pertenecen al grupo en el que ambas superficies están cargadas eléctricamente (figura 12a). Se espera que los EVE se maximicen en esta situación, siendo el sistema de partículas/vidrio el de mayor desviación seguido por el sistema de partículas/hialuronato, aquí el valor de conductividad aumentó (disminución de los EVE) debido a la presencia de especies iónicas adicionales. Como se muestra en las figuras 8 y 9, en ambos casos los valores de difusividad fueron menores que los esperados a corta y larga distancia de la pared. El sistema de partículas/pLL-glut pertenece al grupo (figura 12b) en el que las partículas tienen un potencial eléctrico mayor que el de la pared. En este caso se espera que los EVE sean grandes en la esfera aislada, lejos de la pared, pero pequeños en relación con su movimiento por encima de la pared. Los bajos valores de los coeficientes de difusión a grandes distancias, D_{∞}/D_o (véase la figura 8) corroboran el hecho de que mientras que los EVE relativos a la pared son pequeños (figuras 9 y 10), la esfera cargada por sí sola experimenta una fricción de electrolitos debido a su propia doble capa eléctrica.

En el sistema de partículas/lípidos distinguimos dos tendencias de interacción distintivas en los correspondientes perfiles de potenciales: una primera en la que no se observó repulsión electrostática y que posteriormente mostró un perfil de difusividad con una longitud de deslizamiento aparente, y una segunda que exhibió una interacción de repulsión acompañada de un ligero aumento de μ_{app} cerca de la pared pero que al mismo tiempo presentaba valores de difusividad largos D_{∞} cercanos al valor de Stokes-Einstein (véase la figura 8). El escenario más probable que puede explicar esta variabilidad en la funcionalización de los lípidos se basa en la hipótesis de que una cierta cantidad de lípidos se adsorbe a las superficies coloidales (poliestireno). De hecho, se ha demostrado que las partículas coloidales son altamente lipofílicas [46-48] y capaces de adsorber una cierta cantidad de lípidos formando una variedad de estructuras de "caparazón"; en nuestro caso esto parece estar ocurriendo a pesar de que las funcionalizaciones fueron diseñadas para unir los fosfolípidos covalentemente a la pared de vidrio. Por lo tanto, se postula que la interacción de una partícula portadora de fosfolípidos con la pared también cubierta con DPPC genera el potencial de interacción (grupo A) que no exhibe repulsión electrostática y un perfil de difusividad que tiene una condición de límite de deslizamiento parcial (figura 12c). Evidentemente no se espera que ocurra ningún EVE en esta situación, aunque la fuerza iónica es todavía relativamente baja. Por otra parte, la interacción entre las partículas que tienen fosfolípidos en su superficie con zonas en el vidrio que tienen una cobertura deficiente (no homogénea) de lípidos exhibirá algún potencial de repulsión (grupo B) y EVE en relación con la pared, pero una pequeña fricción de electrolitos a grandes distancias (la

pared tiene un potencial eléctrico mayor que la partícula). Se necesitarán más estudios a este sentido, considerando en detalle la calidad de la funcionalización y la eficiencia de la cobertura de los fosfolípidos en las superficies de vidrio.

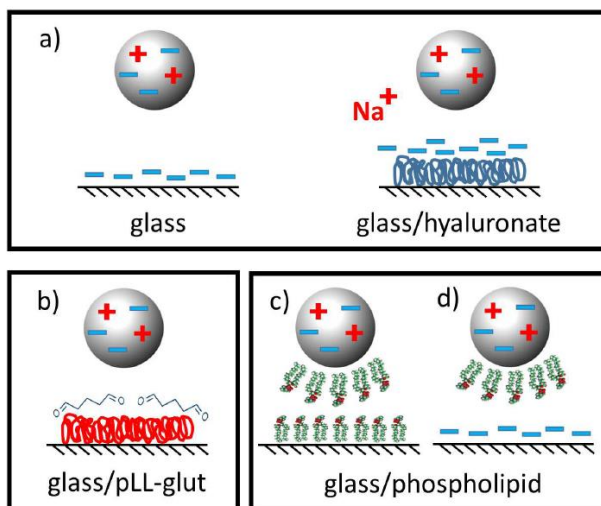


Figura 12: Esquema que muestra los diferentes sistemas de partículas/paredes según su combinación de carga eléctrica. El esquema (a) representa los sistemas en los que ambas superficies están cargadas eléctricamente, como los sistemas de partículas/vidrio y de partículas/hialuronato; se espera que los efectos electroviscosos desempeñen un papel importante en estos sistemas; Na^+ denota la presencia de sal de sodio en el sistema de partículas/hialuronato, lo que aumenta la concentración de especies iónicas en el medio y, por lo tanto, disminuye las EVE a través del valor de conductividad. El cuadro b) representa los sistemas en los que la partícula tiene un mayor potencial ζ que la pared, como el sistema de vidrio/pLL-glut. En este caso se espera que los EVE en la partícula aislada (lejos de la pared) sean fuertes, pero pobres en relación con la pared. La figura (c) representa los sistemas en los que los EVE están completamente ausentes debido a la pobre densidad de carga en ambas superficies, incluso cuando el medio tiene una fuerza iónica muy baja, este caso está representado por el sistema de grupo lipídico A; la figura (d) representa los casos en los que la pared tiene un mayor potencial ζ que la partícula, como el sistema de grupo lipídico B. En estos casos se espera que el EVE de la partícula aislada sea bajo, pero por lo demás fuerte cerca de la pared cargada.

Conclusión

En este trabajo presentamos mediciones experimentales de los componentes del coeficiente de difusión de partículas de $1\mu\text{m}$ que interactúan con superficies pasivadas o cargadas en condiciones de fuerza iónica extremadamente baja. Estos bajos niveles de sal exacerban los llamados efectos electroviscosos, obstaculizando los coeficientes de difusión por debajo de los valores predichos por la teoría hidrodinámica estándar, tanto a corta como a larga distancia de la pared. La evidencia más fuerte que encontramos para apoyar el predominio de los EVE es que los ajustes de los valores de viscosidad aparente extraídos de los datos de difusividad y usando la teoría simplificada o elaborada de EVE produjeron valores de conductividad del mismo orden de magnitud que los encontrados en las

mediciones estáticas independientes. El valor más grande de μ_{app} se encontró en el sistema de partículas/vidrio (valores de conductividad más bajos, $\lambda \sim 0.2\mu S/m$) seguido de las interacciones partículas/hialuronato. Aunque encontramos unívocamente que μ_{app} contra la distancia partícula/pared sigue la expresión general de EVE para las dobles capas eléctricas delgadas, $\mu_{app}/\mu \approx [1 + f(\zeta_p, \zeta_w)h^{-2}]^c$, en el futuro se podrá realizar una mejor comparación con teorías más generales [24] o con espesores de doble capa arbitrarios, aunque para ello será necesario utilizar expresiones semi-analíticas o realizar simulaciones numéricas.

En el sistema lípido/partícula encontramos que los datos estadísticos se dividieron en dos subconjuntos de partículas con distintos potenciales de interacción y perfiles de difusividad: uno primero en el que no se observó ninguna interacción electrostática entre la partícula y la superficie y que exhibe una condición de límite de deslizamiento parcial como sugieren los ajustes teóricos apropiados al perfil de difusividad. El otro, por el contrario, exhibía repulsión electrostática junto con una difusión restringida cerca de la pared. Explicamos esta dicotomía sugiriendo la absorción de lípidos por las partículas de látex. Se deberán realizar más experimentos variando los protocolos utilizados para unir fosfolípidos en superficies sólidas.

Por último, demostramos que es necesaria una relación adecuada entre el Desplazamiento Cuadrático Medio, los coeficientes de difusión y las fuerzas conservadoras para calcular valores apropiados de D y evitar valores sobreestimados cuando el paso de tiempo utilizado para calcular el MSD no es necesariamente pequeño. Los términos de fuerza en la ecuación 22 sólo consideran las fuerzas conservadoras entre las partículas y la pared; se supone que las fuerzas de elevación electrocinética como las reportadas por Bike y Prieve [11] son insignificantes en el movimiento browniano y, de hecho, parece ser innecesario explicar los altos valores de MSD cerca de la pared.

Referencias

- (1) Happel, J.; Brenner, H. *Low Reynolds Number Hydrodynamics*; Martinus Nijhoff Publishers: The Netherlands, 1983.
- (2) Squires, T. M.; Mason, T. G. Fluid Mechanics of Microrheology. *Annu. Rev. Fluid Mech.* 2010, 42, 413–438.
- (3) Frej, N. A.; Prieve, D. C. Hindered diffusion of a single sphere very near a wall in a nonuniform force field. *J. Chem. Phys.* 1993, 98, 7552–7564.
- (4) Bevan, M. A.; Eichmann, S. L. Optical microscopy measurements of kT-scale colloidal interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2011, 16, 149–157.
- (5) Bevan, M. A.; Prieve, D. C. Hindered diffusion of colloidal particles very near to a wall :Revisited. *J. Chem. Phys.* 2000, 113, 1228–1236.
- (6) Arauz-lara, L.; Carbajal-Tinoco, M. D.; Lopez-fernandez, R. Asymmetry in Colloidal Diffusion near a Rigid Wall. *Phys. Rev. Lett.* 2007, 99, 138303.

- (7) Sharma, P.; Ghosh, S.; Bhattacharya, S. A high-precision study of hindered diffusion near a wall. *Appl. Phys. Lett.* 2010, *97*, 104101.
- (8) Vinogradova, O. I. Drainage of a Thin Liquid Film Confined between Hydrophobic Surfaces. *Langmuir* 1995, *11*, 2213–2220.
- (9) Neto, C.; Evans, D.; Bonaccorso, E.; Butt, H.-J.; Craig, V. Reports on Progress in Physics Related content Boundary slip in Newtonian liquids : a review of experimental studies Boundary slip in Newtonian liquids. *Rep. Prog. Phys.* 2005, *68*, 2859–2897.
- (10) Lauga, E.; Squires, T. M. Brownian motion near a partial-slip boundary: A local probe of the no-slip condition. *Phys. Fluids* 2005, *17*, 103102.
- (11) Bike, S.; Prieve, D. Electrohydrodynamic Lubrication with Thin Double Layers. *J. Colloid Interface Sci.* 1990, *136*, 95–112.
- (12) Eichmann, S. L.; Anekal, S. G.; Bevan, M. A. Electrostatically Confined Nanoparticle Interactions and Dynamics. *Langmuir* 2008, *24*, 714–721.
- (13) Potanin, A.; Russel, W. Hydrodynamic interaction of particles with grafted polymer brushes and applications to rheology of colloidal dispersions. *Phys. Rev. E* 1995, *52*, 730–737.
- (14) Swavola, J. C.; Edwards, T. D.; Bevan, M. A. Direct Measurement of Macromolecule-Coated Colloid Mucus Interactions. *Langmuir* 2015, *31*, 9076–9085.
- (15) Joly, L.; Ybert, C.; Bocquet, L. Probing the nanohydrodynamics at liquid-solid interfaces using thermal motion. *Phys. Rev. Lett.* 2006, *96*, 046101.
- (16) Ohshima, H.; Healy, T.; White, L. Sedimentation Velocity and Potential in a Dilute Suspension of Charged Spherical Colloidal Particles. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 1984, *2*, 1299–1317.
- (17) Hunter, R. J. *Zeta Potential in Colloid Science*; Academic Press: Great Britain, 1988.
- (18) Schumacher, G. A.; van de Ven T.G.M., Brownian Motion of Charged Colloidal Particles surrounded by Electric Double Layers. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 1987, *83*, 75–85.
- (19) Ven, T. V. D. Electroviscous phenomena in colloidal dispersions. *Chem. Eng. Sci.* 2001, *56*, 2947–2955.
- (20) Masliyah, J.; Bhattacharjee, S. *Electrokinetic and Colloid Transport Phenomena*; Wiley-Interscience: USA, 2006.
- (21) García-Salinas, M.; de las Nieves, F. Anomalous Trends in the Electroviscous Effects of Polystyrene Latexes: Experimental and Theoretical Study. *Langmuir* 2000, *16*, 7150–7155.
- (22) Yariv, E.; Schnitzer, O.; Frankel, I. Streaming-potential phenomena in the thin-Debye-layer limit. Part 1. General theory. *J. Fluid Mech.* 2011, *685*, 306–334.
- (23) Tabatabaei, S. M.; Ven, T. G. M. V. D.; Rey, A. D. Electroviscous sphere wall interactions. *J. Colloid Interface Sci.* 2006, *301*, 291–301.
- (24) Tabatabaei, S.; Van de Ven, T. Tangential electroviscous drag on a sphere surrounded by a thin double layer near a wall for arbitrary particle-wall separations. *J. Fluid Mech.* 2010, *656*, 360–406.
- (25) Levine, S.; Marriott, J.; Robinson, K. Theory of Electrokinetic Flow in a Narrow Parallelplate Channel. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1974, *2*, 1–11.
- (26) Feitosa, M.; Mesquita, O. Wall-drag effect on diffusion of colloidal particles near surfaces: A photon correlation study. *Phys. Rev. A* 1991, *44*, 6677–6685.

- (27) Carbajal-Tinoco, M.; de León, G. C.; Arauz-Lara, J. Brownian motion in quasibidimensional colloidal suspensions. *Phys. Rev. E* 1997, *56*, 6962–6969.
- (28) Tawari, S. L.; Koch, D. L.; Cohen, C. Electrical Double-Layer Effects on the Brownian Diffusivity and Aggregation Rate of Laponite Clay Particles. *J. Colloid Interface Sci.* 2001, *66*, 54–66.
- (29) Faucheux, L.; Libchaber, J. Confined Brownian Motion. *Phys. Rev. E* 1994, *49*, 5158–5164.
- (30) Cox, R. Electroviscous forces on a charged particle suspended in a flowing liquid. *J. Fluid Mech.* 1997, *338*, 1–34.
- (31) Singh, S.; Junghans, A.; Tian, J.; Dubey, M.; Gnanakaran, S.; Chlistunoff, J.; Majewski, J. Polyelectrolyte multilayers as a platform for pH-responsive lipid bilayers. *Soft Matter* 2013, *9*, 8938–8948.
- (32) Everett, W. N.; Bevan, M. A. kT-Scale interactions between supported lipid bilayers. *Soft Matter* 2014, *10*, 332–342.
- (33) Sch"affer, E.; Norrelykke, S.; Howard, J. Surface Forces and Drag Coefficients of Microspheres near a Plane Surface Measured with Optical Tweezers. *Langmuir* 2007, *23*, 3654– 2665.
- (34) Booth, F. The electroviscous Effect for Suspensions of Solid Spherical Particles. *Proc. Roy. Soc. (London)* 1950, *203*, 533–551.
- (35) P., V. *Ionic conductivity and diffusion at infinite dilution, Handbook of Chemistry and Physics*; CRC Press: USA, 1992/93.

Interacción de partículas coloidales con superficies complejas biológicamente relevantes

Introducción

Un aspecto fundamental en los sistemas de materia blanda, tanto desde el punto de vista fundamental y como del tecnológico, es la capacidad de determinar el potencial de interacción de las diferentes especies en el sistema [1-5]. Las interacciones superficiales de las partículas, tanto directas como hidrodinámicas, han sido abordadas experimentalmente, teóricamente y por simulaciones numéricas para superficies para interacciones duras y suaves [7-8]. Derivados de la parte experimental, diferentes técnicas como la video-microscopia o la microscopia de reflexión interna total [9] han sido usadas para determinar la distribución de alturas de las partículas arriba de la superficie a partir del cual se determina el potencial de interacción efectivo a través de la distribución de Boltzmann. La caracterización de la interacción de las especies coloidales con las superficies es también de mucho interés y este puede ser crucial en muchas aplicaciones. En la industria farmacéutica, por ejemplo, la afinidad de un coloide a un sustrato debe ser conocido y en muchos casos este es determinado por condiciones ambientales tales como el pH o la concentración de sales, surfactantes u otros aditivos en el medio [10-11]. El modelo de interacción coloide-superficie también ha sido utilizado para entender las interacciones biológicamente relevantes tales como las que son observadas entre proteínas y carbohidratos o entre otras moléculas como polímeros [12,13], polisacáridos [14, 15], polielectrolitos, proteínas o bicapas lipídicas soportadas [16, 17]. Una tendencia común observada en todas estas configuraciones de partículas/superficies es que el conjunto de parámetros que caracteriza las interacciones (por ejemplo, los parámetros contenidos en el modelo DLVO), puede variar de partícula a partícula o ser dependiente de la posición debido a la presencia de heterogeneidades, multivalencia o polidispersidad a escala molecular o coloidal [14]. Por esta razón, los estudios realizados en sistemas tan complejos han sido cautelosos al reportar estados variantes dentro del set de partículas completas, como estados levitados (suspendidos), asociados o depositados, incluso si las partículas provenían del mismo lote.

En el presente trabajo reporta un estudio de interacción de partículas de poliestireno (PS) de 1 μm con superficies funcionalizadas con macromoléculas biológicamente relevantes. Ya que las partículas son esferas de PS con una densidad de carga diferente de cero en sus superficies, los sistemas partículas/superficies considerados aquí pueden ser vistos como un modelo simplificado de dominios proteicos teniendo interacciones no específicas con las paredes. El primer caso estudiado fue la interacción de las partículas con una pared negativamente cargada hecha al unir covalente el ácido hialurónico con la superficie del vidrio. Es bien conocido, que el ácido hialurónico es uno de los polisacáridos más abundantes del glucocálix [18] además está involucrado en varios procesos celulares como la migración, proliferación y sanación de heridas [19, 20]; también tiene propiedades anti-

incrustantes y puede funcionar como una capa protectora del epitelio celular contra la acción digestiva de las enzimas [21]. Posteriormente, estudiamos la interacción de las partículas con una pared neutral formadas por la unión de una monocapa de un fosfolípido zwiterionico en la superficie del vidrio. En reportes previos se ha mostrado [16, 17] que cuando bicapas lipídicas soportadas interaccionan con esferas de poliestireno o sílice, la capa lipídica tiende a romperse y fusionarse con la superficie del vidrio o se unen con la partículas de poliestireno. Nuestra estrategia respecto a esto, consiste en unir covalentemente los lípidos al vidrio mediante el uso de fosfatidilcolina con un grupo acrilato unido a una de sus cadenas de carbono. El tercer caso estudiado fue la interacción de las partículas con un polielectrolito pasivado hecho cubriendo el vidrio con poli-L-Lisina (PLL) seguido de un entrecruzamiento con glutaraldehído. Otros reportes han usado recubrimientos con polielectrolitos para estudiar superficies biomiméticas. Por ejemplo, Swavola et al. [15] reportó que la interacción de partículas coloidales recubiertas de moco con bicapas de polielectrolito son capaces de imitar las superficies biológicas reales y su difusión a través de biopolímero. El par PLL-glutaraldehído para unir péptidos a soportes sólidos en estudios de unión antígeno-anticuerpo [10]. Finalmente, como casos control, elegimos estudiar la interacción de partículas con PLL sin pasivar en el que se espera que las partículas sean absorbidas en la pared inferior, y la interacción de las partículas con el vidrio sin funcionalizar. Todos los experimentos reportados fueron realizados en condiciones de baja fuerza iónica. Es bien sabido, la cantidad de sal en el medio no solo varía las interacciones electrostáticas entre las paredes a través de la longitud de Debye, sino que también cambia el grosor y la suavidad de los cepillos del polímero que cubren los soportes solidos (22, 23). Recientemente ha sido reportado, por ejemplo, que el grosor y la suavidad de cepillos del ácido hialuronico decrecen conforme la cantidad de iones catiónicos en el medio aumenta (23). Para fijar la conformación de los polímeros obtenida en las diferentes funcionalizaciones consideradas aquí, mantenemos el perfil de baja fuerza iónica en las soluciones y dejamos el estudio de los efectos de la sal añadida para futuras investigaciones (mientras que la condición de alta fuerza iónica es fisiológicamente más relevante, las bajas concentraciones de sal son, por otra parte, relevantes en la industria alimentaria o en los problemas relacionados con la solubilidad de las proteínas) (24).

Los potenciales de interacción se obtuvieron mediante la adquisición de los histogramas de altura de las partículas en relación con una pared horizontal, seguido de una interpretación adecuada y ajustada a la correspondiente curva de inversión de Boltzmann, $\frac{\varphi - \varphi_0}{k_B T} = \ln[(P(z_0)/P(z))]$, donde $P(z)$, $\varphi(z)$ denotan la distribución de probabilidad y potencial de interacción partícula-pared, respectivamente, mientras z_0 es un altura referencial, tomada al nivel máximo de probabilidad modo estadístico (5). Las trayectorias tridimensionales de las partículas se rastrean utilizando la función de dispersión de puntos de las partículas en un rango de alturas verticales de varias micras.

Materiales y métodos

Se utilizaron partículas fluorescentes de ThermoScientific de 1 μm (orange fluorescent polystyrene particles, FluoSpheres F13082) dispersas en agua pura en una fracción final de volumen de 1.7×10^{-7} con la finalidad de asegurar la presencia de solo una partícula en el campo visible. Se verificó el tamaño de la partícula a partir de una imagen de un cristal bidimensional de las partículas. La función de distribución radial tuvo un primer pico a una distancia de 1.023 μm medida de centro a centro.

Las diferentes químicas de superficie consideradas en este informe se representan en la Fig. 1. Todas las funcionalizaciones fueron hechas en cubreobjetos de vidrio lavados en una solución 2:1 de ácido sulfúrico/ peróxido de hidrogeno por 15 min, enjuagados con agua desionizada, secados a 35 °C y limpiados en plasma por 1 min. Por otro lado, el ácido hialurónico (Sigma Aldrich, MW: $7.5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$) fue unido a la vidrio covalentemente a grupos aminosilanos [(3-aminopropyl) triethoxysilane, Sigma Aldrich] siguiendo una reacción química EDC/NHS. Después de exponer las superficies al plasma cleaner, las superficies fueron incubadas en vacío por una hora y después incubadas toda la noche en horno a 60 °C. Después de depositó sobre la superficie una solución de EDC (7.6 mg/mL), NHS (2.3 mg/mL) y HA (0.1 mg/mL) y de nuevo incubada toda la noche. Finalmente se retira el exceso de solución con buffer de fosfatos. El fosfolípido (aPC) se unió covalentemente a través de una reacción entre grupos silanos y un grupo acrilato presente en una de las cadenas policarbonadas del lípido. El fosfolípido modificado, DPPC [1-palmitoyl-2-[16-(acryloyloxy)palmitoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine] de Avanti Polar Lipids se disolvió en agua a una concentración final de 5.7×10^{-15} moléculas/mL. La superficie fue tratada con grupos silanos [(3-Mercaptopropyl) trimethoxy silane, Sigma Aldrich] por una hora en vacío y posteriormente incubada toda la noche a 60 °C. Finalmente se depositaron sobre la superficie 500 μL de una solución de aPC y se incubo por 1 hr.

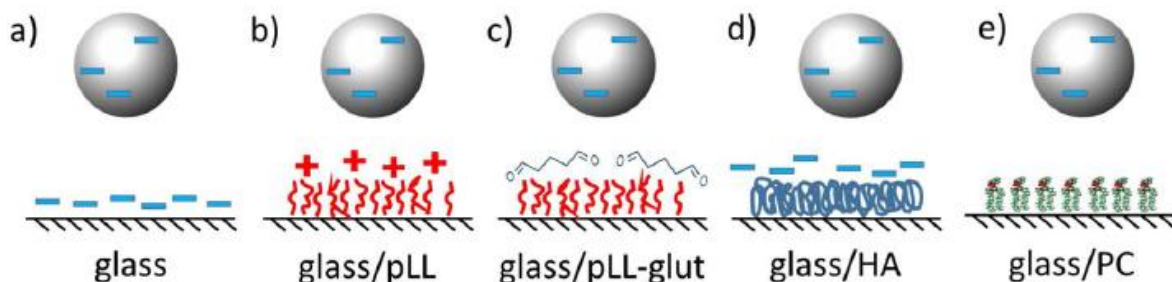


Figura. 1 Representación esquemática de los diferentes sistemas de partículas/paredes estudiados en este trabajo: a) Partículas de poliestireno (PS) 1 μm que interactúan con el vidrio desnudo, b) partículas que interactúan con el vidrio cubierto con poli-L-lisina (PLL), c) partículas que se difunden por encima del PLL pasivado con glutaraldehído (PLLglut), d) partículas que interactúan con un revestimiento de ácido hialurónico (HA) y e) partículas que interactúan con una cobertura de fosfolípidos switteriónicos. Como el PS es más pesado que el agua, las partículas se difunden cerca del fondo de la cámara de observación.

La funcionalización con poly-L-lisine (PLL, Sigma Aldrich) fue hecha a través de interacciones electrostáticas con los grupos SO^- del vidrio. Se depositaron sobre la superficie 200 μL de PLL (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubó durante 30 minutos, después se retiró el exceso de la solución con buffer de fosfatos. Para reticular la PLL con glutaraldehído, después de retirar el exceso de solución de PLL se depositan sobre la superficie 200 μL de una solución de Glut (2.5 mg/mL) y se incubó por 30 min seguido de enjuagues con buffer de fosfato para retirar el exceso. La suspensión de partículas se carga en una celda de vidrio, siendo la parte inferior un portaobjetos de microscopio funcionalizado como se describe aquí, la parte superior es un portaobjetos de cubierta. Ambos están separados por espaciadores de alrededor de 250 μm de ancho. El conjunto está pegado con resina epoxica. Las superficies fueron caracterizadas por microscopia de fuerza atómica para determinar. Se obtuvieron imágenes usando el modo de derivación con una punta OTESPA-R3 con una constante de resorte 45 N/m Y un promedio de frecuencia de resonancia de $f_0 = 72.63 \text{ kHz}$. Las muestras se escanearon a una velocidad de 16 $\mu\text{m}/\text{s}$, en un área de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ y a un setpoint de 1.4 V.

Las posiciones tridimensionales de las partículas fueron determinadas usando la función de dispersión puntual (PSF) de partículas fluorescentes. Esta técnica toma ventaja del patrón de difracción (PD) generada por una partícula fluorescente localizada por debajo del plano focal (PF) del objetivo de un microscopio óptico. El PD consiste de una serie de anillos concéntricos. El tamaño de los anillos es una función monotónicamente creciente de la separación de la partícula y el PF, esta propiedad es usada para cuantificar dicha separación que después se convierte en la tercera coordenada cartesiana de la partícula mediante una calibración (26). Las coordenadas x e y de la partícula se calcularon mediante los algoritmos estándar (26) localizando el pixel de mayor intensidad. La celda con la muestra se situó en una base motorizada del microscopio y se observó desde una vista superior usando el modo de fluorescencia. El microscopio además está equipado con una cámara y un piezoeléctrico de nanoenfoque con resolución nanométrica vertical. El sitio de grabación se eligió de tal manera que solo hubiera una partícula en el campo de visión cayendo hacia la pared inferior. Previo al ensamble de la celda, el techo y la superficie funcionalizadas fueron marcadas con partículas verde-fluorescentes de diámetro $d = 0.203 \mu\text{m}$ para determinar el ancho de la celda en el sitio de observación, así como para establecer las marcas de referencia para computar la distancia absoluta entre la partícula y la pared. La curva de calibración entre la posición vertical de las partículas y el radio de anillo concéntrico más grande fue hecha según se describe en el artículo de Carbajal-Tinoco et al (26), donde se muestra que esta técnica permite rastrear las posiciones verticales de la partícula en un rango de unas pocas decenas de micras con una resolución de 20nm (la resolución en la dirección z observada en nuestros experimentos tiene prácticamente el mismo valor).

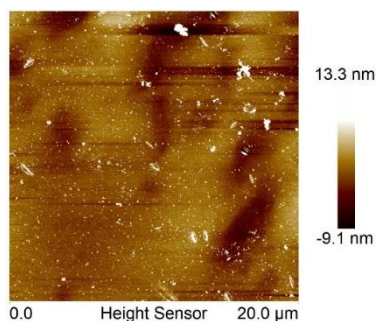
Resultados y discusión

Perfiles de la funcionalización de superficies

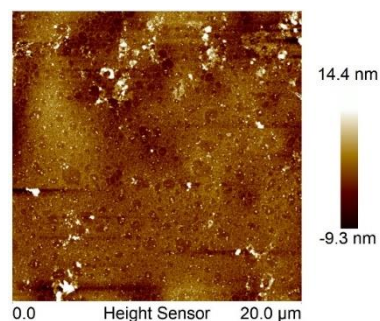
La topología de la superficie y los perfiles de altura obtenidos con la microscopía de fuerza atómica para las diferentes funcionalizaciones de la superficie se muestran en la Fig. 2. Las imágenes en 2D confirman que las superficies de vidrio fueron efectivamente funcionalizadas con las macromoléculas y revelan un aumento de las alturas en comparación con la correspondiente al vidrio sin funcionalizar; esto es particularmente evidente en los recubrimientos de PLL-glut y hialuronato (el recubrimiento PLL tiene un perfil similar al de la superficie pasivada con glutaraldehído). La imagen 2D correspondiente al recubrimiento lipídico revela la existencia de manchas redondeadas de menor altura que el fondo y que, en promedio, explican un ligero aumento de la rugosidad de la superficie contra el vidrio desnudo (1,48 nm contra 1,35 nm en el vidrio, la rugosidad rms es en ambos casos de 2,3 nm). Por lo tanto, estas mediciones indican la formación de una monocapa lipídica discontinua sobre el sustrato subyacente. En general, todas las topologías de superficie y los perfiles de altura manifiestan la formación de inhomogeneidades o dominios macromoleculares distribuidos aleatoriamente a lo largo de la superficie de vidrio formada durante los procedimientos de funcionalización. Por lo tanto, esperamos que la ocurrencia del comportamiento multimodal en los potenciales de interacción que se reportan a continuación, provenga preferentemente de las inhomogeneidades detectadas por las partículas al visitar diferentes lugares de la superficie.

Las trayectorias de las partículas y las alturas medias

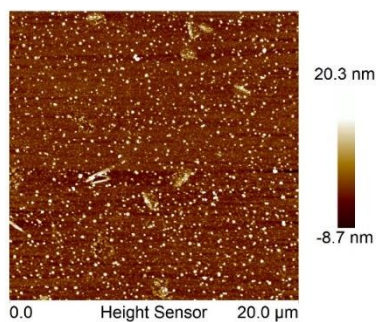
La Fig. 3 muestra secciones representativas de trayectorias en la coordenada z de partículas individuales que se mueven por encima de la pared para las cinco condiciones de superficie estudiadas: vidrio sin funcionalizar, vidrio cubierto con PLL, vidrio cubierto con PLL-glut, vidrio cubierto con ácido hialurónico (HA) y vidrio cubierto con una monocapa de fosfolípidos (PC). Como se puede ver aquí, para el vidrio sin funcionalizar, y para las funcionalizaciones con PLL-glut y HA, las partículas se desplazan por encima de la superficie sin hacer contacto con ella, lo que corresponde a una interacción de repulsión de partículas/pared.



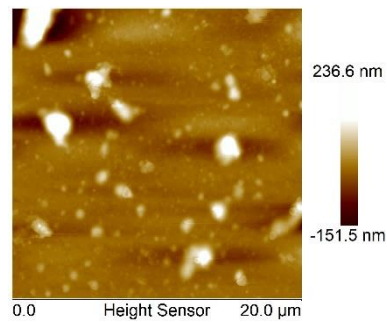
(a) Vidrio



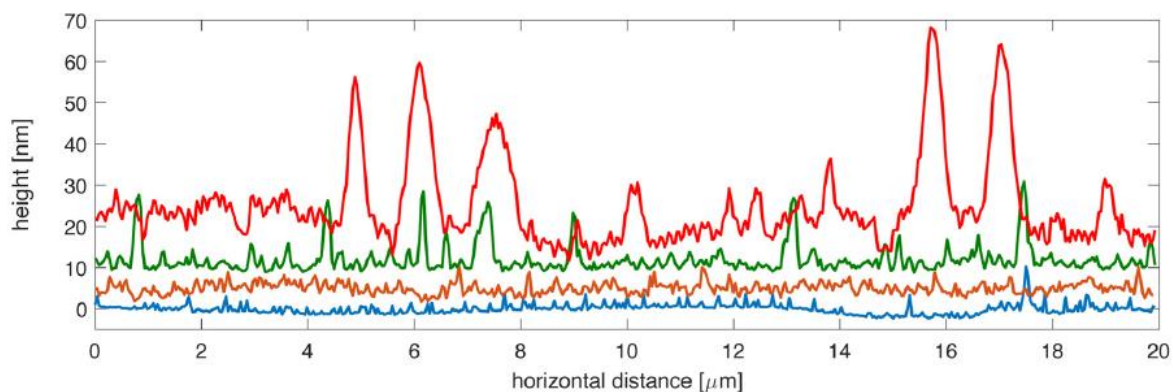
(b) Fosfatidilcolina



(c) PLL-glut



(d) Ác. Hialuronico



(e) Perfil de alturas

Fig. 2 Imágenes en 2D y muestras de perfil de altura de las superficies funcionalizadas obtenidas con AFM. Los perfiles de altura se desplazaron verticalmente como ayuda visual, de abajo hacia arriba: superficie de vidrio, superficie recubierta de fosfolípidos (desplazada +5 nm), superficies recubiertas de PLL-glutaraldeído (+12 nm) y hialuronato (+25 nm).

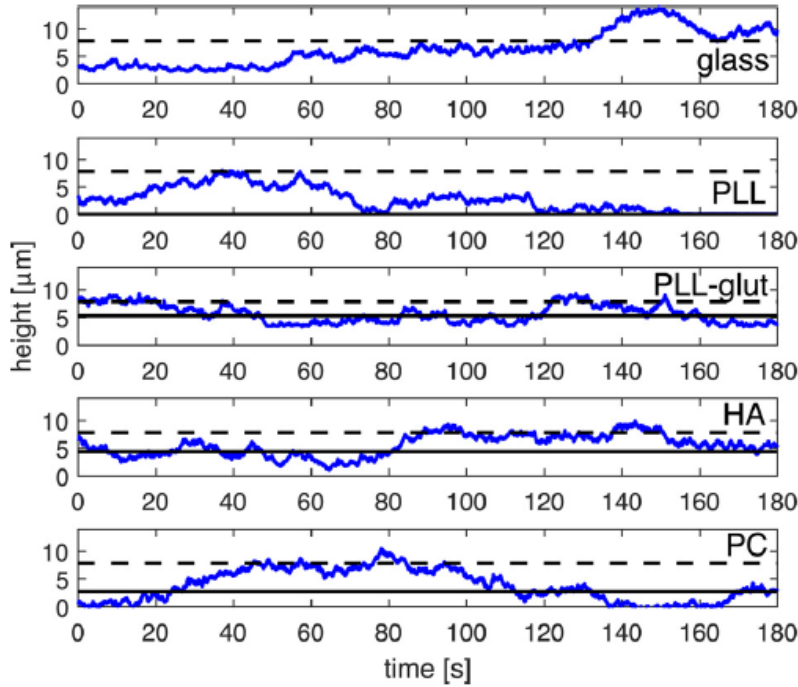


Figura 3. Sección de cinco trayectorias z en función del tiempo de las partículas individuales que se difunden por encima de la pared inferior. Las líneas discontinuas horizontales representan la altura media experimental $\langle z \rangle$ del sistema de referencia de partículas/vidrio ($7,84 \mu\text{m}$); las líneas sólidas horizontales denotan las alturas medias para cada configuración de partículas/pared. Los valores de $\langle z \rangle$ también están enlistados en la Tabla 1. En el sistema de partículas/PLL la altura media es prácticamente cero debido a la adsorción de las partículas.

Por otra parte, en el caso de la superficie cubierta de fosfolípidos la partícula también se mueve por encima de la superficie pero puede tocar temporalmente la superficie y escapar más tarde. En el caso de la funcionalización con PLL (interacción atractiva) la partícula se aproxima a la superficie realizando un movimiento Browniano y puede tocar la superficie brevemente pero eventualmente se adsorbe de manera irreversible (la altura promedio de este caso de no-equilibrio es prácticamente cero). La línea sólida en cada una de estas figuras representa la correspondiente posición vertical media medida de los estados de levitación (suspensión), $\langle z \rangle = \sum z P(z)$, mientras que las líneas discontinuas denotan la altura media experimental de la partícula cercana al sistema referencial de partículas/vidrio, $\langle z \rangle = 7,84 \mu\text{m}$. Notemos aquí que, en ausencia de interacciones entre las partículas y las paredes que no sean las del volumen excluido, la altura media debería ser igual a la longitud gravitatoria efectiva de la Esfera Dura $\langle z \rangle_{HS} = l_g + a$, con a siendo el radio de la partícula y $l_g = \frac{k_B T}{mg}$ la longitud gravitacional, en el caso de nuestros sistemas $\langle z \rangle_{HS} = 4.6 \mu\text{m}$. Así pues, una desviación de $\langle z \rangle$ de este valor $\langle z \rangle_{HS}$ indica la presencia de interacciones directas entre las partículas y las paredes además de la del volumen excluido. En la definición de la longitud gravitacional, $k_B T$ es la energía térmica, g la aceleración gravitatoria y $m = 4\pi a^3 \Delta \rho / 3$ la masa efectiva de las partículas después de considerar la diferencia de

densidad $\Delta\rho$ entre las partículas y el medio circundante. La Fig. 3 muestra que para los sistemas con PLL-glut, HA y PC, el valor medio $\langle z \rangle$ está por debajo del valor del vidrio. Como veremos más adelante, la diferencia en esos casos es una combinación de las interacciones directas de las paredes de las partículas y una variación en la masa de la partícula.

Distribuciones de probabilidad de altura

La posición de la partícula sobre la superficie depende de la interacción directa pared-partícula, del peso de la partícula y de la energía térmica que produce fluctuaciones alrededor de la posición de equilibrio que conducen a una distribución de alturas que obedece a la distribución de Boltzmann. Así pues, la interacción de una sola partícula con las diferentes paredes funcionalizadas estudiadas aquí se obtiene midiendo la función de distribución de probabilidad de las posiciones verticales $P(z)$. En la Fig. 4 mostramos $P(z)$ para los diferentes sistemas. Las curvas para los casos de vidrio, PLL-glut y HA representan el promedio ponderado de las funciones de distribución medidas en serie (una tras otra) en diferentes partículas individuales que se mueven en diferentes lugares del sistema, así como de diferentes preparaciones de muestras, lo que representa un tiempo total de registro de ~ 5 h (450.000 marcos a 25 Hz) para cada configuración de partículas/pared. Las distribuciones de probabilidad que se muestran aquí son en realidad el resultado de aplicar varios criterios de exclusión en los histogramas preliminares obtenidos con las trayectorias de la partícula entera. Para los N elementos (instantáneas) que visitan el binomio de altura i y que pertenecen a la partícula k , la distribución media ponderada para cada binomio i puede ser calculada como:

$$\langle P(z) \rangle = \sum_k \omega_k P_{ik} = \frac{\sum_k N_{ik}}{\sum_i \sum_k N_{ik}}, \quad (1)$$

donde

$$P_{ik} = \frac{N_{ik}}{\sum_i N_{ik}}, \quad \omega_k = \frac{\sum_i N_{ik}}{\sum_i \sum_k N_{ik}}. \quad (2)$$

Aquí P_{ik} es la probabilidad de la partícula k de estar a una altura dada i y ω_k es el peso estadístico que cada partícula tiene en la suma sobre el conjunto de partículas. Este promedio ponderado calculado con diferentes trayectorias de partículas se hace porque, en la práctica, la trayectoria de una sola partícula se pierde simplemente porque sale del campo de visión debido a la autodifusión; por lo tanto, uno se ve obligado a cambiar constantemente de posición en el plano xy para seguir registrando el movimiento de una sola partícula y garantizar un muestreo estadístico suficiente. El seguimiento de las diferentes partículas también ayuda a reconocer la polidispersidad intrínseca del conjunto de una sola partícula/pared (la polidispersidad a escala molecular debe ser suavizada por este procedimiento de promediación). Después de comparar las distribuciones de altura individuales con el promedio de todo el conjunto, descartamos los eventos de partículas individuales que mostraban distribuciones estrechas con picos mucho más grandes que el

pico máximo promedio (modo estadístico). Estos picos muy largos son indicativos de la absorción de partículas y fueron eliminados del conjunto final.

Con las trayectorias de las partículas efectivas (partículas libres que se mueven por encima de la pared) obtuvimos las distribuciones de probabilidad finales que se muestran en la Fig. 4. Los porcentajes que se muestran en las figuras indican el número de partículas efectivas (partículas libres o suspendidas) que quedan después de aplicar los criterios de exclusión; las barras de error representan, en cambio, el 95% de los intervalos de confianza. El porcentaje relativamente bajo obtenido en el sistema de partículas/vidrio puede atribuirse a los grandes sitios de adsorción que suelen presentar las superficies de vidrio en condiciones de baja resistencia iónica (29). De hecho, lejos de ser un sistema de referencia o de fácil control de la interacción partícula/pared, la superficie de vidrio suele exponer, con el paso del tiempo, impurezas orgánicas como el Fe_2O_3 o el Al_2O_3 que actúan como sitios de adsorción positiva para las partículas de poliestireno cargadas negativamente, reduciendo el tiempo de excursión de las partículas por encima de la pared de vidrio (30). El revestimiento de polielectrolito pasivado, PLL-glut, también presentaba bajos porcentajes de partículas efectivas, lo que indica una importante adsorción de partículas en las paredes funcionalizadas. Un resultado algo similar fue obtenido por Swavola et al. (15) mientras se estudia la interacción de un polisacárido complejo cargado negativamente, el moco, con las bicapas de polielectrolitos. Su estudio reveló la formación de ataduras macromoleculares entre el moco y la bicapa de polielectrolito, aunque esta última se estructuró poniendo el componente negativo (poliestireno sulfonado) encima de un polielectrolito cargado positivamente (polialamina) y esperando así una repulsión neta entre el moco y esta bicapa de polielectrolito. Los resultados de Swavola *et al.* y los resultados mostrados aquí para el recubrimiento PLL-glut coinciden en que la pasivación de los recubrimientos de polielectrolitos no conduce necesariamente a la formación de una superficie homogéneamente neutra y, por lo tanto, a la extinción de cualquier interacción coulombica entre las partículas y la pared. Por último, como caso contrastado, la funcionalización con hialuronato dio lugar a superficies con altas propiedades antiincrustantes, lo que permitió que casi todas las partículas mantuvieran sus trayectorias difusivas a lo largo de toda la campaña experimental.

En el caso del recubrimiento lipídico observamos una distribución multimodal (aparición de dos picos) en el histograma preliminar de altura. Al analizar la forma de la distribución de cada partícula individual (un total de 60 partículas diferentes) observamos que en algunas de ellas el pico de distribución estaba situado casi en la posición $z=0$, mientras que otras se extendían a mayores distancias. Sorprendentemente, las partículas que se movían cerca de la pared seguían exhibiendo el movimiento Browniano y no se detectaron signos de detención del movimiento en las trayectorias correspondientes (ver el último gráfico en la Fig. 3). Por lo tanto, decidimos dividir todo el conjunto de partículas en dos conjuntos de distribución, uno para las partículas que exhiben picos de distribución a distancias del orden del radio de las partículas, $\sim 0.5 \mu\text{m}$ (Grupo A, Fig. 4c), y otro que reúne el resto de las

trayectorias efectivas de las partículas (Grupo B, Fig. 4d). El porcentaje total de las distribuciones efectivas de las partículas fue del 80% en este caso, el 32% para el Grupo A y el 48% para el Grupo B. Como se discute con más detalle en la siguiente sección, la variación de las funciones de distribución de las diferentes partículas que interactúan con el recubrimiento lipídico puede atribuirse a la naturaleza discontinua de la capa lipídica, como se muestra en la correspondiente imagen de AFM, así como a la adsorción de moléculas lipídicas no unidas de las funcionalizaciones en las superficies de las partículas.

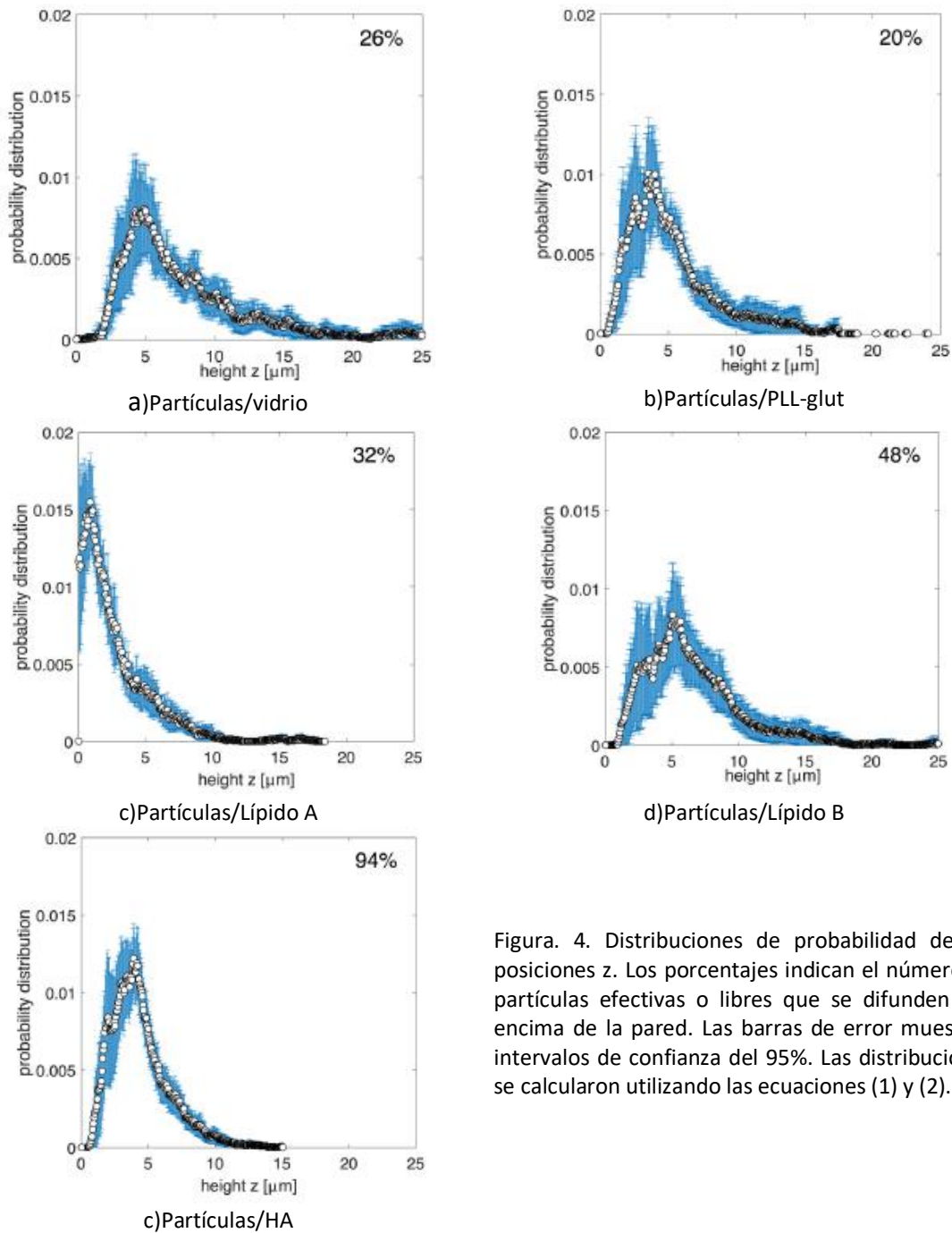


Figura. 4. Distribuciones de probabilidad de las posiciones z . Los porcentajes indican el número de partículas efectivas o libres que se difunden por encima de la pared. Las barras de error muestran intervalos de confianza del 95%. Las distribuciones se calcularon utilizando las ecuaciones (1) y (2).

Potenciales de interacción

Los correspondientes potenciales de interacción de las cinco distribuciones de probabilidad que se muestran en la Fig. 4 se representan en la Fig. 5. Aquí hemos representado el potencial adimensional $(\phi(z) - \phi_o)/k_B T$ en función de la altura relativa $z - z_{min}$, siendo z_{min} el nivel en el que se observó el valor potencial mínimo experimental para cada caso.

Todos los datos experimentales, excepto los del sistema de partículas/lípidos-Grupo A, se ajustaron bien utilizando el modelo genérico para la contribución combinada de los potenciales gravitatorio y electrostático:

$$\frac{\phi(z) - \phi_o}{k_B T} = Z_1 \exp(-\kappa[z - a]) + \frac{z}{l_g}; \quad (3)$$

donde κ^{-1} es la longitud de Debye-Hückel, Z_1 es el prefactor asociado a los potenciales eléctricos efectivos de las partículas y de las paredes, y l_g la longitud gravitacional. Los valores correspondientes de Z_1 , κ^{-1} y l_g están listados en la Tabla 1, así como las alturas medias experimentales $\langle z \rangle_{exp}$, graficadas en la Fig. 3. Comparamos estas alturas medias experimentales con el promedio teórico dado por Frej y Prieve [1] para un sistema de partículas/paredes que interactúan a través de dobles capas eléctricas y están inmersos en un potencial gravitatorio. Si tenemos en cuenta las interacciones con la Esfera Dura, esta relación puede escribirse como:

$$\langle Z \rangle_{Frej-Prieve} = \kappa^{-1} \left[\psi\left(\frac{\kappa^{-1}}{l_g}\right) + \ln(Z_1) \right] + a, \quad (4)$$

donde $\psi(\cdot)$ es la función digamma y a radio de las partículas. Los valores teóricos calculados después de utilizar los valores ajustados para Z_1 , κ^{-1} y l_g están enlistados en la Tabla 1. La concordancia entre los valores experimentales y teóricos de $\langle z \rangle$ es sorprendentemente buena a pesar de que Frej y Prieve derivaron la ecuación (4) considerando el límite donde la distancia promedio de separación de pared a pared, $h = z - a$, es mucho menor que el radio de la partícula. Esta concordancia de datos también confirma que la combinación de los potenciales electrostáticos y gravitacionales son suficientes para explicar y predecir los estados de equilibrio de la partícula suspendida. Además de las alturas medias, nótese que se pueden comparar alternativamente los modos estadísticos experimentales y teóricos, definidos aquí simplemente como la altura en la que las curvas de potencial de interacción tienen pendientes nulas (la altura más probable). Los valores de los modos, que en los sistemas actuales son siempre más pequeños que los promedios, también concuerdan bastante con la teoría DLVO (ver los valores mínimos de las curvas que se muestran en la Fig. 5).

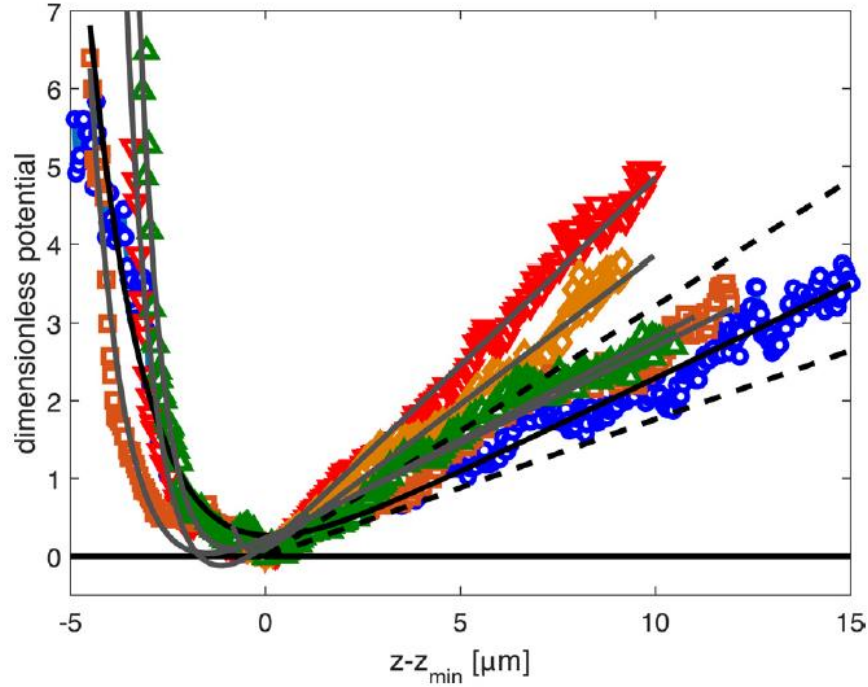


Figura 5. Potenciales adimensionales, $(\phi(z) - \phi_0)/k_B T$, en función de la altura relativa, $z - z_{min}$, para cada configuración de partículas/paredes; círculos: partícula/vidrio, triángulos invertidos: partícula/hialuronato, diamantes: partícula/lípido-Grupo A, cuadrados: partícula/lípido-Grupo B, triángulos: partícula/sistema de glut de PLL. La línea sólida es el ajuste teórico a los datos de las partículas/vidrio, las líneas grises sólidas se ajustan al resto de los sistemas de partículas/paredes, las líneas discontinuas representan el 10% de la polidispersidad alrededor de los datos de las partículas/vidrio.

Otra cuestión relevante que surge del modelo ajustado es que la longitud gravitatoria encontrada para los sistemas vidrio/HA y vidrio/lípido-Grupo A fue significativamente menor que el valor de $lg \sim 4 \mu m$ encontrado en el resto de los casos, e incluso menor que la altura media para las interacciones con la Esfera Dura, $\langle z \rangle_{HS} = 4.6 \mu m$. Esto conduce a un aumento de las pendientes de las correspondientes curvas gravitatorias (véanse los triángulos invertidos y los símbolos de los diamantes en la Fig. 5), lo que hace que queden fuera de los límites de polidispersidad del 10%, representados en la figura con líneas discontinuas (el proveedor de la partícula en realidad reporta una polidispersidad de sólo el 2%). Como la disminución relativa de $\langle z \rangle$ que se observa en la Fig. 3 para el sistema vidrio/HA no puede atribuirse a un potencial de atracción entre las partículas y la pared (la interacción es más bien repulsiva), los datos experimentales sugieren que las partículas ganan peso durante sus excursiones por encima de las paredes funcionalizadas, lo que indica una adsorción de las moléculas de las funcionalizaciones a las superficies de las partículas. En el protocolo de funcionalización de la HA/vidrio, así como en el correspondiente al recubrimiento con fosfolípido, se calculó la cantidad de moléculas depositadas en la superficie para cubrir en exceso la superficie total de los portaobjetos de vidrio, con lo que en principio se obtiene una superficie funcionalizada infinita A_s por superficie de la partícula A_p . Esta gran proporción A_s/A_p abre la posibilidad de que una

cierta cantidad de HA no ligada se haya adsorbido a las partículas de PS. Como podemos calcular la masa neta promedio por partícula de HA adsorbida usando el valor ajustado de $lg=k_B T/mg$ para las partículas que se difunden por encima de la funcionalización HA y las partículas que se difunden por encima del vidrio sin funcionalizar, estimamos que $\sim 60,000$ moléculas de HA son adsorbidas, en promedio, en la superficie de cada partícula. Confirmamos la adsorción de HA en las partículas de PS realizando mediciones complementarias del potencial ζ de las partículas diluidas en agua y de las partículas incubadas con HA en solución (la concentración de HA libre utilizada aquí fue igual a la utilizada en el protocolo de funcionalización).

Tabla 1

Alturas medias experimentales, $\langle Z \rangle_{exp} = \sum Z P(z)$, y ajustes paramétricos a modelos potenciales. $\langle z \rangle_{Frej-Prieve}$ es la altura media calculada usando la ecuación de Frej y Prieve (4) para los potenciales electrostáticos y gravitacionales. El parámetro del potencial efectivo de la superficie Z_1 , la longitud de Debye-Hückel κ^{-1} y la longitud gravitatoria $lg=k_B T/mg$ se ajustaron utilizando la ecuación $(\phi(z)-\phi_0)/kBT=Z_1 \exp(-\kappa[z-a])+(z/lg)$.

	$\langle z \rangle_{exp}, \mu m$	$\langle z \rangle_{Frej-Prieve}, \mu m$	Z_1	$\kappa^{-1}, \mu m$	$lg, \mu m$
Partícula/vidrio	7.84	7.82	7.58	1.49	4.13
Partícula/Lípido B	6.65	6.5	7.74	0.86	4.0
Partícula/PLL-glut	5.3	5.53	5.36	0.61	3.79
Partícula/HA	4.39	4.17	7.17	0.76	2.08
Partícula/lípido A	2.75				2.61

La Fig. 6a muestra el potencial ζ de las partículas de PS diluidas en agua a diferentes valores de pH (círculos), el triángulo invertido representa, por otro lado, el valor de las partículas PS previamente incubadas en una solución de hialuronato. Mientras que las partículas desnudas tienen un potencial zeta de ~ -42 mV en $pH \sim 5.2$, las partículas preincubadas con HA alcanzaron un valor de -54 ± 5.2 mV al mismo pH. Para no dejar dudas de que las moléculas de hialuronato pueden adsorberse en las partículas hidrófilas de PS sin ninguna modificación química, también preincubamos partículas no fluorescentes (del mismo tamaño que las mencionadas anteriormente en el montaje experimental) con ácido hialurónico marcado con fluoresceína (F1177-Aldrich). La correspondiente imagen microscópica de la suspensión preincubada y seca se muestra en la Fig. 6b. Aquí podemos ver claramente que el perfil de brillo que rodea a las partículas confirma la adsorción de HA en las superficies de las partículas (la adsorción pasiva de HA en diferentes partes de la superficie ya ha sido previamente reportada) (19, 20, 31, 32). Hasta donde sabemos, ningún otro informe ha correlacionado la adsorción de macromoléculas en soportes brownianos con una disminución efectiva de la longitud gravitatoria (un aumento de peso) medida con técnicas ópticas (nótese que lg es particularmente sensible a un cambio en el radio de la partícula, Δa , desde $lg \sim a^{-3}$; nótese también que el Δa que acompaña al incremento de masa no cambiará la PSF siempre que el incremento de este radio de la partícula sea menor que la longitud de onda de la emisión de la partícula fluorescente, lo cual es típicamente el caso). Este resultado es particularmente relevante para la técnica óptica utilizada aquí, ya que la reconstrucción del movimiento tridimensional de las partículas utilizando la función de dispersión puntual nos permite seguir las esferas varios diámetros de partículas por encima de la pared; esto asegura que la pendiente de las curvas de los potenciales a largas

distancias sea un resultado legítimo de un aumento de la masa de la partícula y no un efecto combinado entre el peso de la partícula y un proceso de unión mediado, por ejemplo, por la formación de largos anclajes macromoleculares. En relación a esto, por ejemplo, Bevan y sus colaboradores observaron un aumento de la pendiente del potencial mientras estudiaban la interacción de partículas de 2,3 μm con diferentes paredes funcionalizadas (14, 15). Sin embargo, el aumento de la pendiente no se interpretó como un aumento del peso de la partícula sino como el resultado de la formación de anclajes macromoleculares entre la partícula y la pared. La expresión más simple para un anclaje macromolecular es la de un resorte Hookean o potencial cuadrático (14); nuestros datos de partículas/HA pueden, de hecho, ser ajustados asumiendo tal potencial cuadrático sin masa añadida a las partículas (el mismo lg que en el resto de los casos). Sin embargo, modelar los datos de potencial de interacción de esta manera sin asumir un aumento de la masa, da como resultado un valor de longitud de persistencia no físico de la molécula del ácido hialurónico en el agua ($\sim 2.8\text{mm}$ contra el valor teórico de $0.38\text{ }\mu\text{m}$); (33) por lo tanto, la pendiente observada en la Fig. 5 para los datos de partículas/HA a grandes distancias es un resultado legítimo de un aumento del peso de las partículas.

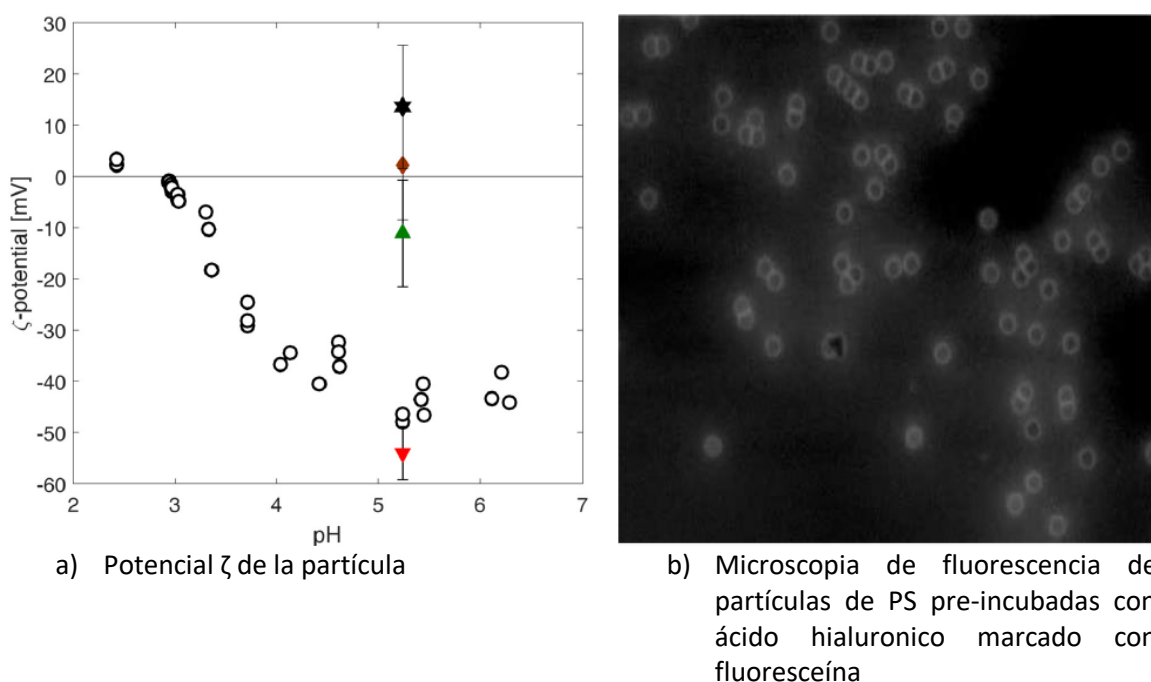


Figura 6. a) Potencial ζ de partículas de PS con o sin incubación previa con macromoléculas en solución a las mismas concentraciones que las empleadas en las funcionalizaciones de pared. Los círculos representan los valores de las partículas de PS disueltas en agua a diferentes valores de pH; triángulo invertido: valor de las partículas previamente incubadas con hialuronato; triángulo: valor de las partículas incubadas con PLL-glut; diamante: valor de las partículas incubadas con fosfolípidos; estrella: valor de las partículas incubadas con PLL. Las barras de error representan la desviación estándar. b) Imagen obtenida con el microscopio de fluorescencia de 1 μm partículas de poliestireno preincubadas con ácido hialurónico marcado con fluoresceína.

La tendencia observada en el sistema de partículas/lípidos grupo A fue de alguna manera similar a la descrita en las superficies recubiertas de hialurónico: el valor $\langle z \rangle_{exp}$ fue menor

que el valor de referencia de la partícula/vidrio, así como la correspondiente longitud gravitatoria (véase la Fig. 3 y la Tabla 1). En este caso, sin embargo, el potencial electrostático (repulsivo) estaba casi ausente en las interacciones entre las partículas y las paredes, por lo que el valor de $\langle z \rangle_{exp}$ era casi idéntico a la longitud gravitatoria correspondiente (2,75 frente a 2,61 μm , véase la Tabla 1). Haciendo el mismo cálculo que en el sistema de partículas/HA, es decir, calculando la masa añadida a partir del valor ajustado de la longitud gravitatoria después de restar la masa de las partículas desnudas, encontramos que $\sim 44 \times 10^6$ moléculas de DPPC se unieron, en promedio, a la superficie de cada partícula (considerando un peso molecular de ~ 800 g/mol). Este valor equivale a 133×10^{17} moléculas/ m^2 en términos del número de moléculas adsorbidas por superficie de las partículas. Sabiendo que cada molécula DPPC ocupa un área transversal de $\sim 76 \text{ \AA}^2$ al formar una monocapa lipídica, este valor también puede convertirse en un número equivalente de bicapas lipídicas que rodean la partícula, lo que en este caso arroja 5,0 bicapas equivalentes. Aquí confirmamos también la posible adsorción de lípidos en la superficie de las partículas midiendo el potencial ζ de las partículas suspendidas incubadas con lípidos en solución. El valor correspondiente ($-2,1 \pm 10,6$ mV) se representa en la Fig. 6a con un símbolo de diamante y corrobora, una vez más, que las partículas pueden adsorber lípidos y como consecuencia cambiar su potencial eléctrico superficial (la superficie de la partícula se vuelve casi eléctricamente neutra). La interacción de las partículas de tamaño micras con los fosfolípidos, o más precisamente, con las vesículas lipídicas, es un campo de investigación que ha recibido atención desde hace algún tiempo (34). Desde entonces se sabe que los lípidos se unen espontáneamente a partículas con movimiento Browniano de diferente composición y mediados por diferentes potenciales de interacción (35-38). Dependiendo de tales interacciones, el recubrimiento lipídico puede adquirir diferentes estructuras, pasando de una sola monocapa a la formación de multicapas y estructuras irregulares formadas alrededor de las partículas. Los primeros trabajos de Carmona-Riveiro y Herrington mencionan, por ejemplo, que una partícula de PS puede adsorber hasta $\sim 106 \times 10^{17}$ moléculas/ m^2 de DPPC. (34) Otros grupos de investigación también han observado, utilizando diferentes técnicas experimentales como la H1 NMR, ensayos químicos o análisis termogravimétrico, que la DPPC puede ser adsorbida en partículas de PS formando hasta cinco bicapas lipídicas en condiciones neutras [38]. Estas cifras coinciden bastante bien con los valores correspondientes obtenidos en este trabajo y nos animan a apoyar la hipótesis de que el descenso de la altura media es una consecuencia de una transferencia de masa intrínseca entre las paredes funcionalizadas y las partículas. Por otra parte, esto también indica que el protocolo de funcionalización utilizado para fijar covalentemente los fosfolípidos al vidrio no impidió que se produjera cierta transferencia de masa entre las partículas y la pared (la cantidad de masa obtenida por adsorción molecular es del orden de 60 fg/partícula; o, en términos del porcentaje de lípidos desprendidos de las superficies funcionalizadas, esto representa $\sim 0,2\%$ de la masa del lípido original depositado en la pared del vidrio). La estabilidad de las monocapas lipídicas es propensa a varios factores, entre ellos la eficiencia de cobertura de los lípidos en las

paredes de vidrio; esto, a su vez, puede controlarse variando la concentración inicial de lípidos en la solución, los disolventes empleados durante la funcionalización y la química utilizada para ligar los ácidos grasos en las superficies (39-41).

La división del sistema de partículas/lípidos en función de las diferencias en las distribuciones de probabilidad, como se ha propuesto anteriormente, también coincide con las distinciones en las masas de las partículas: el forma del potencial del Grupo A, cuyo mínimo está más cerca de la pared, reúne partículas con masas mayores que el valor medio encontrado en el Grupo B, cuyo potencial de interacción revela una repulsión no despreciable con la pared. Una posible explicación afín a estos datos experimentales es que la capa lipídica discontinua, que se ve en la imagen de AFM, promueve la transferencia de masa y, por lo tanto, la detección de cargas en algunas poblaciones de partículas, mientras que otras interactúan con áreas de vidrio no funcionalizadas o áreas con cargas lipídicas más bajas. Por último, el sistema PLL-glut también muestra un leve aumento de la masa de las partículas, pero no más allá del referencial 10% en la polidispersidad (las partículas suspendidas en una suspensión PLL seguida de la adición de glutaraldehído también cambia el potencial ζ de la partícula, ver Fig. 6a). Esto indica que la probabilidad de que una partícula se adsorba en el recubrimiento de PLL-glut es mayor que las posibilidades que tiene de desprenderse de él llevando macromoléculas adsorbidas en su superficie (las partículas se adsorben en la base sólida en lugar de ocurrir lo contrario: la adsorción de macromoléculas en la superficie de las partículas libres). Este intercambio entre la adsorción de las partículas y la adsorción de macromoléculas en las partículas debe considerarse en el diseño de sistemas de entrega de partículas.

Conclusiones

En este trabajo estudiamos la interacción de las partículas coloidales con las superficies complejas biológicamente relevantes en condiciones de baja fuerza iónica. Las trayectorias tridimensionales de las partículas se reconstruyeron utilizando la función de dispersión puntual de 1 μm partículas fluorescentes, lo que nos permitió explorar las alturas en un rango de varios diámetros de partículas por encima de la pared. El análisis posterior de las trayectorias de las partículas se consideró no trivial en el sentido de que las funciones de distribución de los eventos de una sola partícula pueden ser estadísticamente diferentes de las que se obtienen con el conjunto de partículas en su totalidad. Al analizar los eventos partícula por partícula y compararlos con el conjunto total promedio ponderado, pudimos distinguir diferentes comportamientos entre los estados de levitación y discriminar las partículas que de otra manera se adsorben en las superficies. Las máximas propiedades anti-adsorbentes se encontraron en las superficies funcionalizadas con ácido hialurónico seguidas de las superficies recubiertas de lípidos; en cambio, se observaron propiedades antiincrustantes deficientes en el recubrimiento PLL pasivado y en el vidrio desnudo. Una característica particularmente interesante observada en el sistema de partículas/lípidos fue que las partículas no mostraron detención del movimiento aunque algunas de ellas prácticamente tocaron la pared durante sus excursiones por encima del suelo (como se

muestra en el último gráfico de la Fig. 3). Varios informes han demostrado que grupos químicos como los contenidos en los fosfolípidos zwitteriónicos pueden reducir significativamente el arrastre o el factor de fricción entre dos superficies recubiertas mientras se mueven en estrecha proximidad (42,43). En nuestro caso, el movimiento de las micropartículas impulsadas por fuerzas térmicas también sugiere una reducción del arrastre hidrodinámico de la partícula mientras se mueve por encima de la pared. Otra observación relevante en los resultados mostrados anteriormente fue que la pasivación del PLL con glutaraldehído no impidió la adhesión o deposición de partículas a las bases sólidas. El glutaraldehído se añadió al revestimiento de poli-L-lisina porque forma una base de Schiff con los grupos de aminas de esta última, reduciendo la cantidad de cargas positivas y reduciendo así las atracciones electrostáticas con las partículas de poliestireno con carga negativa. La escasa estabilidad coloidal encontrada en este sistema (20%, la más baja encontrada entre todos los datos experimentales) indica que los grupos amínicos todavía están disponibles y pueden unirse a los grupos carboxílicos de las partículas. Unos resultados algo similares fueron observados por Swavola et al (15) al estudiar la interacción de las partículas cargadas negativamente con las bicapas de polielectrolito e indican una fuerte influencia de la microestructura y la distribución local de la carga en la estabilidad de las suspensiones coloidales cerca de los revestimientos de polielectrolito.

Las alturas medias de las partículas medidas en los sistemas de partículas/paredes se correlacionaron bastante bien con la teoría que sólo tiene en cuenta los términos de interacción gravitatoria y eléctrica de doble capa. Una importante contribución de nuestro estudio en relación con la literatura anterior consistió en demostrar que $\langle z \rangle$ también puede cambiar debido a las variaciones de la longitud gravitatoria, $l_g = k_B T / mg$, es decir, debido a la transferencia de masa entre las partículas y las paredes funcionalizadas. A diferencia de otros reportes que utilizan partículas relativamente masivas para muestrear pequeñas distancias de separación partículas /paredes ($O(100)$ nm), aquí pudimos distinguir los estados gravitatorios puros de las interacciones directas de partículas/paredes, incluida la formación de anclajes. De esta manera pudimos calcular el exceso de peso de las partículas debido al intercambio de masa con las paredes. En particular, el cálculo de la cantidad de fosfolípidos adsorbidos en las partículas de PS mediante técnicas ópticas concuerda bastante bien con otros estudios en los que la cantidad de lípidos adsorbidos se cuantificó mediante diferentes procedimientos como la 1H NMR, ensayos químicos o termogravimétricos. Por otra parte, la medición de la masa efectiva de las partículas a grandes distancias mediante la técnica actual también puede aclarar informes anteriores en los que se observaron distancias de separación anómalas (más pequeñas de lo esperado) entre las partículas y la pared a pesar de que ambas tenían el mismo signo en las cargas eléctricas (44).

En un contexto general, la técnica de videomicroscopía utilizada aquí en combinación con el tamaño de la partícula elegida permite el rastreo de esferas micro-tamaño a distancias de varios diámetros de partícula por encima de la pared, lo que hace que la determinación

de la longitud gravitatoria (peso de la partícula) sea más precisa. Por lo tanto, esta técnica puede utilizarse en combinación con otras técnicas (como la TIRM) que dan preferencia a la medición de los potenciales de interacción a distancias cortas de la pared.

Referencias

- [1] N.A. Frej, D.C. Prieve, Hindered diffusion of a single sphere very near a wall in a nonuniform force field, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 7552–7564.
- [2] M.A. Bevan, D.C. Prieve, Forces and hydrodynamic interactions between polystyrene surfaces with adsorbed peo-ppo-peo, *Langmuir* 16 (2000) 9274–9281.
- [3] H.-J. Wu, M.A. Bevan, Direct measurement of single and ensemble average particlesurface potential energy profiles, *Langmuir* 21 (2005) 1244–1254.
- [4] C. July, D. Kleshchanok, P.R. Lang, Depletion interactions caused by polydisperse, hard platelets, *Soft Matter* 7 (2011) 6444–6450.
- [5] P.F. Salipante, S.D. Hudson, A colloid model system for interfacial sorption kinetics, *Langmuir* 31 (2015) 3368–3376.
- [6] C.P. Royall, J. Dzubiella, M. Schmidt, A. van Blaaderen, Nonequilibrium sedimentation of colloids on the particle scale, *Phys. Rev. Lett.* 98 (2007) 188304–188314.
- [7] T.M. Squires, M.P. Brenner, Like-charge attraction and hydrodynamic interaction, *Phys. Rev. Lett.* 85 (2000) 4976–4979.
- [8] D. Beltran-Villegas, T. Edwards, M. Bevan, Self-consistent colloidal energy and diffusivity landscapes in macromolecular solutions, *Langmuir* 29 (2013) 12337–12341.
- [9] M. Bevan, S. Eichmann, Optical microscopy measurements of kt-scale colloidal interactions, *Curr. Opin. Colloid Interfaces* 16 (2011) 149–159.
- [10] J. Ball, N. Henry, R. Montelaro, M. Newman, A versatile synthetic peptide-based elisa for identifying antibody epitopes, *J. Immunol. Methods* 171 (1994) 37–44.
- [11] A.C.H. Coughlan, I. Torres-Diaz, H.A. Jerri, M.A. Bevan, Direct measurements of ktscale capsule–substrate interactions and deposition versus surfactants and polymer additives, *Appl. Mater. Interfaces* 10 (2018) 27444–27453.
- [12] T. Yanagishima, L.D. Michele, J. Kotar, E. Eiser, Diffusive behaviour of PLL-peg coated colloids on l-DNA brushes – tuning hydrophobicity, *Soft Matter* 8 (2012) 2792–2798.
- [13] Z. Wang, Y. Luan, T. Gan, X. Gong, H. Chen, T. Ngai, Long-range interactions between protein-coated particles and poegma bursh layers in a serum environment, *Colloids Surf. B* 150 (2017) 279–287.
- [14] S.L. Eichmann, G. Meric, J.C. Swavola, M.A. Bevan, Diffusing colloidal probes of protein–carbohydrate interactions, *Langmuir* 29 (2013) 2299–2310.
- [15] J.C. Swavola, T.D. Edwards, M.A. Bevan, Direct measurement of macromolecule coated colloid–mucus interactions, *Langmuir* 31 (2015) 9076–9085.
- [16] W.N. Everett, M.A. Bevan, kt-Scale interactions between supported lipid bilayers, *Soft Matter* 10 (2014) 332–342.
- [17] Y. Zhong, G. Wang, Three-dimensional heterogeneous structure formation on a supported lipid bilayer disclosed by single-particle tracking, *Langmuir* 34 (2018) 11857–11865.
- [18] S. Reitsma, D. Slaaf, H. Vink, M. van Zandvoort, M. oude Egbrink, The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualiation, *Eur. J. Physiol.* 454 (2007) 345–359.

- [19] M. Morra, Engineering of biomaterials surfaces by hyaluronan, *Biomacromolecules* 6 (2005) 1205–1223.
- [20] K.Y. Suh, J.M. Yang, A. Khademhosseini, D. Berry, T.-N.T. Tran, H. Park, R. Langer, Characterization of chemisorbed hyaluronic acid directly immobilized on solid substrates, *J. Biomed. Mater. Res. B* 72 (2005) 292–298.
- [21] H. Egbert, J. Koninkx, J. van Dijk, J. Mouwen, Biological and pathobiological aspects of the glycocalyx of the small intestinal epithelium. A review, *Vet. Q.* 4 (1984) 186–199.
- [22] M.G. Petroff, E.A. Garcia, M. Herrera-Alonso, M.A. Bevan, Ionic strength-dependent interactions and dimensions of adsorbed zwitterionic copolymers, *Langmuir* 35 (2019) 4976–4985.
- [23] X. Chen, R.P. Richter, Effect of calcium ions and pH on the morphology and mechanical properties of hyaluronan brushes, *Interface Focus* 9 (2019) 20180061.
- [24] X. Chen, R. Tume, X. Xu, G. Zhou, Solubilization of myofibrillar proteins in water or low ionic strength media: classical techniques, basic principles, and novel functionalities, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57 (2017) 3260–3280.
- [25] L. Dickinson, C. Ho, G. Wang, K. Stebe, S. Gerecht, Functional surfaces for high-resolution analysis of cancer cell interactions on exogenous hyaluronic acid, *Biomaterials* 31 (2010) 5472–5478.
- [26] M.D. Carbajal-Tinoco, R. Lopez-Fernández, J.L. Arauz-Lara, Asymmetry in colloidal diffusion near a rigid wall, *Phys. Rev. Lett.* 99 (2007) 138303.
- [27] J. Park, C. Choi, K. Kihm, Temperature measurement for a nanoparticle suspension by detecting the Brownian motion using optical serial sectioning microscopy (OSSM), *Meas. Sci. Technol.* 16 (2005) 1418–1429.
- [28] J.C. Crocker, D.G. Grier, Methods of digital video microscopy for colloidal studies, *J. Colloid Interface Sci.* 179 (1996) 298–310.
- [29] J.C. Crocker, D.G. Grier, When like charges attract: The effects of geometrical confinement on long-range colloidal interactions, *Phys. Rev. Lett.* 77 (1996) 1897–1900.
- [30] Y.L. Lüthi, J. Ricka, M. Borkovec, Colloidal particles at water–glass interface: deposition kinetics and surface heterogeneity, *J. Colloid Interface Sci.* 206 (1998) 314–321.
- [31] K. Suh, A. Khademhosseini, J.M. Yang, G. Eng, R. Langer, Soft lithography patterning of hyaluronic acid on hydrophilic substrates using molding printing, *Adv. Mater.* 16 (2004) 584–588.
- [32] J. Choi, S. Kim, E. Linardy, E. Dreaden, V. Zhdanov, P. Hammond, N. Cho, Adsorption of hyaluronic acid on solid supports: Role of pH and surface chemistry in thin film self-assembly, *J. Colloid Interface Sci.* 448 (2015) 197–207.
- [33] E. Buhler, F. Boué, Chain persistence length and structure in hyaluronic solutions: ionic strength dependence for a model semirigid polyelectrolyte, *Macromolecules* 37 (2004) 1600–1610.
- [34] A. Carmona-Riberio, T. Herrington, Phospholipid adsorption onto polystyrene microspheres, *J. Colloid Interface Sci.* 156 (1993) 19–23.
- [35] S. Moya, E. Donath, G.B. Sukhorukov, M. Auch, H. Bäuml, H. Lichtenfeld, H. Möhwald, Lipid coating on polyelectrolyte surface modified colloidal particles and polyelectrolyte capsules, *Macromolecules* 33 (2000) 4538–4544.

- [36] A.-L. Troutier, L. Véron, T. Delair, C. Pichot, C. Ladavière, New insights into selforganization of a model lipid mixture and quantification of its adsorption on spherical polymer particles, *Langmuir* 21 (2005) 9901–9910.
- [37] A.-L. Troutier, C. Ladavière, An overview of lipid membrane supported by colloidal particles, *Adv. Colloid Interfaces* 133 (2007) 1–21.
- [38] J. Thevenot, A.-L. Troutier, J.-L. Putaux, T. Delair, C. Ladavière, Effect of the polymer nature on the structural organization of lipid/polymer particle assemblies, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 12822–13812.
- [39] H. Schönherr, J.M. Johnson, P. Lenz, C.W. Frank, S.G. Boxer, Vesicle adsorption and lipid bilayer formation on glass studied by atomic force microscopy, *Langmuir* 20 (2004) 11600–11606.
- [40] P. Pallavicini, G. Dacarro, M. Galli, M. Patrini, Spectroscopic evaluation of surface functionalization efficiency in the preparation of mercaptopropyltrimethoxysilane self-assembled monolayers on glass, *J. Colloid Interface Sci.* 332 (2009) 432–438.
- [41] K. Kim, C. Kim, Y. Byun, Biostability and biocompatibility of a surface-grafted phospholipid monolayer on a solid substrate, *Biomaterials* 25 (2004) 33–41.
- [42] M. Kobayashi, A. Takahara, Tribological properties of hydrophilic polymer brushes under wet conditions, *Chem. Rec.* 10 (2010) 208–216.
- [43] O. Tairy, N. Kampf, M.J. Driver, S.P. Armes, J.D. Klein, Highly hydrated polymer brushes via modified atom-transfer-radical-polymerization: structure, surface interactions, and frictional dissipation, *Macromolecules* 48 (2015) 140–151.
- [44] T. Muramoto, K. Ito, H. Kitano, Gathering of charged colloidal particles near a likecharged glass plate, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 3592–3595.