ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL DA USC

Vicente
Domínguez Arca

Tese de doutoramento

Autoagregación de tensioactivos catiónicos gemini e a súa incorporación a formulacións de nanovesículas

Santiago de Compostela, 2022

Programa de Doutoramento en Ciencia de Materiais

TESE DE DOUTORAMENTO

AUTOAGREGACIÓN DE TENSIOACTIVOS CATIÓNICOS GEMINI E A SÚA INCORPORACIÓN EN FORMULACIÓNS DE NANOVESÍCULAS

Vicente Domínguez Arca

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL DA UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN CIENCIA DE MATERIAIS

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2022

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DO AUTOR/A DA TESE

D./Dna. **Vicente Domínguez Arca**

Título da tese: **Autoagregación de tensioactivos catiónicos gemini e a súa incorporación en formulacións de nanovesículas**

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
2) De ser o caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
3) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.
4) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide a versión impresa coa presentada en formato electrónico

E comprométome a presentar o Compromiso Documental de Supervisión no caso de que o orixinal non estea na Escola.

En **Santiago de Compostela**, **03 de marzo de 2022**.

Sinatura electrónica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR / TITOR DA TESE

[Autoagregación de tensioactivos catiónicos "gemini" e a súa incorporación en formulacións de nanovesículas]

D./Dna. Gerardo Prieto Estévez
(Se hai máis dun director/a, duplique este parágrafo)

INFORMA/N:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D/Dna**. Vicente Domínguez Arca**, baixo a miña dirección/titorización, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

De acordo co indicado no Regulamento de Estudos de Doutoramento, declara tamén que a presente tese de doutoramento é idónea para ser defendida en base á modalidade de Monográfica con reprodución de publicacións, nos que a participación do/a doutorando/a foi decisiva para a súa elaboración e as publicacións se axustan ao Plan de Investigación.

En Santiago de Compostela, 2 de Marzo de 2022

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Abstract

Self-assembling of cationic gemini surfactants and its incorporation on nanovesicles formulations

---

Vicente Domínguez Arca

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Vicente Domínguez Arca

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

The supramolecular field raises a reality that, from the point of view of physics, could be categorized as that of interacting systems in weak coupling. This approach at the nano and sub-micro scales is a gateway, in the author's opinion, very suitable for getting into soft matter physics. The nature of this physics lies in its complexity of parameterization, its significant questions, and its versatility and multidisciplinarity. One of the fields in which we find its presence in recent times is nanobiotechnology, an immense field of work in which this and other traditional disciplines converge - biology, medicine, chemistry or mathematics - which is experiencing more and more attention and success. We find in these confluences a magnificent symbiosis: biophysics. This discipline is called to be a space in science with the ability to work on problems and experimental data that would currently represent, significant advances of humanity. Of all the phenomenologies observed in systems of biophysical interest, self-assembly of supramolecular systems turns out to be a common element in countless biophysical processes. Starting from this common position, the author will try to present different results and applications of molecular self-aggregation systems in this doctoral thesis.

As a first step in the study, it was decided to characterize the self-aggregation of dimeric Gemini surfactants derived from tetradecyltrimethylammonium bromide ($C_{14}TAB$). To this end, a proposal for modelling the dynamic surface tension recorded with a pending drop tensiometer was put forward. Also, using an isothermal titration calorimeter (ITC), it was possible to analyze the demicelization of the chosen surfactants and propose an alternative criterion for the determination of the critical micellar concentration (CMC). These results were, in part and substantially, collected in an article published in the *Journal of Molecular Liquids*. Briefly, dynamic surface tension isotherms, for concentrations below CMC, were analyzed from the implementation of a model combining diffusion and adsorption. The diffusion of surfactants inside the droplet was parameterized with the analytical solution of a heat equation (Fick's diffusion law). As for the incorporation of surfactants into the surface, an adsorption model (Frumkin isotherm) was used that considers the lateral interaction between the adsorbate molecules (gemini

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

surfactant). Finally, a variational relationship between the concentration in the vicinity of the interface and the surface tension has been proposed to complete the mathematical tools that allow the analysis of dynamic stress isotherms. After studying the adsorption at the air/water interface, ITC demicelization measures were used to show the CMC and the different equilibrium regimes in an isothermal titration process. Thus, in addition to identifying the micellar rupture zone below the CMC and the thermodynamic stabilization zone of the micelles above the CMC, an exothermic component was located in the micellar rupture phase associated with a water clustering phenomenon in the vicinity of the broad hydrophobic regions of gemini surfactants. Experiments on demicelization by ITC were performed at different temperatures, verifying classical behaviors in the variation of CMC with temperature and finding the existence of compensation phenomena between enthalpy and entropy in demicelization processes. In this way, a detailed discussion was made on the nature of the different types of energy in demicelization according to the temperature used in the degree process. Thus, it was possible to explain phenomena such as endothermic to exothermic energy flow in the micelle rupture regime.

Two were the techniques used, in detail, in this first study. On the one hand, the pending drop tensiometer, a device optimized to hold a drop of liquid through two coaxial tubes. The droplet formation process is controlled by a titration pump accurately in the sub-microliter. The surface tension information is obtained by applying a mathematical model that analyzes the contour of the droplet, recorded with a camera. A software applies the method of analysis of the perimeter of the drop in real-time, recording the values of surface tension over time, as required by the user depending on the system's behaviour. Also, the drop is generated inside a transparent cell that allows to maintain the liquid-vapour balance with the drop and, at the same time, thermostatize the environment of the drop, thus enabling temperature control in the measurement experiment. On the other hand, the isothermal titration calorimeter is a device that measures the flow of heat between a reference cell and a sample cell in which a titration process is taking place. Due to the titration of a reaction catalyst, the interaction phenomena that occur in the sample

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

cell are recorded by measuring the heat flow between the sample cell and the reference cell, which are also thermostated. A thermocouple-based feedback and compensation device is responsible for recording these heat flows. In this situation, what is titrated is a highly concentrated sample of surfactant in a sample cell full of water. The phenomenon of micellization is subject to the thermodynamic variable of the concentration, and, through consecutive titrations, the concentration of surfactant in the sample cell is increasing. Thus, at first, the recorded heat flux reports demicelization, only to record the micelle dispersion once the CMC is exceeded in the sample cell. All the titration experience is subjected to the forced and constant thermalization of the reference cell and the sample cell. However, the device will also allow to vary this temperature to set different values of the same, so it was possible to analyze the demicelization process at different temperatures for the same system.

After the study and characterization of the interfacial adsorption properties of gemini surfactants and their micellization, the incorporation of gemini surfactants into lipid bilayers was characterized. On the one hand, the motivation is to analyze the adsorption by changing the air/water interface for a lipid interface; and, on the other hand, to guide the applications derived from the properties of gemini surfactants to the field of nanobiotechnology. The biomimetic and bioapplicability characteristics of lipid bilayers are widely known and reported. Here, different analysis of results showing efficient incorporation of gemini surfactants into the lipid bilayer is presented, and the different characteristics that are imprinted or modified by such insertion or doping are examined in detail.

The lipid bilayer is a phase of self-aggregation that occurs between amphiphilic molecules of a lipidic nature and which differs from the micelle in that there is a break in symmetry. If in the micelle there is certain isotropy in the distribution of amphiphilic molecules with respect to a centre, in the lipid bilayer there is an anisotropic conformation in which the molecules are distributed along a plane, in two layers in opposite directions. This particular form of self-aggregation, with a thermodynamically similar origin to micellization, represents something as crucial as the first steps in the catalysis of biological

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

systems. This mode of arrangement is what can be found, in general, in the structure of cell membranes of all the primitive biological systems of the realms of nature. More specifically, at present, the application of the generated lipid bilayers *in vitro* has clear applicability in liposomes.

Liposomes are vesicular structures formed by closed lipid bilayers, and their possibilities are enormous and will be explained in some detail throughout the text. Briefly, liposomes can be used as primitive cell models, as pharmacological transport and release systems, as biosurface functionalizing agents, or as very useful tools in lipoplexing in gene therapies and vaccine technology. In these directions, it is decided to take advantage of the surface activity of gemini surfactants and, including them in the lipid bilayer, to confer properties to liposomes that may be useful in the mentioned fields of applicability.

Using differential scanning calorimetry (DSC), the incorporation of gemini surfactants into the lipid bilayer was probed. Examining the variation of the transition temperature of the different conformational phases of the membrane, it was possible to conclude the role of surfactants in the lipid bilayer due to the variation of their concentration and morphology -varying the length of the gemini spacer-. Transition temperature reflects a property of the membrane that has to do with the distribution of the symmetry of the hydrocarbon chains of lipids. In this sense, a phase transition model based on the Ising paradigm is proposed to explain the rol and incorporation of the surfactant into the membrane.

Molecular dynamics simulations were performed for the same purpose. Thus, from a molecular point of view, it was possible to determine the different adaptation pathways in the membrane and the different positionings and implications of gemini surfactants in the lipid bilayer by varying their spacer. One of the fundamental variations found by molecular dynamics was the changes in the polarity and electrostatics of the membrane, these being observed and quantified by the technique of elastic and dynamic light scattering (DLS) and application of electric potentials. This determined the relationship between the adsorption of gemini surfactants on the lipid bilayer and changes in the elec-

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

trostatic behaviour of liposomes, which resulted in greater colloidal stability even at tiny concentrations of geminit surfactant added to a concentration of lipid.

In this second study, we used three experimental techniques to complete the conclusions and modeling of the adsorption of gemini surfactants on the lipid bilayer. The DSC technique examines the heat flow between a sample cell and a reference cell connected to the same thermostatic bath that is varied by following a controlled temperature ramp. Thus, any difference in the heat response of the sample cell to the reference cell will be recorded by a particular implementation of thermocouples between the two cells. In the case of the lipid bilayers studied, there is a divergence in the heat response observed by a representative peak at a specific temperature. This signal contains valuable information on the transition between different conformational phases in the membrane, which will be subjected to a detailed study and detail.

Also, the *in silico* technique of molecular dynamics was used to obtain information and draw conclusions from the doping of lipid bilayers with gemini surfactants. Thus, computational routines, based on molecular dynamics in the GROMACS programming environment, were used to obtain simulation trajectories during dynamic times on the nanosecond scale. Briefly, computational molecular dynamics solves the equations of motion of parameterized molecules in specific force fields from electrostatic information — i.e. Coulomb- and multipolar -i.e. Lennard-Jones- of the various components of the systems. Similarly, the dynamic light scattering (DLS) was used to measure the self-diffusion coefficient and thus the hydrodynamic emberging of liposomes. The coupling of electric fields to DLS also made it possible to measure the electrostatic characteristics of liposomes by analyzing the variation of electrophoretic mobility.

In order to go deeper into the ability to act on the lipid bilayer, results of its interaction with a cationic polymer based on primary, secondary and tertiary amines: polyethyleneimine (PEI) will also be shown. The remarkable ability of this polymer in the lipid bilayer is to generate stable pores that allow water to diffuse throught membrane. This phenomenon has been used to hypothesize the PEI's role as an adjunct in

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

transporting complexes based on DNA polyplexed. Accumulation of PEI was observed in the perinuclear region, of HeLa cells, by confocal fluorescence microscopy. DMPC monolayers were initially used as a nuclear membrane model. Langmuir's balance experiments demonstrated the ability of the PEI to interact with the DMPC. Subsequently, a more evolved membrane model, the lipid bilayer, was used to study the interaction of PEI with liposomes by differential scanning calorimetry and induced release assays measured by carboxyfluorescein fluorescence. Finally, results of molecular dynamics simulations experiments were shown to present details of the dynamics of pore formation in the lipid bilayer induced by PEI.

A third study was articulated by presenting different nanobiotechnological applications using liposomes doped with gemini surfactants. The gemini surfactants' presence confers positive electrostatic properties to the liposomes, which will be taken into account in the following thesis stages. Once the dynamics of insertion and the conferred properties have been tested, a step further in the system's control is considered. In this sense, different results published in journals such as the *Materials Science and Engineering: C* are shown and completed throughout the text. Such an evolution is to propose a supraliposomal system that allows the electrostatic characteristics of liposomes to study their interaction with surfaces. Thus, a system formed by the configuration of a polyelectrolytic substrate, based on the *layer-by-layer* technique was developed, and the intact incorporation of liposomes into this substrate was shown.

The efficiency in loading and releasing low-solubility molecules has also been proven. As the study of the system progressed, the characteristics of the evolution and cellular interaction of a particular lineage of cells in contact with substrates formed by adsorbed liposomes and buried liposomes were observed. The nature of these polymeric substrates could also be made compatible with systems that mimicked extracellular environments. Thus, different conclusions in the process of cellular communication via extracellular vesicles - represented by liposomes - could be obtained.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Continuing in the progression of the systems' complexity in which these liposomes

were used, the adsorption of liposomes to pseudo-three-dimensional systems based on hydrogels was studied and monitored after studying their incorporation into two-dimensional systems. The intention is to use the properties and characteristics of a certain type of hydrogel formed from hyaluronic acid - a negatively charged glycosaminoglycan - to build a surface scaffold that allows the adsorption of cationic liposomes and thus develop a platform to create a determined environment of cell proliferation and differentiation. Thus, the efficient adsorption of liposomes in these hydrogel structures was verified. The drug encapsulation and release that may act as a differentiating factor in mesenchymal cells has also been tested and monitored. Similarly, cytotoxicity measurements were performed using the cationic liposomes, all in different cell lines. These processes of increasing the complexity of the systems used were performed using different techniques.

Efficient incorporation of liposomes doped with the surfactant gemini was monitored using the dissipation-measured quartz crystal microbalance (QCM-D) technique. This technique is based on the piezoelectric effect of quartz. This material responds in a certain way by reflecting specific frequencies before applying longitudinal waves. Quartz is functionalized with a gold substrate, which will be modified first with consecutive layers of polyelectrolyte -i.e. poly-L-lysine and hyaluronic acid- and subsequently adsorbing intact cationic liposomes. The ability to store a hydrophobic molecule, as a pharmacological model, was tested using DSC, observing the effects on the transition temperature that are conferred to the bilayer of the liposome by the presence of the model molecule. Encapsulation efficiency and controlled release capacity were determined with dialysis experiments. Detailed specifications and procedures will be explained in detail throughout the text. Exposure to osmotic pressure gradients and different temperatures made it possible to observe the different release regimes in various systems configurations -i.e. liposomes adsorbed to polyelectrolytic substrates or embedded liposomes-. The observed differences between adsorption or incrustation of cationic liposomes in polymeric substrates were also raised in the context of contact with a cell line. MDA-MB-231 breast cancer cells were incubated on different substrates formed as previously described and analyzed with con-

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

focal microscopy techniques with fluorescence recording coupling. This technique made it possible to observe the adhesion and proliferation of the cells by observing changes in their morphology and fixation in the substrate with the incubation time.

As a second application involving the cationic liposomes, the incorporation of liposomes into hydrogel matrices was probed. This fact was observed using DSC, checking for changes in the conformational transition of the lipid bilayer between colloidal dispersion of liposomes or their adsorption to an interface. The dexamethasone molecule, as a differentiation factor of mesenchymal stem cell, was encapsulated on the cationic liposomes. The efficiency of encapsulation and release of a hydrophobic molecule - dexamethasone - was tested by dialysis experiments and quantified by spectrophotometry coupled to a high-performance liquid chromatography (HPLC-UV) column. The cytotoxicity of gemini doped and dexamethasone-loaded liposomes was evaluated using mesenchymal cells. Taking advantage of the usefulness of dexamethasone as a differentiating factor in osteoblasts of mesenchymal cells, *in vitro* differentiation experiments were performed.

In a necessarily descriptive way, a chapter will also be added in which the main experimental techniques and procedures used in the experiments with reported results will be shown. In summary, the methods used were differential scanning calorimetry and isothermal titration, slope drop tensiometry, quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, absorption and fluorescence spectrophotometry, dynamic light scattering and simulated molecular dynamics. Also, different experimental procedures, such as dialysis, were made to analyse osmotic pressure drug release profiles. Similarly, extrusion is a high-pressure process in which a dispersion of multilamellar liposomes is forced through a membrane of a given porosity, thus reducing the size and polydispersity of the liposomes. The methodology of liposome synthesis and formulation was assisted by the technique of organic phase roto-evaporation at low pressures and controlled temperature.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

In general, the most important conclusions drawn from the results obtained and reported during the text are those related to the properties of physicochemical characteristics that the surfactant gemini implies in its incorporation in the lipid bilayer. Such

properties are rapid and efficient electrostatic stabilization, which translates into excellent colloidal stabilization of liposomes doped with gemini surfactant. The main advantage is the tiny amount needed to achieve such a benefit in this sense. More interesting results are those related to samples of the intact incorporation of cationic liposomes into polymeric substrates and their ability in the encapsulation and drug release efficiency. The low cytotoxicity and inferred biocompatibility in cell viability experiments is a result that supports the applicability of these liposomes at the biotechnological level. These overly summarized conclusions, along with the other results shown in the text, present a colloidal system based on liposomes with potential applications in nanobiotechnology; from their use as a model of membranes or extracellular vesicle systems to their use in gene therapies, in controlled release and transport systems, or vaccine technology.

Finally, part of the work was carried out in the Biophysics and Interfaces Group of the Department of Applied Physics of the University of Santiago de Compostela. Another important part was developed in the Colloid and Polymer Physics Group of the Particle Physics department of the same university. Similarly, procedures related to the use of quartz crystal microbalance, polymeric polyelectrolyte *layer-to-layer* techniques, and cellular experiments with substrate interactions were experiments performed in a research stay at the *Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics Research Group* (i3Bs) from the University of Minho (Portugal). In a parallel, complementary and alternative way, during the work and experimentation of the results compiled in this text, a significant amount of collaborations and scientific work were carried out and supported by this author. In the case of topics related to Soft Matter Physics and nanobiotechnology, the results or procedures used in such work will be cited when necessary because they are considered not only transversal but complementary in practice to everything covered in this thesis.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Resumo

Autoagregación de tensioactivos catiónicos gemini e a súa incorporación en formulacións de nanovesículas

Vicente Domínguez Arca

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

O ámbito supramolecular plantexa unha realidade que, dende o punto de vista da física, podería ser catalogada como a de sistemas interaccionantes en acoplamento débil. Este xeito de plantexar os escenarios nas escalas nano e sub-micro resulta unha porta de entrada, na opinión do autor, moi axeitada, para introducirse na física da materia branda. Na natureza desta física reside a súa complexidade de parametrización, os seus grandes interrogantes e tamén a súa versatilidade e multidisciplinariedade. Un dos eidos nos que atopamos a súa presenza nos tempos recentes é na nanobiotecnoloxía, un inmenso campo de traballo no que conflúen esta e outras disciplinas tradicionais -bioloxía, medicina, química ou matemáticas- e que cada vez máis atencións e éxitos está experimentando. Atopamos nestas confluencias unha magnífica simbiose: a biofísica. Disciplina por dereito e resultado propio, chamada a ser un espazo na ciencia con capacidade para traballar en problemas e datos experimentais que actualmente representarían, en solución, grandes avances da humanidade. De todas as fenomenoloxías que se poden observar en sistemas de interese biofísico, a autoensamblaxe na configuración de sistemas supramoleculares resulta ser un elemento común en infinidade de procesos biofísicos. Partindo desta posición común, o autor tentará nesta tese doutoral presentar diferentes resultados e aplicacións de sistemas de autoagregación molecular.

Como primeiro paso a estudar, decidiuse caracterizar a autoagregación de surfactantes diméricos gemini derivados do bromuro de tetradeciltrimetilamonio ($C_{14}TAB$). Con ese fin, levouse adiante unha proposta de modelización da tensión superficial dinámica rexistrada cun tensiómetro de gota pendente. Tamén, empregando un calorímetro de titulación isotérmica (ITC) púidose analizar a demicelización dos surfactantes elixidos e propoñer un criterio alternativo para a determinación da concentración micelar crítica (CMC). Estes resultados foron en parte e substancialmente, recollidos nun artigo publicado na revista *Journal of Molecular Liquids*. Brevemente, as isotermas de tensión superficial dinámica, para concentracións por debaixo da CMC, foron analizadas a partires da implementación dun modelo combinando difusión e adsorción. A difusión dos surfactantes no interior da gota foi parametrizada coa solución analítica dunha ecuación de calor (lei de difusión de

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Fick). En canto á incorporación dos surfactantes á superficie empregouse un modelo de adsorción que ten conta da posible interacción lateral entre as moléculas do adsorbato -surfactante gemini-, tal foi a isoterma de Frumkin. Por último, unha relación variacional entre a concentración nas inmediacións da interfase e a tensión superficial foi proposta co fin de completar as ferramentas matemáticas que permiten analizar as isotermas de tensión dinámica. Logo do estudo da adsorción na interfase aire/agua, empregáronse as medidas da demicelización por ITC co fin de mostrar a CMC e os diferentes réximes de equilibrio nun proceso de titulación isotérmica. Deste xeito, ademais de identificar a zona de rotura micelar por debaixo da CMC e a zona de estabilización termodinámica das micelas por riba da CMC, localizouse unha compoñente exotérmica na fase de rotura micelar que se asociou a un fenómeno de clusterización da auga na contorna das amplas rexións hidrofóbicas dos surfactantes gemini. As experiencias de demicelización por ITC foron feitas a distintas temperaturas, verificando comportamentos clásicos na variación da CMC coa temperatura e constatando a existencia de fenómenos de compensación entre a entalpía e a entropía nos procesos de demicelización. Deste xeito, realizouse unha pormenorizada reflexión da natureza dos distintos tipos de enerxía na demicelización atendendo á temperatura empregada no proceso das titulacións. Así foi posible explicar fenómenos como o cambio de fluxo enerxético endotérmico a exotérmico no réxime de rotura micelar.

Dúas foron as técnicas empregadas, en detalle, neste primeiro bloque. Por unha banda o tensiómetro de gota pendente, un dispositivo optimizado para titular, mediante dous condutos coaxiais, unha gota de líquido. O proceso de formación da gota é controlado por unha bomba tituladora con precisión no sub-microlitro, e a información da tensión superficial é obtida mediante a aplicación dun modelo matemático que analiza o contorno da gota, rexistrado con unha cámara que forma parte do dispositivo. Un software vai aplicando o método de análise do perímetro da gota en tempo real, rexistrando os valores de tensión superficial co tempo, segundo foi requirido polo usuario en función do comportamento do sistema. Tamén, a gota esta xerada no interior dunha celda transparente que permite manter o equilibrio líquido-vapor coa gota e, ao mesmo tempo, termostatizar a

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

contorna da gota, posibilitando así o control da temperatura na experiencia de medida. Por outra banda, o calorímetro de titulación isotérmica é un dispositivo baseado na medida do fluxo de calor entre unha celda referencia e unha celda mostra na que un proceso de titulación está a acontecer. Os fenómenos de interacción que acontezan na celda mostra, debido á titulación de un catalizador de reacción, son rexistrados mediante a medición do fluxo de calor entre a celda mostra e a celda referencia, que se encontran igualmente termostatizadas. Un dispositivo de retroalimentación e compensación baseado en termopares é o encargado de rexistrar eses fluxos de calor. Nesta situación, o que se titula é unha mostra altamente concentrada de surfactante nunha celda mostra na que hai auga. O fenómeno da micelización está sometido á variable termodinámica da concentración e, mediante consecutivas titulacións, a concentración de surfactante na celda mostra vai incrementando. Así, ao principio o fluxo de calor rexistrado informa da demicelización, para pasar a rexistrar só a dispersión de micelas unha vez que a CMC é superada na celda mostra. Toda a experiencia de titulación está sometida á termalización forzada e constante da celda referencia e da celda mostra, aínda que o dispositivo tamén permitirá variar está temperatura para fixar distintos valores da mesma, así púidose analizar o proceso de demicelización a distintas temperaturas para un mesmo sistema.

Logo do estudo e caracterización das propiedades de adsorción interfacial dos sufactantes gemini e da súa micelización, procédese á caracterización da incorporación dos surfactantes gemini en bicapas lipídicas. A motivación é, por unha parte analizar a adsorción cambiando a interfase aire/auga por unha interfase lipídica; e por outra banda, orientar as aplicacións derivadas das propiedades dos surfactantes gemini ao terreno da nanobiotecnoloxía. As características de biomímese e bioaplicabilidade das bicapas lipídicas son amplamente coñecidas e reportadas. Aquí, preséntanse diferentes análises de resultados que mostran unha incorporación eficiente dos surfactantes gemini á bicapa lipídica, e examínanse con detalle as diferentes características que se lle imprimen ou modifican mediante esa inserción ou dopaxe.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

A bicapa lipídica é unha fase de autoagregación que se atopa entre moléculas anfifíli-

cas de carácter lipídico, e que se diferencia da micela en que se da unha ruptura de simetría con respecto a esta. Si na micela existe unha determinada isotropía na distribución das moléculas anfifílicas respecto dun centro, na bicapa lipídica dáse unha conformación anisotrópica na que as moléculas se distribúen ao largo dun plano -i.e. XY- e se conforman en dirección normal a el -i.e. Z- en dúas capas en sentidos opostos. Esta determinada forma de autoagregación, cunha orixe termodinamicamente similar á micelización, representa algo tan crucial como os primeiros pasos na catalización de sistemas biolóxicos, pois este modo de ordenación é o que se pode atopar, con carácter xeral, na estrutura das membranas celulares de todos os sistemas biolóxicos primitivos dos reinos da natureza. Dun xeito máis concreto, na actualidade, a aplicación das bicapas lipídicas xeradas *in vitro* ten unha manifesta aplicabilidade nos liposomas

Os liposomas son estruturas vesiculares formadas por bicapas lipídicas cerradas, e as súas posibilidades son inxentes e serán explicadas con determinado detalle ao longo do texto. Brevemente, os liposomas poden ser empregados como modelos primitivos de célula, como sistemas de transporte e liberación farmacolóxica, como axentes de funcionalización de biosuperficies ou como ferramentas moi oportunas no lipoplexado en terapias xénicas e na tecnoloxía de vacinas. Nestas direccións, decídese tomar vantaxe da actividade superficial dos surfactantes gemini e, incluíndoos na bicapa lipídica, conferirlle propiedades aos liposomas que poidan resultar útiles nos mencionados eidos de aplicabilidade.

A incorporación na bicapa lipídica dos surfactantes gemini probouse mediante a calorimetría diferencial de varrido (DSC). Examinando a variación da temperatura de transición das distintas fases conformacionais da membrana, púidose concluír o papel dos surfactantes na bicapa lipídica debido á variación da súa concentración e da súa morfoloxía -variando a longura do espazador do gemini-. A temperatura de transición reflexa unha propiedade da membrana que ten que ver coa distribución da simetría das cadeas hidrocarbonadas dos lípidos. Neste sentido proponse un modelo de transicion de fase baseado no paradigma de Ising, para poder explicar a incorporación do surfactante na membrana, e o seu rol.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Co mesmo fin foron realizados experimentos de dinámica molecular. Así puidéronse determinar, dende un punto de vista molecular, as diferentes vías de adaptación na membrana e os diferentes posicionamentos e implicacións dos surfactantes gemini na bicapa lipídica ao variar o seu espazador. Unha das variacións fundamentais atopadas por dinámica molecular foron os cambios sobre a polaridade e electrostática da membrana, sendo estes observados e cuantificados mediante a técnica de dispersión elástica e dinámica de luz (DLS) e aplicación de potenciais eléctricos. Deste xeito determinouse a relación entre a adsorción dos surfactantes gemini na bicapa lipídica e os cambios no comportamento electrostático dos liposomas, o que se traduciu nunha maior estabilidade coloidal incluso a concentracións moi pequenas de surfactante gemini, respecto da concentración de lípido.

Neste segundo bloque empregáronse fundamentalmente tres técnicas experimentais para completar as conclusións e modelización da adsorción dos surfactantes gemini na bicapa lipídica. A técnica do DSC baséase en examinar o fluxo de calor entre unha celda mostra e unha celda referencia conectadas a un mesmo baño termostático que se fai variar seguindo unha rampa de temperatura controlada. Deste xeito, calquera diferencia na resposta calorífica da celda mostra respecto da celda referencia vai ser rexistrada mediante unha determinada implementación de termopares entre as dúas celdas. No caso das bicapas lipídicas estudadas, existe unha diverxencia na resposta calorífica observada mediante a presencia dun pico representativo a unha determinada temperatura. Este sinal garda unha información valiosa da transición entre diferentes fases conformacionais na membrana que será sometida a un pormenorizado estudo e detalle.

Tamén, a técnica *in silico* da dinámica molecular foi empregada para obter información e tirar conclusións da dopaxe de bicapas lipídicas con surfactantes gemini. Deste xeito, rutinas computacionais, baseadas en dinámica molecular no entorno de programación GROMACS, foron empregadas para obter as traxectorias de simulacións durante tempos de dinámica na escala dos nanosegundos. Brevemente, a dinámica molecular computacional resolve as ecuacións de movemento de moléculas parametrizadas en determinados campos de forza a partires da información electrostática -i.e. Coulomb- e multipolar -i.e.

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Lennard-Jones- dos distintos compoñentes dos sistemas. Do mesmo xeito, a dispersión dinámica de luz (DLS) foi empregada para medir o coeficiente de autodifusión e, así, o tamaño hidrodinámico dos liposomas. Tamén o acoplamento de campos eléctricos ao DLS permitiu medir as características electrostáticas dos liposomas mediante a análise da variación da mobilidade electroforética.

Co fin de afondar máis nas capacidades de actuación sobre a bicapa lipídica, mostraranse tamén resultados da interacción desta cun polímero catiónico baseado en aminas primarias, secundarias e terciarias: a polietilenimina (PEI). A habilidade notable deste polímero na bicapa lipídica é a de xerar poros estables que permiten a difusión de auga a través da membrana. Este fenómeno foi empregado para facer hipóteses do rol do PEI como adxuvante no transporte de complexos baseados en plexados de ADN. A acumulación de PEI foi observada na rexión perinuclear, de células HeLa, mediante microscopía confocal de fluorescencia. Como modelo de membrana nuclear empregouse, nun primeiro momento, as monocapas de DMPC. Mediante experimentos de balanza de Langmuir mostrouse a habilidade do PEI de interaccionar co DMPC. Posteriormente, empregouse un modelo de membrana máis evolucionado, a bicapa lipídica. Neste caso a interacción do PEI con liposomas foi estudada por calorimetría diferencial de varrido e por ensaios de liberación inducida medida por fluorescencia da carboxifluoresceína. Por último, mostráronse resultados de experimentos de simulación de dinámica molecular co fin de presentar detalles da dinámica da formación do poro na bicapa lipídica, inducido polo PEI.

Un terceiro bloque será articulado coa presentación de diferentes aplicacións nanobiotecnolóxicas empregando liposomas dopados cos surfactantes gemini. Neste sentido, diferentes resultados publicados en xornais como o *Materials Science and Engineering: C* serán mostrados e completados ao longo do texto. A presencia dos surfactantes gemini empregados confire propiedades electrostáticas positivas aos liposomas, propiedade que será tida en conta nas seguintes etapas a seguir. Unha vez que a dinámica da inserción e as propiedades conferidas foron testadas, plantéxase un paso máis alá no control do sistema. Tal evolución é a de plantexar un sistema supraliposómico que permita empre-

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

gar as características electrostáticas dos liposomas para estudar a súa interacción con diferentes superficies. Deste xeito, un sistema formado pola configuración dun substrato polielectrolítico, baseado na técnica *capa-a-capa* foi desenrolado e a incorporación intacta dos liposomas a este substrato foi mostrada.

Tamén se comprobou a eficiencia na carga e liberación de moléculas de escasa solubilidade. Progresando no estudo do sistema, observáronse e mostráronse as características sobre a evolución e interacción celular dun determinado linaxe de células posto en contacto con substratos conformados por liposomas adsorbidos e por liposomas enterrados. A natureza destes substratos poliméricos tamén puido ser compatibilizada con sistemas que facían mímese con contornas extracelulares, e así, diferentes conclusións no proceso de comunicación celular vía vesículas extracelulares -representadas polo liposomas- puideron ser obtidas.

Continuando na progresión da complexidade dos sistemas nos que se empregaron estes liposomas, logo de estudar a súa incorporación en sistema bidimensionais, estudouse e monitorizouse a adsorción dos liposomas a sistemas pseudotridimensionais baseados en hidroxeis. A intención baséase en empregar as propiedades e características dun determinado tipo de hidroxeis formados a partires do ácido hialurónico -un glicosaminoglicano de carga negativa- para construír unha andamiaxe superficial que permita a adsorción dos liposomas catiónicos e así constituír unha plataforma que permita dar forma a un entorno determinado de proliferación e diferenciación celular. Así, verificouse a adsorción eficiente dos liposomas nestas estruturas de hidroxel. Tamén se comprobou e monitorizou a encapsulación e liberación dun fármaco que pode actuar como factor de diferenciación en células mesenquimais. Do mesmo xeito, medidas de citotoxicidade foron realizadas empregando os liposomas catiónicos que se están a estudar, todo en diferentes liñas celulares. Estes procesos de aumento na complexidade dos sistemas empregados foron realizados empregando diferentes técnicas.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A incorporación eficiente a superficies dos liposomas dopados co surfactante gemini foi monitorizada mediante o uso da técnica da microbalanza de cristal de cuarzo con

medida de disipación (QCM-D). Esta técnica baséase no efecto piezoeléctrico do cuarzo. Este material responde dunha determinada maneira reflexando frecuencias concretas ante a aplicación de ondas lonxitudinais. O cuarzo atópase funcionalizado cun substatro de ouro, que será modificado primeiro con consecutivas capas de polielectrolito -i.e. poly-L-lisina e ácido hialurónico- e posteriormente adsorbendo de maneira intacta os liposomas catiónicos. As especificacións e procedementos detallados serán explicados con concreción ao longo do texto. A capacidade para almacenar unha molécula hidrofóbica, como modelo farmacolóxico, foi testada co uso do DSC, observando os efectos sobre a temperatura de transición que se confiren á bicapa do liposoma pola presencia da molécula modelo (Nile Red). A eficiencia de encapsulación e a capacidade de liberación controlada foi determinada con experimentos de diálise. A exposición a gradientes de presión osmótica e diferentes temperaturas permitiu observar os distintos réximes de liberación en diversas configuracións dos sistemas -i.e. liposomas adsorbidos aos substratos polielectrolíticos ou liposomas soterrados-. As diferenzas observadas, entre a adsorción ou o soterramento dos liposomas catiónicos nos substratos poliméricos, foron plantexadas tamén no contexto dun contacto cunha liña celular. Células de cancro de mama MDA-MB-231 foron incubadas en diferentes substratos formados do xeito previamente descrito, e analizados con técnicas de microscopía confocal con aclopamento de rexistro da fluorescencia. Esta técnica permitiu observar a adhesión e proliferación das células ao observar cambios na súa morfoloxía e fixación no substrato co tempo de incubación.

Como unha segunda aplicación onde interveñen os liposomas catiónicos, faise referencia á incorporación destes liposomas ás matrices de hidroxel. Este feito foi observado mediante o uso do DSC, comprobando os cambios na transición conformacional da bicapa lipidíca entre a dispersión coloidal dos liposomas ou a súa adsorción a unha interfase. A molécula dexametasona, que actúa como factor de diferenciación de células mesenquimais, foi incorporada aos liposomas catiónicos. A eficiencia na encapsulación e liberación da molécula hidrofóbica -dexametasona- foi testeada mediante experiencias de diálese e cuantificada con espectrofotometría acoplada a unha columna de cromatografía líquida

de alta eficiencia (HPLC-UV). A citotoxicidade dos liposomas dopados co gemini e cargados coa dexametasona foi evaluada empregando células mesenquimais. Aproveitando a utilidade da dexametasona como factor de diferenciación en osteoblastos das células mesenquimais, foron feitas experiencias de diferenciación *in vitro*.

Dun xeito necesariamente descritivo, tamén será incorporado un bloque no que se mostrarán as principais técnicas experimentais e procedementos empregados nas experiencias con resultados reportados. A modo de resumo, as técnicas empregadas foron a calorimetría diferencial de varrido e de titulación isotérmica, a tensiometría de gota pendente, a microbalanza de cristal de cuarzo con monitorización da disipación, a espectrofotometría de absorción e de fluorescencia e a dispersión dinámica da luz. Dun xeito complementario ás técnicas anteriores, empregouse a simulación de dinámica molecular. Tamén diferentes procedementos experimentais, tales como a diálise para a análise de perfís de liberación de fármacos por presión osmótica. Do mesmo xeito a extrusión, un proceso a altas presións no que unha dispersión de liposomas multilamelares é forzado a atravesar unha membrana de porosidade determinada, así o tamaño e a polidispersividade dos liposomas queda reducido. A metodoloxía de síntese e formulación dos liposomas foi asistida mediante a técnica da roto-evaporación de fase orgánica a baixas presións e temperatura controlada.

En xeral, as conclusións máis importantes que se poden extraer dos resultados obtidos e reportados durante o texto, son os que teñen que ver coas propiedades sobre características físico-químicas que a presenza do surfactante gemini implica na súa incorporación na bicapa lipídica. Tales propiedades son a de rápida e eficiente estabilización electrostática, que se traduce nunha excelente estabilización coloidal dos liposomas dopados co surfactante gemini. Neste sentido, a vantaxe principal é a pouca cantidade de surfactante gemini necesaria para conseguir tales características. Máis resultados interesantes son os que teñen que ver coa incorporación intacta dos liposomas catiónicos a substratros poliméricos, e da súa capacidade na eficiencia de encapsulación e liberación de fármacos. Un resultado que apoia a aplicabilidade, a nivel biotecnolóxico, destes liposomas é a súa baixa citotoxicidade e boa biocompatibilidade mostradas en experimentos de viabilidade celular.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Estas conclusións resumidas, xunto cos demais resultados mostrados no texto, presentan un sistema coloidal baseado en liposomas con potenciais aplicacións na nanobiotecnoloxía; dende o uso deles como modelo de membranas ou sistemas de vesículas extracelulares ata os seus usos en terapias xénicas, en sistemas de liberación e transporte controlado ou en tecnoloxía de vacinas.

Para finalizar, unha parte do traballo realizado foi desenvolto no Grupo de Biofísica e Interfases do departamento de Física Aplicada da Universidade de Santiago de Compostela. Outra parte importante foi desenrolada no Grupo de Física de Coloides e Polímeros do departamento de Física de Partículas da mesma universidade. Do mesmo xeito, os procedementos referidos ao uso da microbalanza de cristal de cuarzo, as técnicas de *capa-a-capa* de polielectrolitos poliméricos e as experiencias celulares de interacións cos substratos, foron experimentos realizados nunha estancia de investigación subvencionada polo Programa Iacobus, no *Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics Research Group* (i3Bs) da Universidade do Minho (Portugal). Dun xeito paralelo, complementario e alternativo, durante o tempo de traballo e experimentación dos resultados compilados neste texto, unha cantidade importante de colaboracións e traballos de carácter científico foron realizados e apoiados por este autor. Tratándose de temáticas que circundan a física da materia branda e a nanobiotecnoloxía, citaranse cando sexa necesario os resultados ou procedementos empregados en tales traballos por consideralos non só transversais, senón complementarios en canto á praxe a todo o que se recolle nesta tese.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Contents

Introduction and Objectives **xxv**

I Methods, Synthesis Procedures and Materials **1**

1 Methods and Fundamentals **3**

1.1 Pressure-controlled pendant-drop surface balance 3

1.2 Isothermal Titration Calorimetry 6

1.3 Differential scanning calorimetry (DSC) 9

1.4 Dynamic light scattering (DLS) 13

1.5 *In silico* Molecular Dynamics 16

1.6 Langmuir Balance 19

1.7 Confocal Laser Scanning Microscope 20

1.8 Fluorescence Spectroscopy 22

1.9 High-Performance Liquid Chromatography *plus* UV-vis adsorption 25

1.10 Quartz Crystal Microbalance with Dissipation 25

2 Synthesis procedures **29**

2.1 Preparation of liposomes 29

2.2 Preparation of Hydrogels 32

2.3 Gemini surfactants synthesis 33

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3 Dialysis and Cell assays **37**

3.1 Dialysis and Release experiments 37

3.1.1 Leakage of Carboxyfluorescein loaded in DMPC Liposomes induced by PEI 37

3.1.2 Release of Nile Red loaded in Cationic Liposomes embedded on LbL substrates 38

3.1.3 Release of DEX loaded in Cationic Liposomes free and embedded on HA hydrogels 39

3.2 Cytotoxity Assays 39

3.3 MSC Differentiation Assays 40

4 Materials **43**

4.1 Part I 43

4.2 Part II 43

4.3 Part III 45

II Procedemento, Resultados e Aplicacións **47**

5 Micelización e adsorción en interfases aire/auga de surfactantes gemini **49**

5.1 Contextualización 49

5.2 Termodinámica da micelización 56

5.3 Tensión superficial dinámica 69

5.4 Conclusións 78

6 Explorando estruturas lipídicas: dopaxe con gemini e poración con polietilenimina **81**

6.1 Contextualización 81

6.2 Bicapas lipídicas dopadas con surfactantes gemini 88

6.2.1 Caracterización termodinámica de liposomas dopados con gemini . 88

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.2.2 Dinámica molecular *In silico*. A colocación dos gemini 97
6.2.3 Estabilidade coloidal dos liposomas DPPC/gemini 109
6.3 Bicapas lipídicas e formación de canais porosos 113
6.3.1 Polietilenimina (PEI). Tráfico intracelular 113
6.3.2 Monocapas de Lípidos-PEI. Balanza de Langmuir 115
6.3.3 PEI e liposomas como modelo de membrana nuclear 117
6.3.4 Formación de poros con PEI na bicapa lipídica. Dinámica molecular 120
6.4 Conclusións 124

7 Aplicacións de liposomas catiónicos 127
7.1 Contextualización 129
7.2 Liposomas catiónicos en complexos *Layer-by-Layer* 136
7.2.1 Liposomas catiónicos cargados con Nile Red 136
7.2.2 Complexos biomiméticos *Layer-by-Layer* e liposomas inmobilizados 139
7.2.3 Retención de Nile Red en liposomas catiónicos: adsorbidos ou incrustados 144
7.2.4 Internalización en células de cancro de mama MDA-MB-231 148
7.3 Liposomas catiónicos en hidroxeis 152
7.3.1 Liposomas catiónicos cargados con Dexametasona 152
7.3.2 Incorporando liposomas catiónicos con DEX en hidroxeis 154
7.3.3 Liberación *in vitro* de DEX dende liposomas catiónicos 158
7.3.4 Avaliando a citotoxicidade dos liposomas catiónicos 160
7.3.5 Diferenciación inducida de MSC en osteoblastos 162
7.4 Conclusións 164

8 Conclusions 167

9 Final Remarks and Outlook 171

10 Agradecementos 173

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

11 Lista de figuras **177**

12 Índice alfabético **197**

13 List of Publications and Permissions **201**

14 Bibliography **205**

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Introduction and Objectives

"Dimidium facti, qui coepit, habet: sapere aude, incipe"

— Horacio

The self-assembling could be pointed as the most essential and paradigmatic behaviour found in Soft Matter Physics. The implications of the self-aggregation phenomenon of amphiphilic molecules, under the prism of Biophysics, are numerous. Many efforts during the last century were spent to unravel the thermodynamics mechanisms and parametrize mathematical models to answer relevant questions about self-assembling interactions of amphiphilic molecules. Due to its significant presence and critical role in biological systems, the lipid bilayer stands as a warhorse to find solutions in nanobiotechnology scenarios such as drug delivery systems, biosensor platforms to diagnosis, vaccine development, tissue engineering process, protein purification technology, among numerous others. The most pointable system based on lipid bilayer is the liposome.

The liposome is a spherical nanoparticle formed from closed lipid bilayers in aqueous media, originating a colloidal dispersion of nanoparticles with an inner aqueous part separate from the bulk for lipid bilayer acts as a membrane. The start point of this thesis is the liposome; the way to follow is to find and explain the characteristics induced by doping of the lipid bilayer with amphiphilic molecules with high surface activities: the gemini surfactants. Also, it was studied the interaction between the bilayer lipid and polymeric species as branched polyethilenimine. The particularities and advantages

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

of these systems will be shown and explained with numerous experimental and reported results. In the first part, the adsorption in the air/water interface of the gemini surfactants and their micellization behaviour will be proposed. Next, the interaction and embedment of the gemini surfactants in the lipid bilayer will be reported, and the pore formation ability of the branched polyethilenimine was analyzed. Finally, some applications and examples of the interaction between gemini dopped liposomes and biological mimetics will be work.

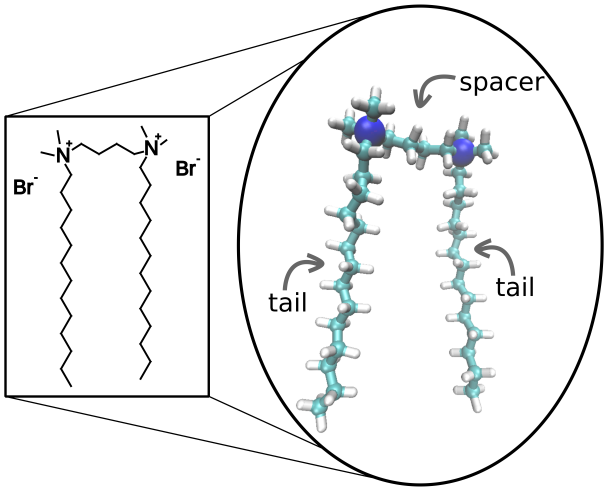

Figure 1: Molecular structure of the gemini surfactant from the family 1,α-Bis(tetradecyl trimethyl ammonium) with $\alpha = 4$, which indicates the length of spacer. Basically, two nitrogen ions are linked to four carbons (quaternary ammonium ion). There are two tails and one spacer, both hydrocarbon chains. The counterions (Br^-) are free solvated in water.

The amphiphilic molecules are crucial in different chemical, oil recovery, medicine, or personal care industries[1, 2]. The main characteristic of these compounds is their exotic capability of self-assembling in aqueous solution under certain thermodynamic conditions. Great efforts have been performed to explain and model their self-assembly behaviour and adsorption processes at interfaces[3–5], which are based fundamentally on entropic interactions, Van der Waals forces, and hydrogen bonding. The better performance and higher efficacy of surfactant molecules are directly related to their ability to decrease their critical micelle concentration (CMC) and surface tension and enhance their emulsification and solubilization properties, which can be exploited to introduce innovative and more effec-

tive surfactant-based products. In this regard, gemini surfactants appear as a relatively new class of innovative surfactant molecules that can fulfil this need. These are dimeric surfactants that consist of two monomeric head groups connected by a spacer[6–8] (Fig. 1).

In comparison with their corresponding monomeric counterparts, gemini surfactants show a higher surface activity, lower CMC and Kraft temperatures[9, 10], and forming in solution many different morphological micelles, vesicles, helices or tubules structures[11, 12]. These properties make them suitable for many different industrial processes[13, 14] such as emulsifiers, dispersants, coating agents and corrosion inhibitors, and biophysical applications[2, 15, 16] such as membrane solubilization, drug delivery systems or gene delivery by DNA-compaction, amongst others. In Chapter 1 of Part II, the self-assembly behaviour of gemini surfactants based in 1,α-Bis(tetradecyl trimethyl ammonium) (see Fig. 1) was performed.

Apart from the previously mentioned applications, these kinds of surfactants bearing quaternary ammonium salts have also shown, for example, excellent properties as microbicides[17], permeation enhancers of drugs[16, 18], biodeterioration inhibitors[19], or cleaning and disinfectant agents[20]. Also, the potential influence of changes in the spacer length on the resulting physic-chemical properties was considered. Dynamic surface tension (DST) and isothermal titration calorimetry measurements (ITC) were done to characterize the synthesized gemini surfactants, and new models to manage surface tension and calorimetric data and explained the obtained results were developed.

In this regard, it is worth mentioning that the variation of the surface tension with the surfactant bulk concentration is classically analyzed using the Gibbs adsorption theory. However, experimental observations show incompatibilities between the saturation behaviour at the interface of cationic surfactants and the assumption of this saturation regime before the surfactant CMC according to the Gibbs adsorption theory[21]. Regarding saturation behaviour, there is a high depth discussion germinated from several concatenated works based on questions and answers between reputed researchers in the

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

field[22–26]. The Gibbs adsorption equation:

$$\Gamma = \frac{-1}{nRT}\left(\frac{\mathrm{d}\gamma}{\mathrm{d}\log c_b}\right)\Bigg|_{T,P} \tag{1}$$

is applied for experimental data obtained at constant temperature and pressure, where n is the dimensionless constant accounting for the surfactant ionic state, R is the ideal gas constant (J K^{-1} mol^{-1}), T the temperature (K), γ is the measured surface tension (N m^{-1}), c_b is the surfactant bulk concentration (M), and Γ is the surface excess concentration (mol m^{-2}). It is usually accepted that n = 1 for non-ionic and n = 2 for ionic surfactants, respectively. However, for gemini surfactants, the value of n remains doubtful due to the ionic structure of these surfactants. The universal use of Eq. 1 has been previously questioned in the literature[22], so there is a clear need to develop new models to explain the origin of surface tension changes[27].

Then, we here developed a new method to analyze the dynamic adsorption isotherm of gemini surfactants based on the dynamic surface tension profiles at different bulk surfactant concentrations. This model is based on the Frumkin adsorption isotherm[28] to consider the lateral chain interactions at the interface, a consequence of the ionic character and large hydrophobic moiety of the chosen surfactants (tails and spacer). In this regard, the ionic nature of the present surfactants leads to electrostatic interactions between the adsorbed gemini molecules, so a parameter to take into account such lateral interactions is introduced (A). The large hydrophobic moieties interact via Van der Waals attractive forces, so the interface behaves as attractive (A > 0), and the adsorption is cooperative. On the other hand, the problem of diffusion from bulk to the solution interface was treated through the Ward-Tordai diffusion equation[29]. The relationship between the dynamic surface tension and the surfactant concentration was established using the May-Jeelani-Hartland empiric equation[30].

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Then, our approach allows us to explain and model the behaviour of the dynamic surface tension profiles at the beginning of the adsorption process, in which experimental

data show an initial inflexion only compatible with a cooperative adsorption isotherm. On the other hand, demicellization ITC data from the derive gemini surfactants were shown to display both endothermic and exothermic peaks upon each titration (at surfactant concentrations in the sample cell below the CMC) for this kind of gemini surfactants. Because that exothermic contribution disappears in the micellar dilution regime (gemini concentration in the sample cell > CMC), a novel method is also implemented to get an explanation about the exothermic contribution in the demicellization regime, and a new protocol based on this exothermic component was used to estimate the CMC.

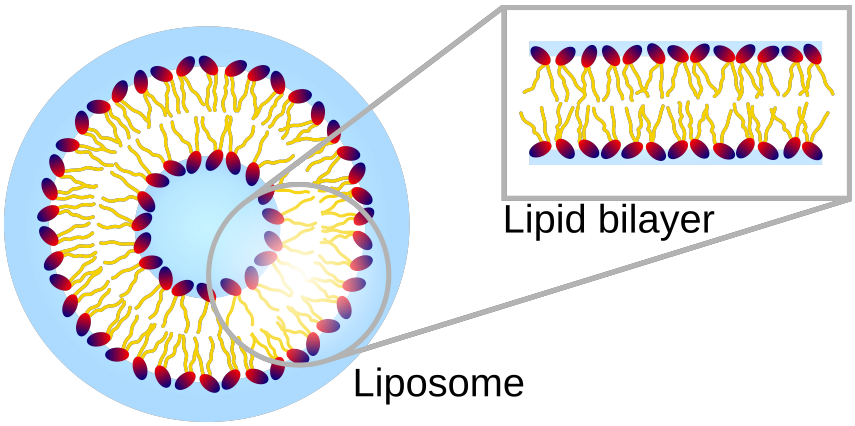

Figure 2: Schematic representation of the closed lipidic bilayer forming a section of a liposome. The insert represent a local configuration of the lipids in bilayer configuration.

Following the proposed schema, the next step is centred on the study and results about the embedment of the gemini surfactant into the lipid bilayer. The motivation and relevance are founded on the nature of nanoparticles, which opens many possibilities for developing efficient nanotools to carry molecular bioactive cargoes, functionalize surfaces or configure new biosensors[31]. From the first works[32] reporting their existence, liposomes became a crucial player in nanoparticle pharmaceutical technology. They are thermodynamically stable structures formed by the dispersion of lipids in aqueous media, with their most common configuration in the form of closed lipidic bilayers with an inner aqueous core (see Fig. 2). The structure of this type of organic nanoparticles may mimic somehow the cell membrane structure, and such resemblance has mainly been exploited

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

to use the liposomes as natural-based nanocarriers[33, 34], or biomimetic models[35] of more complex biological systems.

To obtain efficient nanoparticles for their clinical applications (gene therapy, drug delivery or vaccines), liposomes must be stable from the colloidal point of view[36] and they usually need to be cationic to interact with target cells. The non-availability of natural cationic lipids implies the need to explore liposome formulations with cationic synthetics as double-chained quaternary ammonium[37, 38], or with the presence of cationic single-chained surfactants[39].

The presence of cationic lipids/surfactants in the liposomes formulations provokes changes in the conformation of the lipid bilayer, and as a consequence, in the colloidal nanoparticle stability[37, 40] and/or biocompatibility[41]. The clever choice of suitable molecular species and the lipid/surfactant molar ratio are critical for the successful synthesis of cationic liposomes. Following previously reported works[37, 42–44], our strategy to obtain cationic liposomes from DPPC (see Fig. 3) bilayers is based on gemini surfactants as liposome cationic catalyzers. The properties and applications of these amphiphiles were previously pointed out[2], and some relevant results about their micellization and air/water interface adsorption were measured[45].

The introduction of gemini surfactants changes the morphology and structure of lipid bilayers, translating into the alteration of the phase transitions of membranes in liposome structures. From the theoretical point of view, those phase transitions are commonly studied by a simple two-state (gel/fluid) model[46], cooperativity theories[47], or Montecarlo simulations[48]. In this work, we use a theoretical framework based on the transcendent physical paradigm of the Ising model to interpret the role of surfactants on the phase transitions in the lipidic bilayers. Ising model is a statistical mechanics model that has been traditionally used to explain ferromagnetism and other temperature-dependent phase transitions[49].

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

In general terms, the conventional Ising model with phase transition is formed by a bi-dimensional lattice with nodes are occupied by a particle with two possible states

(+1 or -1). Each particle is coupled at least with the first neighbours, i.e. the state of the ith-particle is influenced by its first neighbours. Under these hypotheses, a critical temperature below which all particles will have the same state will exist.

The 2D Ising model takes the following mathematical form of its Hamiltonian (in the absence of an external field): $H = -J \sum_{i,j=0,0}^{N,N} s_i s_j$, where s_i, s_j are the spin values in each point of the mesh, with typical values of +1 or -1, and N the number of points. In this new interpretation of the Ising model, these parameters represent trans (+1) or gauche (-1) isomerism in our representation and J is the energetic term that considers the magnitude of the interaction between neighbours in the mesh -i.e., coupling-. As J decreases, the temperature of the transition also decreases. Taking into account the new interpretation of the parameters of the Ising model proposed by Almeida[50], we have applied this model to lipid bilayer systems with embedded surfactants.

With our results, we present a physicochemical characterization of a novel formulation of cationic liposomes using DPPC with a subfamily of gemini surfactants with varying alkane spacer groups attached to their ammonium head-groups. We use microcalorimetry data combined with molecular dynamics simulation to understand the changes induced by the gemini surfactant in the structure and morphology of the lipid bilayer, and we get advanced of the adapted Ising model to interpret the results. Molecular dynamics simulations have become an essential tool for providing insights into the structure and dynamics of lipid membrane model systems, and the insertion of hydrophobic molecules essentially[51]. In addition, the colloidal stability of the obtained liposomes is evaluated and discussed in terms of the nature of the gemini surfactants embedded or their concentration by dynamic light scattering measurements.

Polyplexes (polymer/DNA complexes) represent an attractive alternative to viral vectors for cell transfection[52, 53]. They usually present lower efficiency rates but they have the advantage of possessing low host immunogenicity, the possibility of large-scale production, and the avoidance of potential risks of mutation related to the use of viral vectors[54].

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Polyethylenimine (PEI) is a cationic polymer which in 1995 became the second non-

Figure 3: Molecular structure of DPPC, the lipid used to configure the initial lipid bilayer to embed the gemini surfactants. As it can be observed, the N^+ and the O^- form a neutral group which describes a electric dipole: zwitterionic group.

viral vector used to transfer nucleic acids into cells[55]. Ever since, multiple in vivo and in vitro studies using different types of PEI have shown a relatively high efficiency in gene expression compared with other polymer vectors[56, 57]. The origin of its efficiency seems to be the combination of its strong DNA compaction capacity with an intrinsic endosomolytic activity[58]. However, the mechanism of the transfection of the PEI-DNA complexes is still a topic of debate.

Non-viral gene delivery mechanism is generally considered to consist of seven different steps: (i) polyplex formation, (ii) binding of the polyplex to the external cellular membrane, (iii) cellular uptake by endocytosis, (iv) endosomal escape, (v) cytoplasmic transportation, (vi) entry through the nuclear membrane and (vii) decomplexation of DNA vector within the nucleus.

In the last decade, there have been a large number of investigations concerning the first four steps[59, 60]. Most of these studies agree that the key feature of the efficiency of PEI in gene therapy resides in the so called *proton sponge* effect. PEI-DNA complexes are usually positively charged, and they interact electrostatically with the external membrane of the cell. After the interaction, the polyplexes are spontaneously captured by an endosome to be transferred to a lysosome for degradation. During this intracellular trafficking the capacity of the PEI to attract protons is coupled with the influx of protons and chloride ions by the endosomal ATPases to decrease the pH[61]. The result is a drastic increase in the ionic strength inside the endosome that induces an osmotic swelling and provokes the disturbing of the endosome, releasing the polyplex into the cytoplasm of the

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

cell.

Interestingly, the PEI's polyplexes ability to transfection has also been investigated in DNA vaccines in the prevention of several infections[62–65] and cancers[66–68] not only for its low cytotoxicity and its capacity to increase transfection efficiency, but also because it is suspected that PEI has intrinsic immune-activating properties in vivo[62]. PEI-based DNA vaccines have shown stronger immune response in vivo as compared to the traditional protein vaccine for tetanus[69]. DNA-PEI polyplexes were also tested as DNA vaccine for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) showing an increase of production of B lymphocytes and SARS-CoV Spike protein in mice immunized via intranasal[63].

Nevertheless, little is known about the pathway and mechanism of the transit of the PEI-DNA complexes or the naked DNA from cytoplasm to the nucleus[70]. Experiments carried out by Pollard and co-workers showed that DNA alone is hardly transported from cytoplasm to nucleus compared with PEI-DNA complexes[71]. That means that the complexation of DNA with PEI either protects the DNA from enzymatic degradation in the cytoplasm[72] and/or the PEI plays an active role in the nuclear uptake of the DNA. Shi and co-workers showed the presence of PEI, interestingly, at the intracellular and nuclear level and DNA previously polyplexed[73], opening the door to the possibility of the previous intracellular decomplexation of DNA. This result may agree with the active role of PEI in the nuclei uptake of the naked DNA. The skepticism of some authors[74, 75] that the PEI interacts with the nucleus of the cell is based on the assumption that the PEI introduced into the cell nucleus may interact also with the host DNA altering the transgenic expression.

Static light scattering measurements of phospholipidic membranes in presence of PEI by Sikor et al.[76] show indirect evidence that the PEI alone is able to create pores in the phospholipidic membrane and more recently Kwolek et al. concluded that the incorporation of PEI facilitates transmembrane translocations of anionic lipids[77]. However, although the crucial role of nanopores in different diffusion regimes of PEI -linear or

USC DE COMPOSTELA

branched- have been studied before[78], the pore formation induced by PEI in lipid bilayers remains unclear. In the present study, we extended our characterization of PEI and its interactions with biological membranes. We used physicochemical studies and in vitro experiments to shed light on the mechanism of interaction between PEI and the lipidic membrane of the cell nucleus. In addition, molecular dynamic simulations of a bilayer at two different temperatures in the presence of PEI were also conducted to validate the experimental results.

The PEI type and the composition of the lipidic bilayer mimicking the nuclear membrane in this study were selected to optimize the experimental conditions of the biophysical techniques to allow the interpretation of the data at the molecular level. We focused our study in the search of the physicochemical mechanisms of interaction that facilitate the transfection, assuming that PEI with larger molecular weight and more complex lipidic membranes may operate through the same principles. Our results suggest more detailed insights to explain the transit of DNA into nucleus when PEI is used as vector. PEI has the ability to stabilize pores and defects on lipidic membrane creating channel for the DNA to cross through into the cell nucleus. The tendency of PEI to stay at the channels of the phospholipidic bilayer may assist the decomplexion of the PEI/DNA polyplexes and possibly prevent PEI from interaction with the host DNA. Our finding provides new basis to improve the efficiency of non-viral vectors for the development new gene therapy treatments and DNA vaccines.

To present some possible applications of the cationic liposomes previously characterized, the final parts of the thesis will show results about the mimetic role of the liposomes as extracellular vesicles, or as drug delivery systems in process of differentiation of mesenchymal stem cells. Extracellular vesicles (EVs) are vesicular colloidal nanoparticles generated as byproducts of cellular activity[79–83]. Intraluminal vesicles are generated during the invagination of late endosomes or multivesicular bodies. These vesicles fuse with the plasma membrane, thus triggering the formation and secretion of EVs, such as exosomes[84] – closed lipid bilayers that carry bioactive molecules such as proteins and

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RNA[85].

The released EVs and their cargo are transported by circulating body fluids, such as blood, and captured by host cells[86, 87]. The involvement of EVs in different biological processes has been extensively researched and reviewed[88–91]. Once considered as "garbage bags" of cells[92], today, EVs are recognized as transport systems that carry and deliver biomolecules to modulate key signalling pathways in cell-to-cell communications[93, 94] and the propagation of numerous diseases[95, 96].

The EVs capture is a largely variable event due to the abundance of extracellular matrix (ECM) components from the donor cells presented at the surface of EVs, among other factors. As a result, the associated transfer and cellular recognition processes remain unclear. EVs bioactivity could be further elucidated by developing new systems that mimic the interaction of vesicular structures with cells and the ECM.

Liposomes resemble EVs in different aspects: they are nanoparticles capable of interacting with cells and carrying bioactive molecules. Like EVs, liposomes are formed from the dispersion of lipids in aqueous media via self-assembly that results in closed lipid bilayers. The high thermodynamic stability[97] and biocompatibility[98] of liposomes, as well as their well-defined hydrophobic and hydrophilic domains make them suitable systems to load and deliver bioactive molecules[99, 100]. Because of these similarities, liposomes have been used to assemble analogues of EVs[101].

Liposomes can be loaded with different biomolecules to simulate EVs cargo and transfer to ECM and/or cells. The ECM is one of the first contact points of newly generated EVs and their environment: EVs-to-matrix interactions can result in ECM remodelling[102], initiation of mineralization in cartilage or bone[103, 104], or conditioning of cancer metastasis[95]. Mimicking the ECM is a tremendous challenge for tissue engineering because of its high complexity on structural and functional levels[105]. Previously, it has been shown that the layer-by-layer (LbL) approach can be applied to generate reductionist ECM mimics[106, 107].

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

LbL allows assembling nanostructured films driven by – but not limited to – electro-

static interactions containing polyionic species, including building blocks with potential for biomedical applications[108–110]. Herein, we created ECM mimicking LbL from the polycation poly-L-lysine (PLL) and the polyanion hyaluronic acid (HA): PLL is a positively charged polypeptide known to promote cell adhesion while HA is a negatively charged glycosaminoglycan that is one of the main components of the ECM[106, 107, 111]. The use of polyions allows us to build the LbL and immobilize a supported vesicle layer (SVL) of cationic liposomes. Such a system provides a simplistic model for EVs embedded in ECM and allows the study of the interactions between vesicles and other biologics and cells.

The cationic character of the gemini dopped liposomes will ensure us a possible attractive interaction between liposomes and the HA layer of the ECM mimic constructs. The intact immobilization will be monitored by quartz crystal microbalance. Moreover, the efficiency of drug encapsulation by liposomes will be tested by spectrofluorometry and dialysis procedure. Finally, the confocal microscopy technique assists us in making conclusions about the interaction between the complex substrates and the MB-MDA-231 breast cancer cell line.

Finally, this PhD thesis is concluded by exploring 3D complex architectures in which the incorporation of liposomes as potential drug delivery systems to control the differentiation process of mesenchymal stem cells located at polymeric scaffolds are aimed to provide new 3D matrices able to repair and/or regenerate damaged tissue.

Among the great variety of macromolecular matrices stand out biopolymeric hydrogels[112] as deservedly principal candidates due to their biodegradable, biocompatibility, and biomimetic properties. Concretely, the hyaluronic-based hydrogels have been used as scaffolds in bone tissue engineering[113–117] due to the CD44 glycoprotein affinity for the HA[118]. Also, due to the HA role involved in chondrogenic[119] and osteogenic[120, 121] differentiation of mesenchymal stem cells (MSC). The versatility of MSC resides in its self-renewal and differentiation properties, exploited as treatment in several diseases such as spinal cord injuries, Alzheimer's disease, or osteoarthritis[122].

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

The HA is an anionic glycosaminoglycan commonly accepted as a candidate to generate bionanotools due to its particular biocompatibility characteristics and its remarkable presence in the extracellular matrix of connective or epithelial tissues[112–117, 121]. In this work, it is proposed to continue unravelling the differentiation MSC in the presence of biocompatible scaffolds, considerating advantages such as extracellular matrix mimicry or their potential central role both in vascularized -bone- as non-vascularized -cartilage- support structures. To follow that, we will present a characterization of a system based on intact incorporation to the HA scaffolds of cationic liposomes loaded with a molecular differentiation factor of MSC.

Aside from the relevance of scaffold in tissue engineering and its particular inherent properties enhancing proliferation or differentiation of cells[118], strategies based on using bioactive molecules to control such processes have been considered[112, 114–117]. Specifically, some glucocorticoids such as dexamethasone (DEX) have been used to stimulate the osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation of MSC[123–126]. The mechanisms of the differentiation induction properties of DEX remains unknown, and their bioactive properties have been shown dependent on concentration. More than genotype modifications, the presence of DEX at low concentrations (10 nM) has demonstrated[124] the ability to keep invariable the cell-surface phenotype of human MSC during multiple passages. Moreover, at concentrations upper than 10 uM, the DEX has shown osteogenic differentiation inhibition and adipogenic differentiation induction[126].

Driven by the low-moderate water solubility of DEX (around 89 μ/mL), to control ists availability and, thus, its biological activity this drug can be loaded and transport by within colloidal nanostructures such as liposomes. Following similar strategies[127–135], we propose using cationic liposomes as nanotools to load the DEX in a hydrogel bulk efficiently. From previously reported data[35], the intact adsorption of cationic liposomes loaded with a hydrophobic molecule was verified onto HA films in layer-by-layer constructs of HA/poly-l-lysine. Following these results, the cationic liposomes will be loaded with DEX, and their adsorption in a methacrylate hyaluronic-based hydrogel (MeHA-Hyd)

USC
DE COMPOSTELA

inner surface will characterize.

Taking advantage of the rheological and synthesis properties of the photocrosslinked MeHA-Hyd[114], the DEX-loaded liposomes incorporation was studied. The synthesis of DEX-loaded liposomes was tracked by dynamic light elastic scattering, differential scanning microcalorimetry, and the load efficiencies by release measurements with dialysis experiments at infinite osmotic pressure conditions (sink conditions). The bioavailability and osteoblast differentiation capability of DEX-loaded liposomes was tested in MSC cells. The adsorption of DEX-loaded liposomes in MeHA-Hyd was probed by DSC and fluorescence confocal microscopy, likewise its load efficiencies by dialysis experiments. The results show an optimized platform with efficient concentration control of the bioactive molecule (DEX) available on the surface of porous MeHA-Hyd, opening the door to improve a controllable proliferation and differentiation of MSC in a 3D system.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Part I

Methods, Synthesis Procedures and Materials

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1 Methods and Fundamentals

1.1 Pressure-controlled pendant-drop surface balance

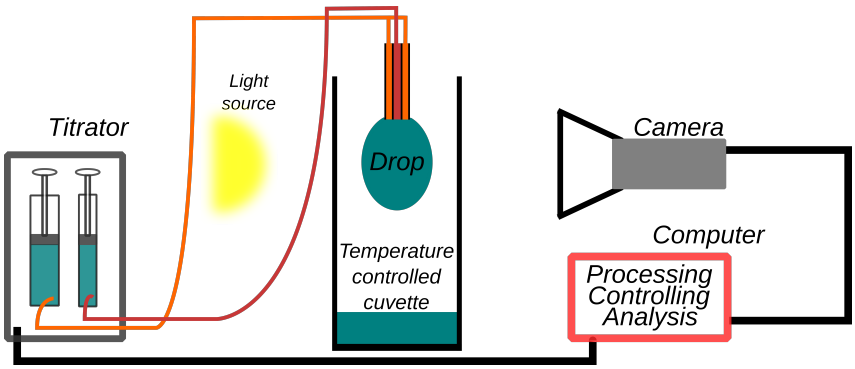

Figure 1.1: Schematic representation of measurement device of dynamic surfacte tension. The real system had implemented a set of gear to align the camera, the source light and the drop.

A pendant drop controlled formation system was used to obtain the surface tension data with time. In figure 1.1, a dynamic surface tension system scheme can be observed. The experimental setup was composed of a previously developed Langmuir balance based on a drop pendant analysis[136, 137], fully designed by Cabreizo-Vílchez and *co-workers* at the University of Granada[138, 139]. The computational data procedures were carried out using the Dinaten© and Contacto© software. The pendant drop is formed at the end of two coaxial needles. Both tubes are connected to respective two syringes coupled with a computer system to control the titred volume. The syringes are placed onto a microinjector, Hamilton Microlab 500. The widest syringe can load 250 μL of the sample,

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

while the other can load 25 μL. The narrowest syringe titrates for the inner coaxial. The volume of the pendant drop can be controlled between 12-24 μL. It is crucial to note that there is a cuvette around the bubble, which allows us to control the measurement temperature and keep the liquid-vapour phase equilibrium, and also to isolate the system from any external contamination or external oscillations. The system is placed on an antivibration table to avoid mechanical fluctuations. When the drop is formed, the camera starts to record images of the bubble.

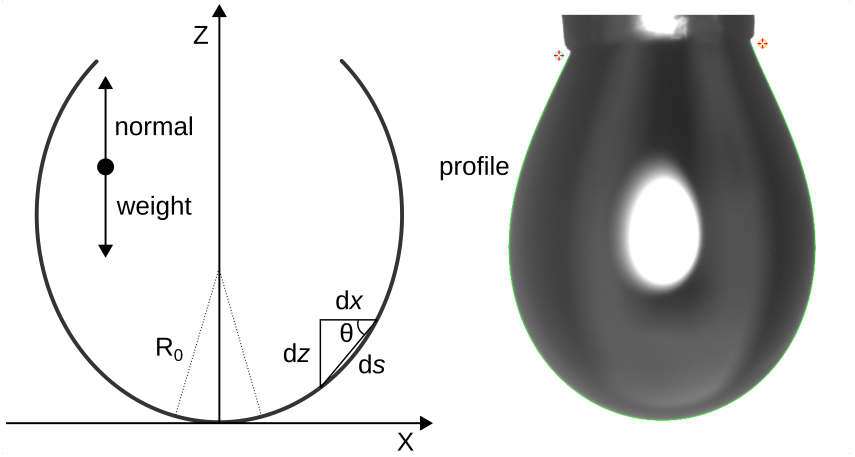

Figure 1.2: Geometrical parametrization of a drop profile (s), and the math parameters to propuse the differential equation system (1.1). In the right hand, it can be orbserved an example of image of a typical bubble profile from the software.

The used software Dinaten© and Contacto© have implemented a computational routines to obtain the surface tension values from the drop profile images. The procedure is based on geometrical terms, statistical treatment and image processing. In figure 1.2, the theoretical drop profile is represented, the relationship between variables could be proposed with the following differential system equations:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

$$\begin{aligned} \frac{\mathrm{d}x}{\mathrm{d}s} &= \cos\theta \\ \frac{\mathrm{d}z}{\mathrm{d}s} &= \sin\theta \\ \frac{\mathrm{d}\theta}{\mathrm{d}s} &= \frac{2}{R_0} - \frac{\sin\theta}{z} - \frac{\Delta\rho g z}{\gamma} \end{aligned} \tag{1.1}$$

Where s is the drop profile, x and z the coordinates, θ is the angle of the drop profile variation, R_0 is the radius of curvature at the origin, $\Delta\rho$ the difference between the density of the two phases -drop and air-, g the gravity acceleration in the lab, and γ the surface tension. In the third term in the equation system 1.1, we find the presence of the Young-Laplace equation to relate the surface tension with its geometry under the presence of a gravitational field. Given initial values for the variables, the equation system 1.1 allows us to obtain the theoretical profile s of the drop by numerical integration of the three equations simultaneously.

To perform a fit analysis of the measured profiles, an objective function is proposed to be minimized:

$$E = \frac{1}{2}\sum_{n=1}^{N}\left[d\left(u_n, v\right)\right]^2 \tag{1.2}$$

where $d\left(u_n, v\right)$ is the normal distance between coordinates of the theoretical drop profile v and measured profile u_n. The axisymmetric drop shape analysis (ADSA) was used to find the theoretical profile in which parameters coincide with the measured ones. Basically, the equation system (1.1) and the minimization function (1.3) were solved in a coupled way; the value of γ was obtained for a photographed drop profile. The procedures were developed previously by Rotemberg *et al.*[140] and optimized by del Río *et al.*[141] and Rodríguez-Valverde *et al.*[142]. In conclusion, after a bubble is formed, the computer routine controls the drop volume by coaxial needles at the exact moment that calculates the associated surface tension. During the experiment, this procedure is carried out to reach the isotherm of dynamic surface tension.

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

The pendant drop techninque was used to carried out the demicellization experiments of the gemini surfactants in Chapter 1 of Part II: *Micellization and adsorption in air/water interface of the gemini surfactants.*

1.2 Isothermal Titration Calorimetry

Within calorimetric methods, isothermal titration calorimetry (ITC) is a technique that allows the measurement of binding affinity, enthalpy changes and binding stoichiometry of the interaction between two or more molecules in solution. This measurement is performed directly, a fact that makes this technique important in the world of molecular interactions, including self-aggregations. Essentially, ITC microcalorimeter gives us the thermodynamic information of intermolecular interaction heats. An ITC device is formed by two cells -reference and sample- in contact with a thermal bath inside an adiabatic shield. In figure 1.3 can be observed a schematic representation of the fundamental ITC parts. A syringe with stirring and titration volume controllable is introduced in the sample cell. When an aliquot of titrant is got into the sample cell, the reaction at the molecular level that could happen induces a decompensation in the temperatures between reference and sample cell. This temperature difference has an important meaning; the energy used to eliminate it is the variation of the enthalpy between the states pre- and post-titration.

Since it is impossible to measure the internal energy of a system, the quantification of the enthalpy between two states is of great relevance. Indeed, following a consecutive experiment of titrations, we can find pre- and post-equilibrium states of a global reaction. Bearing this in mind, it is possible to determine some reaction constant (K). Knowing the enthalpy variation and the reaction constant, it is possible to obtain the free energy and the entropy variation of the reaction, using the following essential relationships:

$$\begin{aligned} \Delta G &= \Delta H - T\Delta S \\ \Delta G &= -k_B T \log K \end{aligned} \tag{1.3}$$

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

where ΔG, ΔH and ΔS are free energy, enthalpy and entropy variations, respectively. T is the operation temperature, k_B the Boltzmann constant and K the reaction constant.

Even the fundamental is easy, the determination of DH during the experiment is not

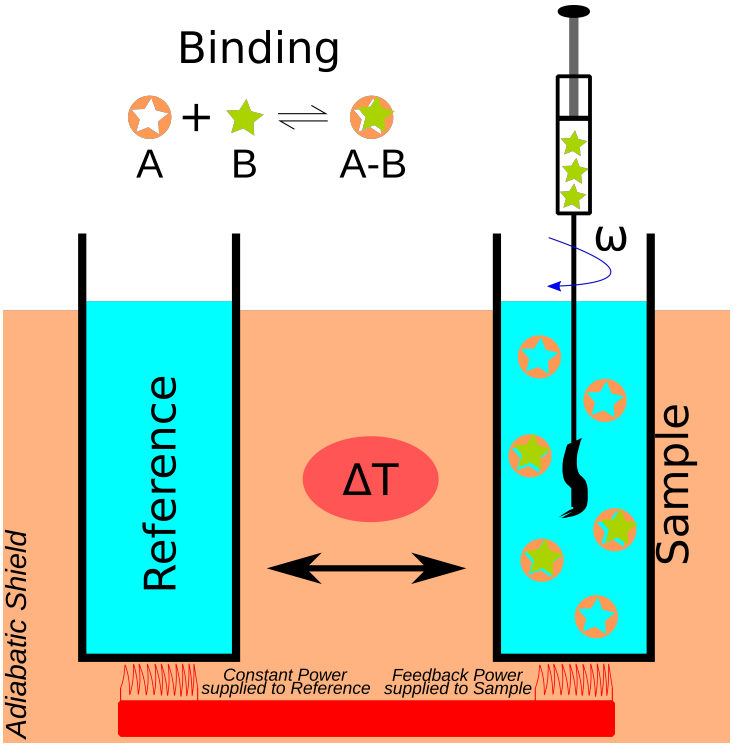

Figure 1.3: Schematic representation of the fundamentals of ITC. A typical binding phenomenom is represented by a 1:1 reaction, ligand B in substrate A in equilibrium with a complexed system AB.

evident. It is necessary to consider the volume variation in the sample cell to recalculate [A] and [B] concentrations. Nowadays, there are several software that has implemented this kind of correction.

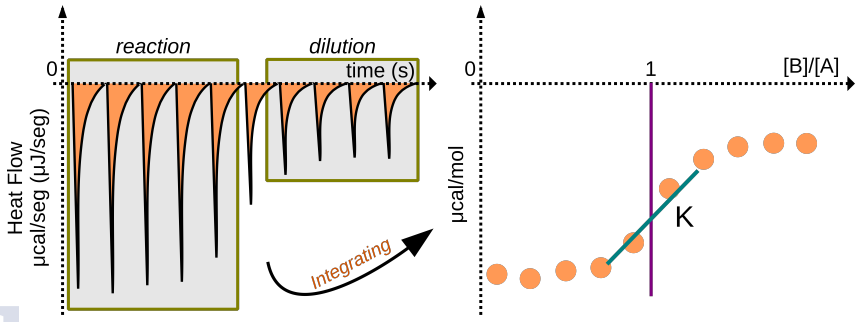

Figure 1.4: Mock representation of a raw data of a ITC experiment titrating B in a sample cell filled with A. Both regimes, reaction and dilution are showed. The right hand of the panel, show the integration of the raw data to represent energy versus ratio [B]/[A]. This way to procedure gives us data to fit and obtain enthalpies of the binding, reaction constants or stoichiometries.

In the simplest experiment, species B is titrated in the sample cell, containing species A. B is conjugated with A in the first titrations, forming a complex with some stoichiometry -i.e. 1-. [À] and [B] are de concentrations of A and B species. As the number of titrations increases, the concentration of B in the sample cell also increases. Eventually, the amount of B in the sample cell will be higher than A; from this moment, the amount of B titrated in the cell would not contribute to the complex formation. In Fig. 1.4 can be observed an example of the energy spent compensating for the temperature difference between reference and sample cell for a mock system during several titrations. The power was observed during the first five titrations due to the binding between A and B, determining a reaction regime. The final four titration was due to the dilution of B, and the complexation A-B was saturated, determining a dilution regime. The integration of the peaks of all regimes allows us to represent the variation of the reaction enthalpy as the ratio [B]/[A] increases. In an example of a stoichiometry 1:1, the value [B]/[A]=1 indicates the zone where the reaction regime passes to be dilution. The slope of the change zone gives us information about the constant of the reaction (K).

In our cases, we use a Microcal VP-ITC (Malvern Panalytical Ltd), which has a sample cell of 1.4 mL and 0.270 mL of syringe volume to titrate. The raw data were analyzed using AFFINImeter Software. The heat flow peak of each aliquot of 5 μL was recorded during 300 s. Following the fundamentals briefly exposed, the ITC was used to study the demicellization process. In that case, the sample cell was filled with double distilled water, and the syringe was filled with a highly concentrated sample of a determined gemini surfactant. As the titrations increase, the concentration of gemini in the sample cell also increases, eventually surpassing the CMC of the determined gemini surfactant. The reaction regime, in that case, is the demicellization regime, characterized in general for the rupture of the micelles titrated. The dilution regime corresponds to the dilution of thermodynamically stable micelles since the CMC was reached.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

The ITC technique was used to carried out the demicellization experiments of the gemini surfactants in Chapter 1 Part II: *Micellization and adsorption in air/water inter-*

face of the gemini surfactants.

1.3 Differential scanning calorimetry (DSC)

The differential scanning calorimetry (DSC) has stood out as one of the most valuable tools to obtain the thermodynamic information of phase transitions or conformational changes. As the ITC, the DSC is a thermodynamic tool that can measure the differences in the thermal response between two cells -reference and sample-. Behind its fundamental simplicity, sophisticated electronic instrumentation allows us to get the main properties of our systems. Figure 1.5 shows a schematic representation of the DSC apparatus -Heat Flux and Power Differential configurations-.

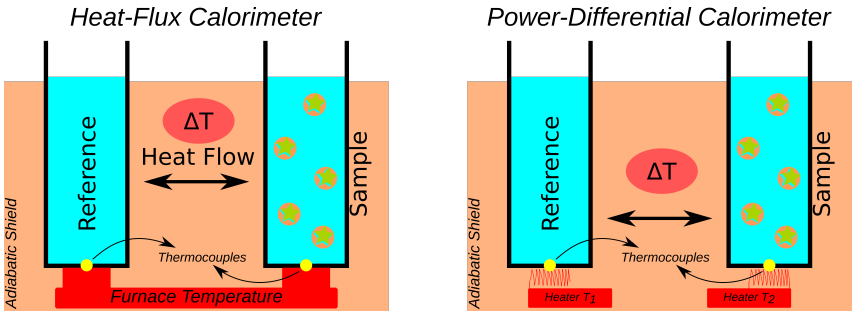

Figure 1.5: Scheme of DSC apparatus presenting the two typical configuration of Heat-Flux and Power Differential.

The reference and sample cells are coupled to a controllable thermal bath, and then the temperature is varied in a given scan rate. If there are no differences between the temperatures of the cells, it means that the thermal response of the cells -and their inner samples- is the same. Alternatively, if there is a thermal difference between cells, even the thermal bath contact is the same; this means that the thermal response of the cells is different. The heat capacity determines the thermal response of a system:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

$$C_p = \left.\frac{\mathrm{d}U}{\mathrm{d}T}\right|_P \tag{1.4}$$

where C_p is the heat capacity at constant pressure, U is the internal energy and T

the temperature. As it is not possible to measure the internal energy of a given system, it is necessary to have information about the heat capacity of some system, in this way it is possible to know the thermal response of a system compared with a known system.

There are two possibilities to determine the differences in the thermal response: measure the differences in the temperature of the reference cell and the sample cell, determining a heat flux between them; or by measuring the temperature differences between the cells and the thermal bath, and by means of a power compensation to reach the temperature. The first methodology is the DSC heat flow operating principle, while DSC power compensation uses the second procedure. In both cases, the information about the system is the same: its thermal response. Two calorimeters had been operated to carry out the experiments shown in this thesis: Micro DSC-III (Setaram) and Microcal VP-DSC (Malvern Panalytical). Due to its relevance, the method to determine the phase transitions and the specific heat capacities of a given system will be explained.

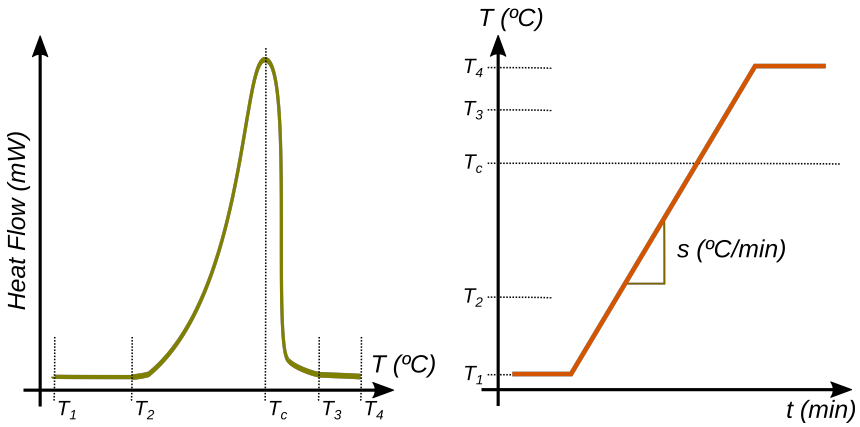

Figure 1.6: Mock enthalpogram of DSC measurement of a example phase transition in a soft matter system. The temperature ramp in scan rate mode and the variation of the heat flux were included, identifying the temperature intervals: T_1 to T_2 is a phase X, T_3 to T_4 is a phase Y and T_2 to T_3 is a transition regime.

A phase transition is a critical phenomenon that occurs for a system in some regions of its phase diagram. For example, varying the temperature can explore different phases in some systems. This change always implies alterations in the thermal response of the system, either due to pure changes in heat capacity between states or due to divergences in

heat capacity at critical temperatures. The theory of the phase transitions is a cornerstone in physics; even if laureated ideas have been developed, there is a long way to improve the models and parametrizations of the critical phenomenon theories. The DSC can show the critical temperatures due to comparing the thermal response between a reference and sample during a controlled thermal scan rate. Figure 1.6 shows a mock enthalpogram from DSC measurement. A determined system dispersed in water is placed in the sample cell while the reference cell is filled with water. A temperature ramp between T_1 and T_4 is set at s °C/min. Between T_2 and T_3, a heat flow between sample and reference cell appears, meaning a different thermal response between them. The maximum of this divergence is placed on T_c, namely critical temperature. The peak area can be interpreted as the energy needed to reach the state change.

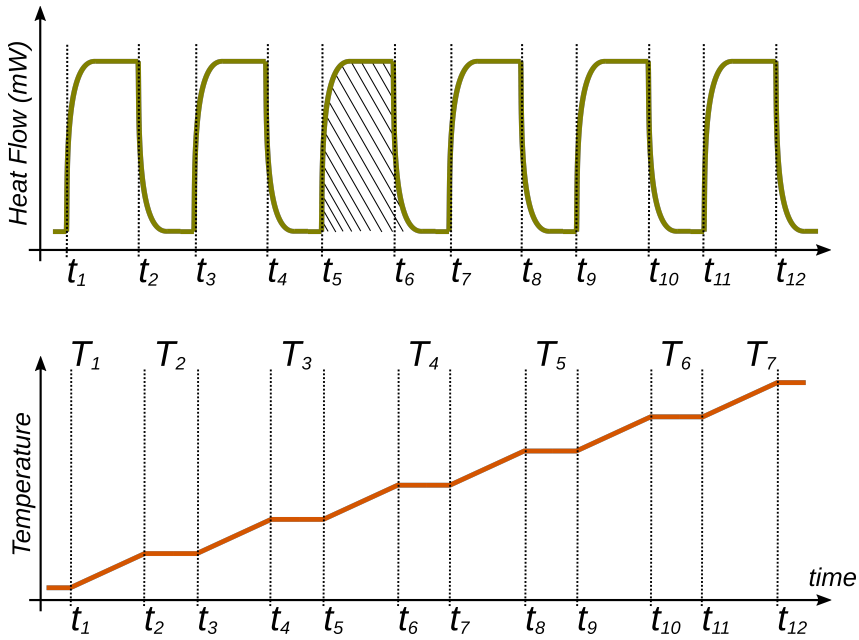

Figure 1.7: Scheme of a typical set of DSC ramps to determine specific heat capacities. Green line describes the heat flow between reference and sample cells. Orange line describes the temperature scan ramps. Each step-like curves in green line determine an area by integration (*i.e.* striped area in third step-like peak).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

As previously noted, using the procedure of the scan rate in temperature, the specific heat capacity of a sample can be measured if we have a well known reference. In this case, some hypotheses must be adopted; the first is to assume that the c_P is constant in a small

temperature range. The second one is to use a slow scan rate to remove or minimize the thermal lag effects. Then, consecutive short ramps of temperature were carried out, each one showing a step-like heat flow (see figure 1.7). This procedure should be carried out in three experiments using the same set of thermal ramps: empty-empty, reference-empty and sample-empty. Figure 1.8 shows an example of superposing of heat flow of one ramp in a c_P experiment for the three previously noted scenarios. A math relation between areas and amount properties of reference and sample gives us the values of c_P:

$$c_P^S(T_j) = \frac{\int_{T_i}^{T_{i+1}} HF_S dT - \int_{T_i}^{T_{i+1}} HF_B dT}{\int_{T_i}^{T_{i+1}} HF_R dT - \int_{T_i}^{T_{i+1}} HF_B dT} \frac{m_R}{m_S} \frac{MW_S}{MW_R} c_P^R(T_j) \tag{1.5}$$

where $HF_{S,B,R}$ are the heat flow values for sample (S), blank (B) and reference (R). T_i and T_{i+1} are the initial and final temperature values for the i^{th} ramp, m_R and m_S are the reference and sample masses in gr, MW_R and MW_S are the reference and sample molecular weights in gr/mol and $c_p^S(T_j)$ and $c_p^R(T_j)$ the specific heat capacities of the sample and reference at T_j, where $T_j = T_i + ((T_{i+1} - T_i)/2)$ and j is the label of some step-like peak (see figure 1.7).

Due to its recurrent use, we present the characteristics and general ways of proceeding of one of the DSC devices. Setaram Micro DSC-III heat flux microcalorimeter with Hastelloy batch vessels (900 μL) was used to determine the calorimetric behavior of lipid bilayers of systems formed by DPPC-based liposomes. Temperature scans between 20 to 50 °C at 0.1 °C/min of heating/cooling rate were done. The reference cell was filled with deionized water whereas the sample cell contained the liposomal suspension. Enthalpograms were analyzed using Calisto Setaram Software, subtracting baselines to obtain critical temperatures, enthalpies, and the peak width.

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

The previously described method of the preparation of liposomes was used in Chapter 2 and Chapter 3 of Part II: *Exploring the lipidic structures: doping with gemini and poration with PEI* and *Applications of cationic liposomes*.

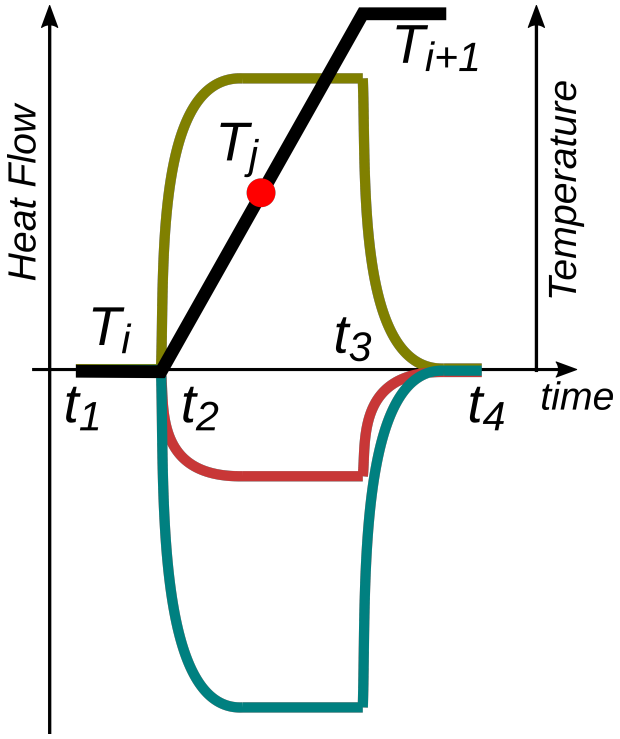

Figure 1.8: Scheme of a step-like peaks in a c_P measurement for empty-empty (red line), empty-reference (blue line) and empty-sample (green line). T_j and $T_{i,i+1}$ are labelled according to Eq. 1.5.

1.4 Dynamic light scattering (DLS)

Dynamic light scattering (DLS) techniques are based on the phenomenon of elastic Rayleigh scattering. Briefly, when radiation, of wavelength on the order of the particle size, interacts with such a particle, elastic scattering of the radiation could occur in addition to inelastic interactions. Using low-divergence visible monochromatic radiation applied to a dispersion of nanoparticles, the scattered intensity is measured at a fixed angle (see figure 1.9). This light scattering is related to the movement of the nanoparticles.

Figure 1.10 shows a schematic of two different time correlation functions of light elastically scattered by nanoparticles at two different speeds. It can be seen that when the nanoparticles go fast, the temporal correlation of the elastically scattered light lasts a short time (t_1), while the nanoparticles go slow implies that the temporal correlation func-

USC
DE COMPOSTELA

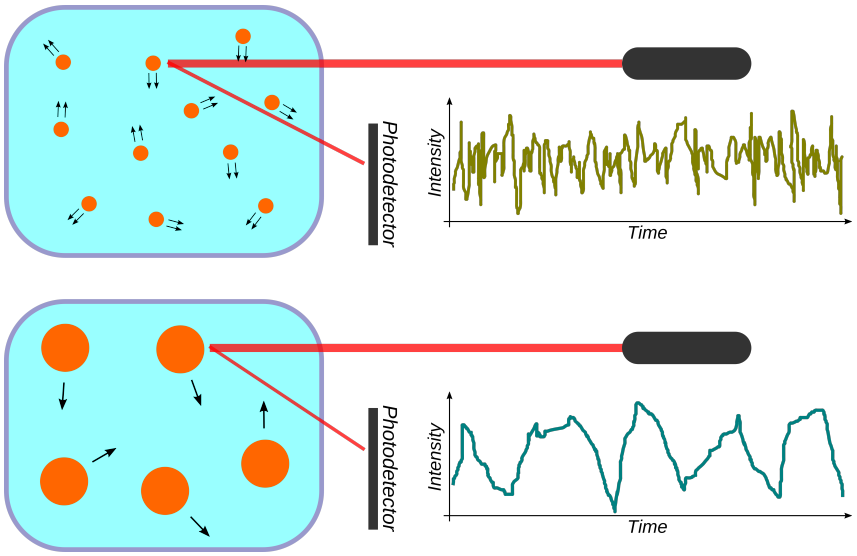

Figure 1.9: Scheme of a dynamic light scattering process to determine the size and polydispersity of a nanoparticle dispersion.

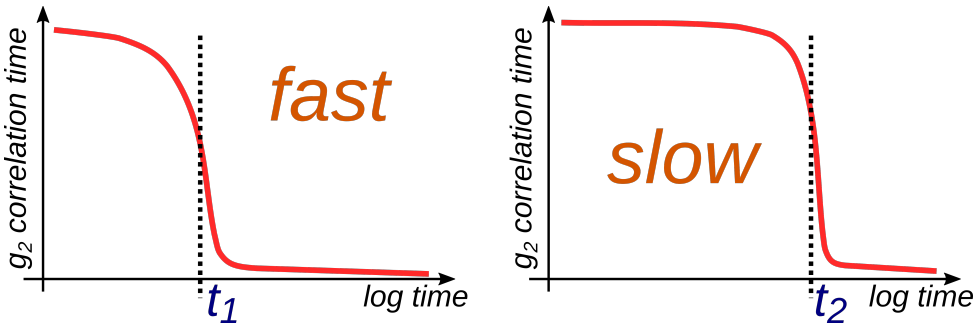

Figure 1.10: Mock time correlation functions of a small (fast) and big (slow) dispersion of nanoparticles.

tions last longer ($t_2 > t_1$). The corresponding correlation function g_2 is mathematically constructed with the following mean values:

$$g_2(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau)\rangle}{\langle I(t)^2\rangle} \tag{1.6}$$

where I is the intensity detected, t the time and τ the time variable $\tau \in [0, t]$. Suppose that the velocity of a given nanoparticle in dispersion is due to the Brownian motion in the absence of external fields. In that case, it is possible to relate the correlation times to structural parameters such as the hydrodynamic radius. From the time corre-

lation function, the translational diffusion coefficient is derived. The nanoparticle size and polydispersity (PDI) were estimated using a spherical approximation by applying the Stokes-Einstein equation:

$$d_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} \tag{1.7}$$

where k_B is the Boltzmann constant, T the temperature, η the viscosity, D the diffusion coefficient and d_H the hydrodynamic diameter. A cumulants analysis of the correlation function complements the determination of the parameters, both size and PDI.

Using the same fundamentals complemented with other properties of the colloidal dispersion, it is possible to determine the electrical characteristics of the nanoparticles. The surface of a nanoparticle describes an interface that separates the bulk of the nanoparticle from the bulk of a dispersive medium. This boundary phenomenon translates into the electrical properties of the nanoparticle by the presence of a surface charge density (SCD). The coions and counterions for this SCD describe a layer-by-layer complexation above the surface of the nanoparticle until the equilibrium with the bulk ions concentration is reached, representing a slipping plane around of nanoparticle. The energy involved in carrying out a single charge from the infinite to the slipping plane is the electrostatic potential known as Zeta potential. The nanoparticle dispersion is exposed to an electric field to measure the Zeta potential. A Zetasizer Nano ZS apparatus (Malvern Instruments Ltd., UK) was used with our Z potential measurements. The Malvern Nano ZS uses a combination of laser Doppler velocimetry and phase analysis of light scattering (PALS) using a registered technique called M3-PALS to determine the electrophoretic mobility of the nanoparticles. By applying Smoluchowski's model, the zeta potential of nanoparticles dispersed is estimated:

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(\kappa a)}{3\eta} \tag{1.8}$$

where U_E is the electrophoretic mobility, ε is the dielectric constant, ζ is the zeta potential, $f(\kappa a)$ Henry's function. The value of the Henry function is a function of the thickness of the electrical double layer (λ_{EDL}), if λ_{EDL} is much smaller compared to the particle radius, which can be due to liposomes within aqueous solutions of physiological salt concentration (10^{-4} M)[143, 144], the value of f(Ka) is taken as 1.5 and the Henry's equation then modifies into the Smoluchowski approximation. η is the viscosity.

The previously described method of the preparation of liposomes was used in Chapter 2 and Chapter 3 of Part II: *Exploring the lipidic structures: doping with gemini and poration with PEI* and *Applications of cationic liposomes*.

1.5 *In silico* Molecular Dynamics

The computational power available nowadays has been made it possible to solve differential equations in systems formed by many bodies under interaction. Particularly, in silico procedures have been extensively developed to solve the dynamics at the molecular level. Briefly, these kinds of the process are based on a simulation cell composed of atoms under certain initial conditions: potential interaction (V) as a function of each atom position, and position ($\vec{r}$) and velocity ($\vec{v}$) of the atoms in the system. With this defined system, it starts a loop step sequence whose purpose is to obtain the temporal trajectories of the atoms. Figure 1.11 shows a step-by-step scheme in a typical molecular dynamics computation. It starts with the calculation of the force on an atom:

$$\vec{F}_i = -\frac{\partial V}{\partial \vec{r}_i} \tag{1.9}$$

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

where $\vec{F}_i$ is the ith on atom force, V is the potential energy, and $\vec{r}_i$ is the position of the ith atom. This force is computed by calculating the force between non-bonded pairs of atoms:

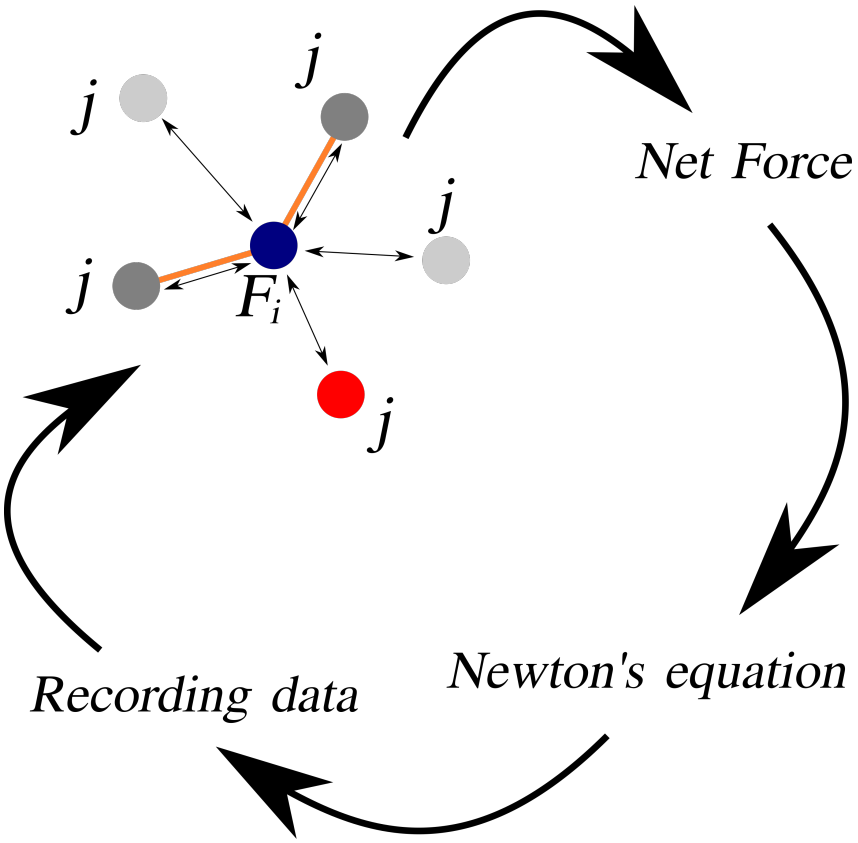

Figure 1.11: Scheme of the simplify routine in a molecular dynamics simulation. $\vec{F}_i$ is the force on the ith atom, and j are the neighbours. The orange lines represent a example of bonds.

$$\vec{F}_i = \sum_{j \neq i} \vec{F}_{ij} \tag{1.10}$$

also, it is necessary to include the forces due to bonded interactions, and the restrains and the external forces. So, the potential and kinetic energies may be computed.

Next, the movement of the atoms are simulated by solving Newton's equation of motion:

$$\frac{\mathrm{d}^2 \vec{r}_i}{\mathrm{d}t^2} = \frac{\vec{F}_i}{m_i} \tag{1.11}$$

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

where $\vec{r}_i$, $\vec{F}_i$ and m_i are the position, force, and mass of the ith atom, and t the time. Finally, an output step writes the positions, velocities, or energies in data files.

From the initial configuration, the force calculation and solution of equations of motion are carried out in a loop in the required number of steps.

Due to the particular use of the molecular dynamics to lipid bilayer systems, it will be showed the methodology used. A solvated bilayer of 132 DPPC lipids was assembled with CHARMM-GUI Membrane Builder[145–151]. We used TIP3P[152] water molecules which satisfies a reasonable DPPC/water molecules ratio of approximately 1/45[153]. We use GROMACS[154] functions to insert the desired molecules in the inner part of the lipid bilayer; likewise, the final system was neutralize by adding two chloride or sodium ions in the aqueous part. We carried out GROMACS runs at different temperatures. Each run was previously minimized for 5000 steps in a step-descend algorithm routine. A pair list with buffering was generated by Verlet cutoff-scheme[155], with a cut-off distance for short-range of 1.2 nm. We set Van der Waals type interaction with a cut-off on 1.2 nm, with a vdW-modifier of force-switch between 1.0 nm and previous cut-off. Coulomb interactions were implemented by Particle-Mesh Ewald method (PME)[156], with a cut-off set on 1.2 nm. The bonds with H-atoms were converted to constraints by the LINCS algorithm[157]. The canonical (NVT) and isothermal-isobaric (NPT) ensemble equilibrations were carried out for 20 ns. We have selected Berendsen-thermostat[158] to set the temperature coupling and a reference temperature for coupling of 1K. The Berendsen exponential relaxation pressure coupling was selected using semi-isotropic conditions due to the symmetry of our systems, in which the Z-axis is normal to the lipid bilayer. The simulations were run more than 100 ns; while the temperature coupling was implemented by the Nose-Hoover extended ensemble[159, 160]. Likewise, the pressure coupling was set by Parrinello-Rahman extended ensemble[161]. We use VMD software for visualization; in addition, GROMACS functions and Python scripts were used to analyze the trajectories.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.6 Langmuir Balance

Based on the surface tension modifications, the fundamental of the Langmuir balance is to measure the variations of the surface pressure by surface tension differences during a compression procedure of the interface. Figure 1.12 shows a schematic of the typical system in a Langmuir balance. A monolayer is seeded in the air/water surface of a water bulk, called *subphase*. The pressure variation is measured with a dynamometer in contact with the monolayer, both varying the compression by a barrier as titrating in the subphase some solute to interact with the monolayer.

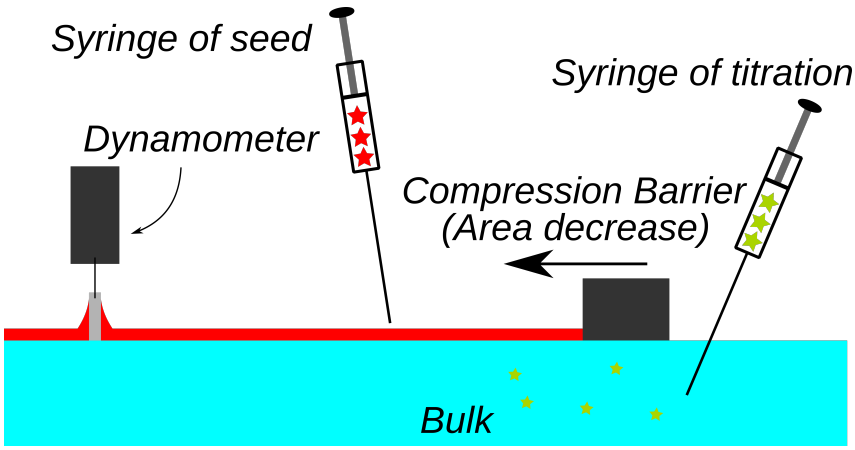

Figure 1.12: Scheme of measurement operation in a Langmuir balance based system.

The Langmuir monolayer experiments were carried out with a NIMA 601 (Coventry), with a total monolayer area of 525 cm^2. The balance is placed on an antivibration table. The dynamometer is based on a Wilhelmy plate made from chromatography paper as a pressure sensor in contact. After spreading from a chloroform solution, the monolayer was left for 10 minutes to ensure the solvent evaporation, and afterwards, the compression was initiated with the barrier speed 15.6 A^2/(molecule min). The Langmuir balance was used in Chapter 2 of Part II: *Exploring the lipidic structures: doping with gemini and poration with PEI.*

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1.7 Confocal Laser Scanning Microscope

The microscopy confocal fluorescence is based on the possibility to resolve the focal point in the Z-axis during a fluorescence experiment. Figure 1.13 shows a schematic representation of a microscopy confocal fluorescence measurement. A light of controlled wavelength is projected into a focal point by a determined objective lens position. Then, the emission light is captured by a detector. The emission intensity can be obtained by varying the situation in the Z-axis of the objective lens. The confocal microscopy also allows the exploration of the XY plane of the sample.

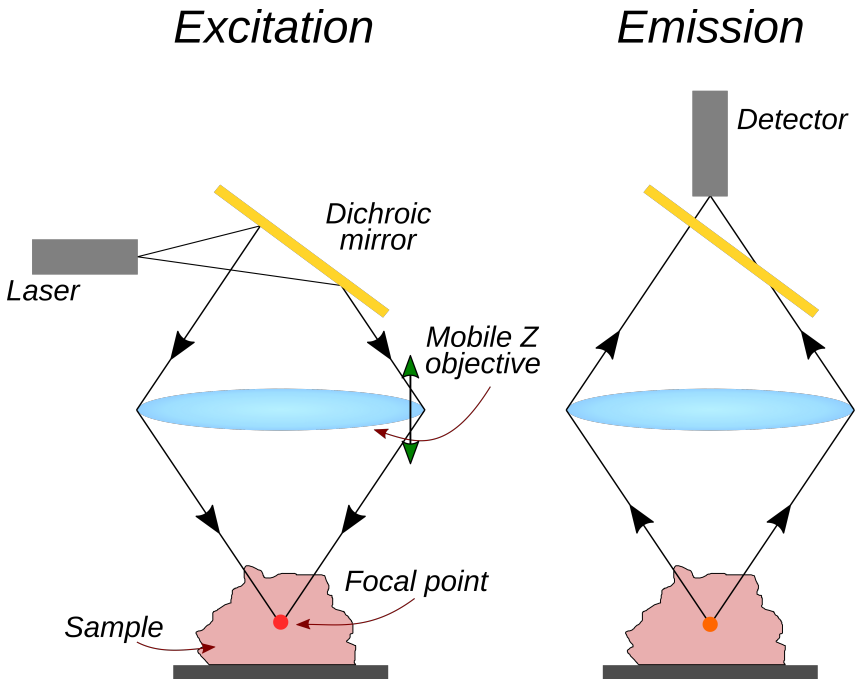

Figure 1.13: Scheme of measurement fundamentals in a confocal laser scanning microscope.

During our measurements, the cellular internalization and distribution of determined fluorophore were carried out using a confocal laser scanning microscope (CLSM) TCS-SP5 and TCS-SP8 (Leica Microsystems).

The protocol to observe the perinuclear accumulation and internalization of PEI in HeLa cells was carried out as follows. The HeLa cells were seeded on poly-L-lysine coated glass coverslips (12×12 mm) placed inside 6-well plates (3 mL, 5×10^4 cells/well) and

grown for 24 h at standard culture conditions (5%) CO_2 at 37 °C) in DMEM supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 1% Pen Strep, 1 mM sodium pyruvate, and 0.1 mM NEAA. Afterwards, labelled PEI was internalized to cells (200 μL) and incubated for 6 h at standard culture conditions. At 6 h post-internalization, the culture medium containing the labelled PEI was exchanged for a fresh medium. Cells were washed and stained at an appropriate time for visualization whit Hoechst (cell nucleus) and Bodipy Phalloiding (cytoplasm). Briefly, 350 μL of paraformaldehyde (4% w/v in 1×PBS) were added to each coverslip, incubated for 10 min, and washed with 1×PBS. Then, 350 μL of a Triton X-100 solution (0.1% w/v in 1×PBS) were added, incubated for 10 min, and washed with 1×PBS. Then, 200 μL of Bodipy PHalloidin 650/665 (5% v/v in 1×PBS) were added, incubated for 20 min, and washed with 1×PBS. Then, 200 μL of a Hoechst solution (1:4000 v/v in 1×PBS) were added, incubated for 5 min, and washed with 1×PBS. Finally, the surface exposed the coverslips with cells attached to one drop of antifade reagent Vectashield© and mounted onto microscope slides with cells sandwiched in between. Once mounted onto the slides, cells were stored at 4 °C in darkness for at least 12 h before visualization. Excitation lines of 405 (observed at 425-475 nm), 488 (observed at 500-550 nm), and 633 nm (observed at 650-725 nm) were employed for visualization of the cellular nucleus (stained with Hoechst), Oregon Green-labeled PEI, and cytoplasm (stained with Bodipy Phalloidin), respectively. All experiments were carried out in duplicate, and images were acquired in CLSM TCS SP5 (Leica Microsystems).

The protocol to perform confocal microscopy measurements of in vitro internalization of Nile Red cationic liposomes (NR-C Liposomes) in MDA-MB-231 breast cancer cells was carried out as follows. MDA-MB-231 cell line was kept in culture on tissue polystyrene (TCPS) in DMEM with high glucose (4.5 g·L^{-1}) with phenol red, supplemented with 10% (v/v) FBS and 1% (v/v) of antibiotic/antimycotic solution (10000 unit/mL penicillin G sodium, 10000 unit/mL streptomycin sulfate and 25 mg/mL amphotericin B) at 37 °C in 5% humidified atmosphere. Upon confluence, cells were detached with TrypLE Express^{TM} (5 min, 37 °C in a 5 % humidified atmosphere) and subcultured. For internal-

USC DE COMPOSTELA

ization assays, cells were detached using 4 mM of EDTA (10 min at 37 °C in a 5 % humidified atmosphere) and seeded at 5×10^4 cells/well in 6-well plates. The internalization of NR-CLiposomes was evaluated under three conditions: NR-CLiposomes in suspension, surface-exposed liposomes and embedded liposomes in LbL constructs (see results and procedures in part II). To evaluate de the internalization of NR-CLiposomes in suspension, MDA-MB-231 cells were seeded on TCPS for 24 h and then the NR-CLiposomes at a concentration of 150 μM of DPPC (keeping the ration DPPC/gemini/NR as is determined in the formulation procedure methodology) were added to the culture. To evaluate the internalization of surface-exposed and embedded liposomes and cell adhesion, MDA-MB-231 cells were seeded on these substrates. After incubation periods of 1 h, 3 h and 7 h, the cell culture medium was removed, and cells were fixed with 10% formalin at 4 °C for 1 h. Nucleus and cell glycocalyx were counterstained with DAPI (1 μg·mL^{-1} in PBS) and wheat germ agglutinin Alexa Fluor© 488 conjugate (1.25 μg·mL^{-1} in PBS), respectively. Coverslips were mounted with Vectashield© mounting medium (Vector Laboratories); all experiments were carried out in triplicate, and images were acquired in CLSM TCS SP8 (Leica Microsystems).

The protocol to carry out the confocal microscopy images of the hydrogels loaded with NR-CLiposomes in the part III was carried as follows. An oil objective of 63X and a red channel for Nile Red (550 nm excitation and 620 nm emission) was used to capture the images. The methacrylate hyaluronic acid hydrogels loaded whit NR-Liposomes was sliced with a scalpel and deposited onto a glass slide to obtain the microscopy images. All experiments were carried out in triplicate, and images were acquired in a Leica DMI60000B equipped with a DFC3665FX camera (Leica Microsystems).

1.8 Fluorescence Spectroscopy

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

The fluorescence emission is an inelastic light scattering phenomenon. After electronic excitation of an atom, molecule or nanostructured energy state, the relaxation goes to

another energy state. The emission wavelength will differ from the excitation (see figure 1.14).

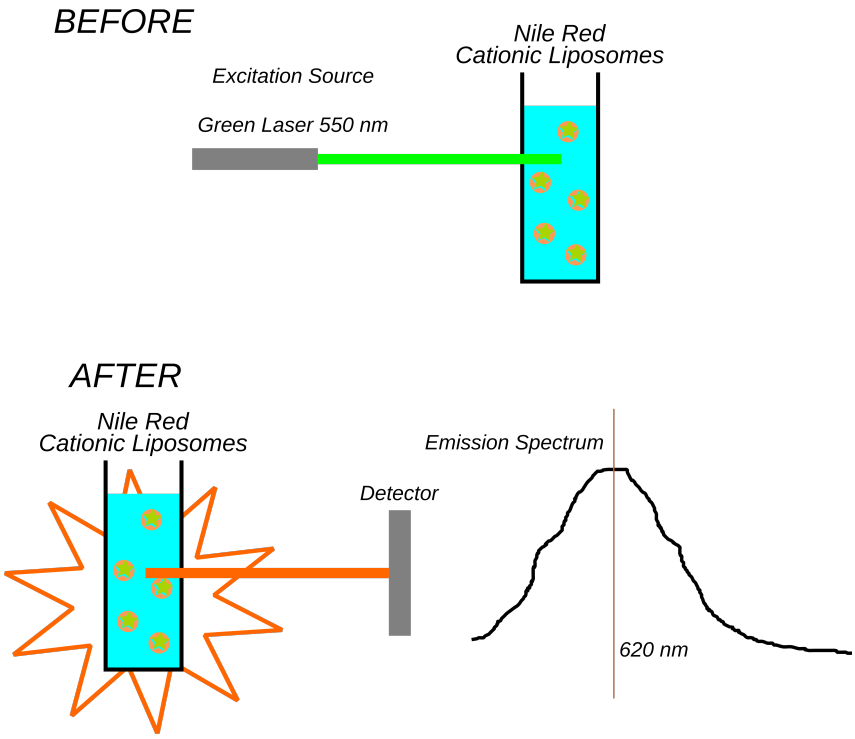

Figure 1.14: Scheme of measurement fundamentals in a typical configuration of a spectrofluorometry measurement.

There are many properties related to fluorescence; due to its relevance in our results, we will explain some of that. The solvent around a determined molecule could modify some levels of the molecular orbital states, modifying the nature of an eventual scattering by fluorescence. Such as the case of Nile Red, this molecule of 318.4 gr/mol has valuable properties in biotechnology. The increase of the relative solvent polarity implies a shift of the emission maximum to higher wavelengths, called the bathochromic effect. As the relative polarity of the solvent increase, a redshift in the emission spectra is shown. Moreover, in the limit case of the water solvent, the emission spectra of the Nile Red vanishes, the water provokes fluorescence quenching in the Nile Red.

The tracking of the intensity values of the emission wavelength allows us to generate a calibration line by relating the concentration with the intensity. The release profiles

of the Nile Red were carried out using DMSO (relative to water polarity 0.44). Due to its properties to degrade the LbL constructs, the calibration line was generated in DMSO solvent. Figure 1.15 shows the emission spectra of the Nile Red in DMSO and the calibration line. As a relevant note, the maximum of the emission spectra of Nile Red in chloroform (relative to water polarity 0.26) was placed on 587 nm. When the Nile Red was included in the lipid bilayer of cationic liposomes, the maximum of the emission spectra was set at 596 nm.

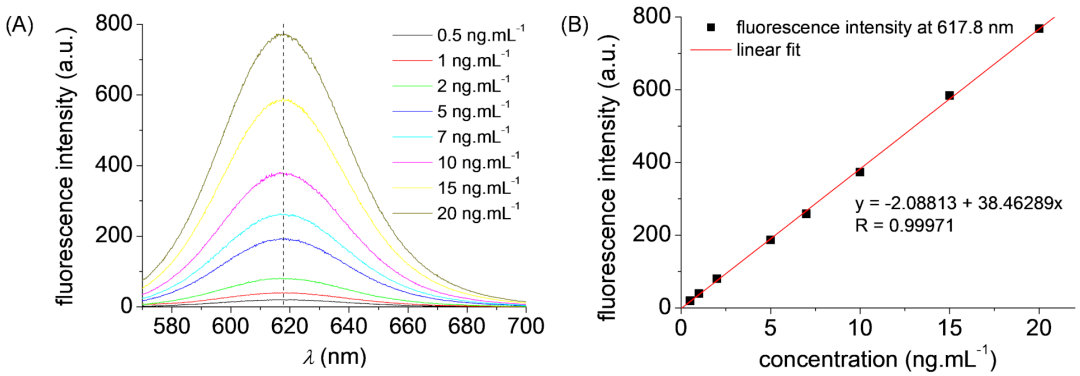

Figure 1.15: a) Emission spectra at different concentrations of Nile Red in DMSO. b) calibration line of Nile Red in DMSO with data of fluorescence intensity at 620 nm.

Also, the quenching phenomenon could appear due to the dimerization, or self-interaction, between the determiner fluorophore molecule. Such as the case of the 6-Carboxyfluorescein, which is a high water-soluble molecule of a 376.3 gr/mol. In that case, the high local concentration of that molecule implies the quenching of fluorescence. This mechanism is used to encapsulate the carboxyfluorescein in the aqueous core of liposomes. If the molecules are placed inside the liposome, the concentration is so high that the fluorescence is quenched. If some event breaks the lipid bilayer or partially degrade it, the carboxyfluorescein will be released, and fluorescence will appear. That fluorescence has an excitation wavelength of 490 nm and an emission at 520 nm. The experiments to analyze the fluorescence emission spectra of Nile Red in Part III were carried out using a Jasco FP 8500 (Jaco, Inc.). The experiments to analyze the fluorescence emission spectra of the carboxyfluorescein (part II) were carried out using a PTI QuantaMaster

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Luminescence spectrofluorimeter.

1.9 High-Performance Liquid Chromatography *plus* UV-vis adsorption

The release profiles determined in part III, concerning to the retaining and release efficiency of the cationic liposomes loaded with dexamethasone (DEX-CLiposomes), were constructed by data from High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). The HPLC is a versatile and powerful technique based on chromatography columns to separate solutes by elution. At the exit of the column, a photometric detector allows us to identify and quantify a certain solute in the initial sample. The elution of a determined solute occurs under the same column conditions; each kind of solute will go out from the column in different moments.

The advantage is being able to quantify very small amounts of solute. In the release experiments of DEX, the aliquots from the dialysis had a minimal amount of DEX, and a typical UV-vis spectrophotometer can not determine the adsorption spectra. In our cases, a Jasco LC-4000 HPLC was used, equipped with a pump PU-4180, a UV-vis detector in 200-600 nm, an oven CO-4061, and an autosampler AS-4150. The chromatography column used was a Luna© C18, of 250×4.6 mm and 5 μm of particle size. The measurements were carried out with an isocratic elution method, using a mobile phase with acetonitrile-water (55:45 % v/v), with an operation flux of 1.0 mL/min, with a 5 μL volume per injection. The tracked wavelength was 242 nm, the maximum in the absorption spectra in DEX.

1.10 Quartz Crystal Microbalance with Dissipation

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

The piezoelectric response of the quartz makes it possible to monitor variations in the thickness of a thin piece of crystal at the molecular level. The operating principle is based on the Sauerbrey equation:

$$\Delta f = -\frac{n}{C}\Delta m \tag{1.12}$$

where Δf is the variation in the resonance frequency, Δm is the variation in the deposited mass, n is the number of the harmonic used and C is a mass sensitive constant related to the quartz properties. Figure 1.16 shows a scheme of the measurement process in a typical quartz crystal microbalance configuration. Briefly, the quartz crystal film is connected to an alternating voltage, and the piezoelectric phenomenon transforms the electrical signal in longitudinal waves along the sensor. The fundamental frequency (f_0) -and its harmonic multiples- depends on the thickness of the quartz film, so modifying the surface of the quartz shifts in the fundamental frequency are provoked. Also, coupling a feedback system can measure the dissipation energy in the adsorption process, obtaining information about the mass deposited and viscoelastic properties of the new surface. In the quartz crystal microbalance with dissipation monitoring used, a layer of gold was previously deposited on the quartz surface; this procedure is desirable to promote surface biofunctionalizations due to the electrical properties of gold.

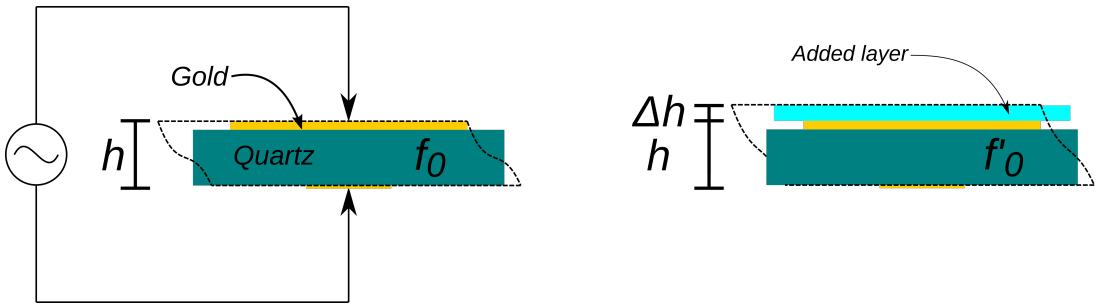

Figure 1.16: Outline of a fundamentals of a quartz crystal microbalance measurement. f_0 is the fundamental frequency of quartz for a thickness h. When a layer of thikness Δh is added a shift in fundamental frequency appears (f_0').

A quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (Biolin Q-Sense E4 model, Sweden) was used to follow in real-time the deposition of layers of poly-L-lysine (PLL), hyaluronic acid (HA) and cationic DPPC-based liposomes. Aqueous PLL and HA solutions (at 1 mg·mL^{-1}) and a suspension of cationic liposomes were prepared in 0.15 M

NaCl at pH 7.4. The solutions of PLL and HA were injected alternately into flow chambers containing gold-coated quartz crystals oscillating at a fundamental frequency of 5 MHz, and its overtones (15, 25, 35, 45, 55 and 65 MHz) at a constant temperature of 25 °C to assemble three bilayers $(PLL/HA)_3$. The flow was assisted by a peristaltic pump operating at 50 $\mu L \cdot min^{-1}$ until a plateau was reached. After each deposition, a 0.15 M NaCl rinse step was performed for 10 min to ensure a baseline and to confirm the stability of the added layer. In the last stage, an overlayer of cationic liposomes was deposited at the same conditions. The complexation of the added layers onto the gold surface of the crystals was detected by observing the acoustic variations of frequency ($\Delta f = f_0' - f_0$ in figure 1.16) and the dissipation.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2 Synthesis procedures

2.1 Preparation of liposomes

The procedures for preparing liposomes are multiple. The most common focus on the dispersion of lipids in an aqueous phase. To reach that, traditionally, two methodologies are employed. To force the dispersion of the lipids by sonication, vortex and thermal shocks or assist the dispersion by an organic phase. The first methodologies have the advantage of the control the concentrations and avoiding the use of organic solvents; the handicap is the use of heavy thermal shocks between, typically, -196 to 60 °C. Methodologies assisting the lipid bilayer formation by organic solvents are more extended; their advantages are quickness and versatility. Their handicap is that the very use of organic solvents introduces traces of that in the final formulations and a loss of control over the concentrations due to sample crossings. Throughout the experiments of this thesis, we will use methodologies based on to assist the dispersion of the lipids by organic solvents.

Figure 2.1 shows a representation of a rotary evaporation system. Initially, a defined amount of lipid is weighed and deposited on a glass bulb, typically to reach a final concentration up to 1 mM in the aqueous dispersion. Then, an organic solvent -i.e. chloroform, or chloroform:methanol 3:1- is added to the glass bulb. At this moment, the Nile Red, Dexamethasone or gemini surfactants will be added in the determined molar ratio with the lipid amount weighed. As the lipid has a high solubility in organic solvents, immediately, the lipid was dispersed in the chloroform. The glass bulb is coupled to the rotary evaporator, activating the rotor. It is essential to note the need for a rotary velocity

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

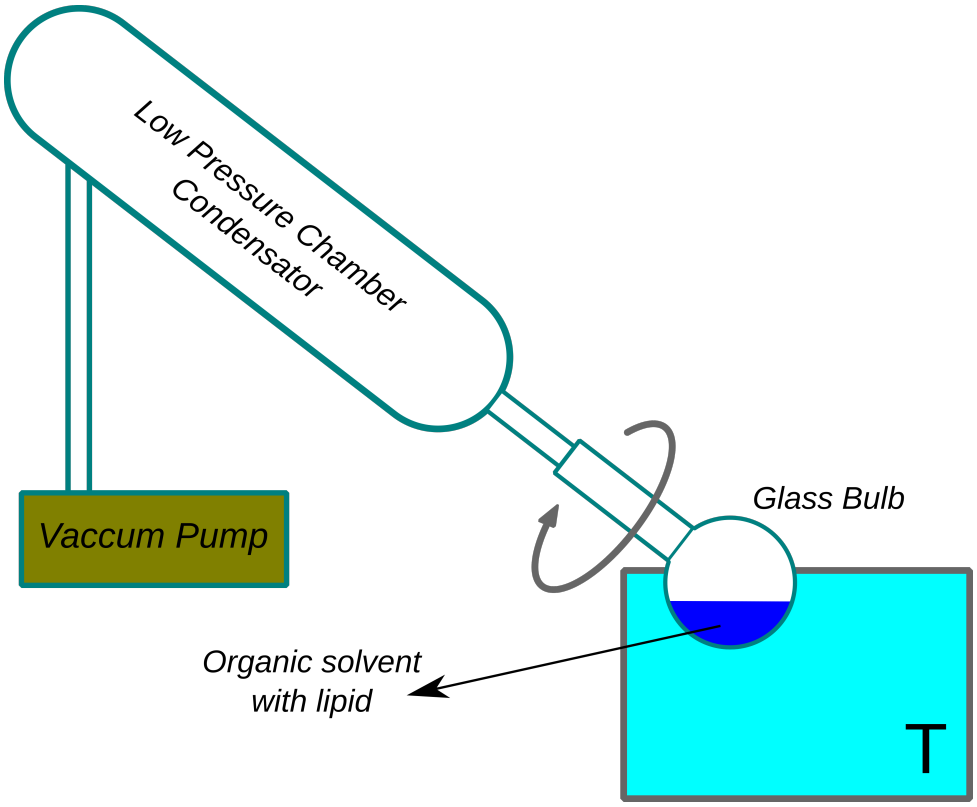

Figure 2.1: Scheme of rotary evaporator system used to remove the organic phase to generate a thin film of lipid in a glass bulb. The bulb is submerged in a thermal bath at controlled temperature (T).

between 200-300 rpm. Slow rotary velocity will imply cavitation bubbles in the chloroform, which provoke inhomogeneities in the thin film. High rotary velocity will cause the chloroform to wet too much of the surface, producing inhomogeneous thin films. While the rotation, the bulb is submerged in a thermalized bath, which temperature should be higher than the melting temperature of the lipid. Thereby, the evaporation of the organic solvent and the homogeneous distribution of the lipid in the inner surface of the glass bulb is assisted. For an initial quantity of around 10 mL of chloroform, a temperature of thermal bath near to 60 °C and a vacuum pressure inside the evaporator of 10 mba, 20 minutes are enough to remove the chloroform. Finally, the glass bulb is conditioned to the lab pressure by a slow and gradual process during 1-2 minutes; this procedure will avoid water condensation in the inner part of the bulb glass. Next, the bulb glass is kept

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

in room conditions, in a dry environment, for at least 15 minutes. So, the possible traces of chloroform will be removed by dry stored of the bulb overnight. If some molecule with poor water solubility is desired to load in the lipid bilayer, adding the determined amount of that species together with the lipid in the chloroform bulk of the glass bulb would be preferred.

Finally, it should be observed a homogeneous thin film deposited in the inner side of the glass bulb. Now, a certain amount of water -or some aqueous medium- is added to the glass bulb when it is immersed in an ultrasonic bath for 10 min. Normally a volume of 10 mL is added. The temperature of the sonication bath should be higher than the melting temperature of lipid to promote the closing of lipid bilayer formation, therefore the liposomes.

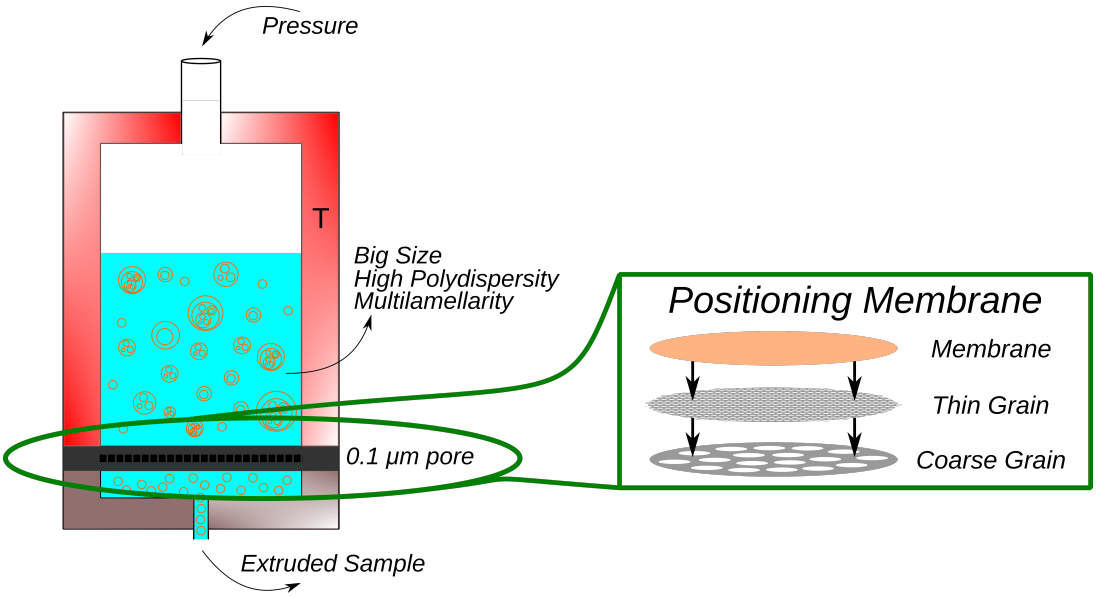

Figure 2.2: Scheme of extruder identifying the main parts involved in the extrusion process.

The polydispersity, size and multilamellarity of the liposomes can vary depending on the lipid selected or the possible species included in the liposome formulation. A protocol based on extrusion will allow us, if necessary, to reduce the size and multilamellarity or control polydispersity. The extruder is a device based in a closed chamber connected to a high-pressure line (see figure 2.2); the temperature of the walls of the extruder is

controlled. In the inner part of the extruder, there is a cylindric hole couple with a pressure line for one side and in contact with a microperforated membrane system for another side. The selected membrane (i.e. polycarbonate 0.1, 0.2 or 0.4 μm) is placed above a thin grain perforated metallic membrane, which is placed above a coarse grain perforated metallic membrane. This colocation procedure, represented in figure 2.2, tries to avoid the disruption of the membrane during the extrusion. The sample of liposomes from the sonicator is placed in the cylindric hole of the extruder. The temperature of the extruder is set to a value more than the melting temperature of the used lipid. Finally, a pressure of 10 ba is applied, the sample crosses the membrane and is channelled by a tube to a vial. This process is repeated several times, depending on the kind of liposome that we will use and the size of the pore of the microperforated membrane. For example, using DPPC and a membrane of 0.1 μm, five repetitions of the extrusion are enough to guaranty a small size, low polydispersity and monolamellarity.

The previously described method of the preparation of liposomes was used in Chapter 2 and Chapter 3 of Part II: *Exploring the lipidic structures: doping with gemini and poration with PEI* and *Applications of cationic liposomes* sections.

2.2 Preparation of Hydrogels

The first step in synthesising the used hyaluronic hydrogels (HAMA) implies the methacryloylation of hyaluronic acid (HA). The methacrylate (MA) HA was performed by adding dropwise 1.1 mL of MA at 1% (v/v) to 100 mL of a 1% (w/v) HA solution in PBS buffer, pH 7.4, at 4 °C, and under magnetic stirring for 24 h. The pH of the solution was dept between 8-10 with the addition of 5 M NaOH until no further pH changes were detected, which indicated the reaction was completed. The solution was dialyzed for 4 days with a 12-14 kDa membrane in deionized water at 4 °C. HAMA were frozen in liquid nitrogen lyophilized, and the obtained powder material was stored at -20 °C until further use. The degree of methacryloylation (DoM) of HAMA was evaluated by proton nuclear

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

magnetic resonance (^{1}H NMR). ^{1}H NMR spectra of 30 mg/mL of HA and HAMA were acquired using a Bruker DRX 500 (Bruker, Billerica, MA, USA) 400 MHz spectrometer in deuterium oxide. The DoM was obtained using the ratio of the area of methacryloylate protons (5.6-6.2 ppm) regarding that is HA methyl protons (2.0 ppm)[162–164], using the following equation:

$$DoM = 100\% \times \frac{\text{methacryloylation protons}}{\text{methyl protons of HA}} \tag{2.1}$$

Pure hydrogels were prepared at HAMA (5% w/v) concentrations. Briefly, hydrogels were produced by mixing the polymer precursor in PBS at 37 °C with 0.5% (w/v) of Irgacure© 2959 photoinitiator. The polymeric mixture was poured into fabricated PTFE moulds (15 mm diameter, 40 mm height). The curation was carried out with UV light at 365 nm (4 W/cm^2) for 15 min.

2.3 Gemini surfactants synthesis

The gemini surfactants 1,4-Bis(tetradecyl trimethyl ammonium) butane (GS4), 1,6-Bis(tetradecyl trimethyl ammonium) hexane (GS6) and 1,12-Bis(tetradecyl trimethyl ammonium) dodecane (GS12) were synthesized from the corresponding α,α'-dibromide, 1,4-dibromobutane, 1,6-dibromohexane or 1,12-dibromododecane (5 mmol) with anhydrous N,N-dimethyltetradecylamine (10 mmol) in 50 mL of acetone under boiling and reflux for 96 h. The material obtained after removing the solvent with a rotary evaporator (see *Preparation of liposomes* section) was crystallized from ethanol-ether. The obtained crystals (recrystallized from methanol) were then dried in a vacuum desiccator at ambient temperature to give the desired product (25% yield).

Geminis with larger spacers, GS14 and GS20, were prepared by a similar methodology using non-commercial dibromides. 1,14-dibromotetradecane and 1,20-dibromoeicosane were obtained from α-bromocarboxylic acids (8-bromooctanoic and 11-bromooctanoic acids, commercially available) by Kolbe´s electrolysis of the α-bromo carboxylic acids

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

in methanol[165].

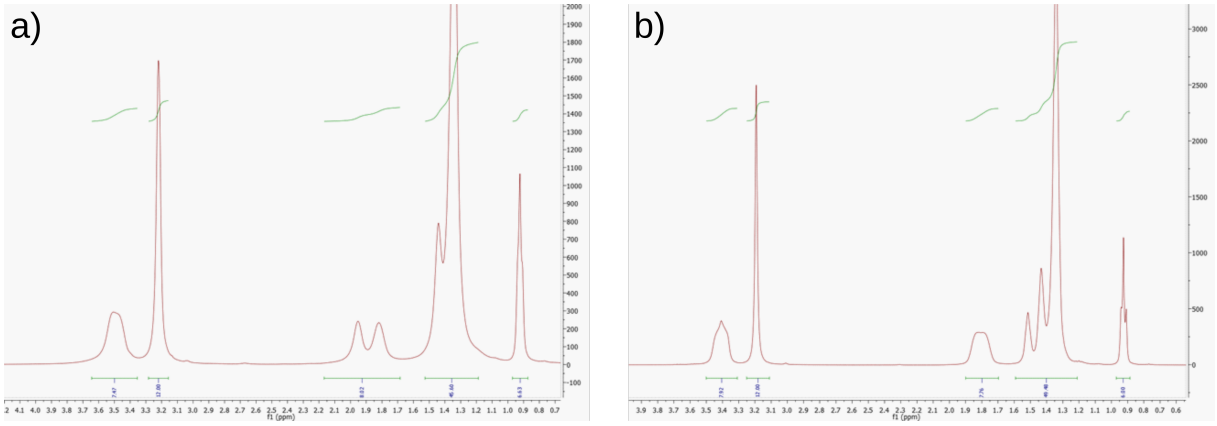

Figure 2.3: NMR spectra for the differents used gemini surfactants. a) GS4 and b) GS6

The gemini surfactants were characterized by 1H NMR spectroscopy (see figures 2.3 and 2.4). NMR spectra were measured in a Bruker Advance ARX-400 spectrometer operating at 750 and 300 MHz. The observed 1H NMR shifts (300 MHz, D2O, 25°C) for GS4 (figure 10.1a) were: δ=3.50 (m, 8H), δ=3.22 (s, 12H), δ=1.95 (m, 4H), δ=1.82 (m, 4H), δ=1.34 (m, 44H), δ=0.92 (m, 6H), for GS6 (figure 10.1b): δ=3.41 (m, 8H), δ=3.19 (s, 12H), δ=1.82 (m, 8H), δ=1.34 (m, 48H), δ=0.93 (m, 6H), for GS14 (figure 10.1c): δ=3.33 (m, 8H), δ=3.17 (s, 12H), δ=1.73 (m, 8H), δ=1.37 (m, 64H), δ=0.92 (m, 6H), for GS20 (figure 10.1d): δ=3.31 (m, 8H), δ=3.15 (s, 12H), δ=1.73 (m, 8H), δ=1.36 (m, 76H), δ=0.91 (m, 6H). The 1H NMR shifts (750 MHz, DMSO-d6, 25°C) for GS12 (figure 10.1e) were: δ=3.26 (m, 8H), δ=3.01 (s, 12H), δ=1.63 (m, 8H), δ=1.26 (m, 60H), δ=0.85 (t, 6H). These gemini surfactant were a generous gift from Prof. Luis García-Río's Group (University of Santiago de Compostela - USC), whose Lab carried out the previously reported synthesis.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

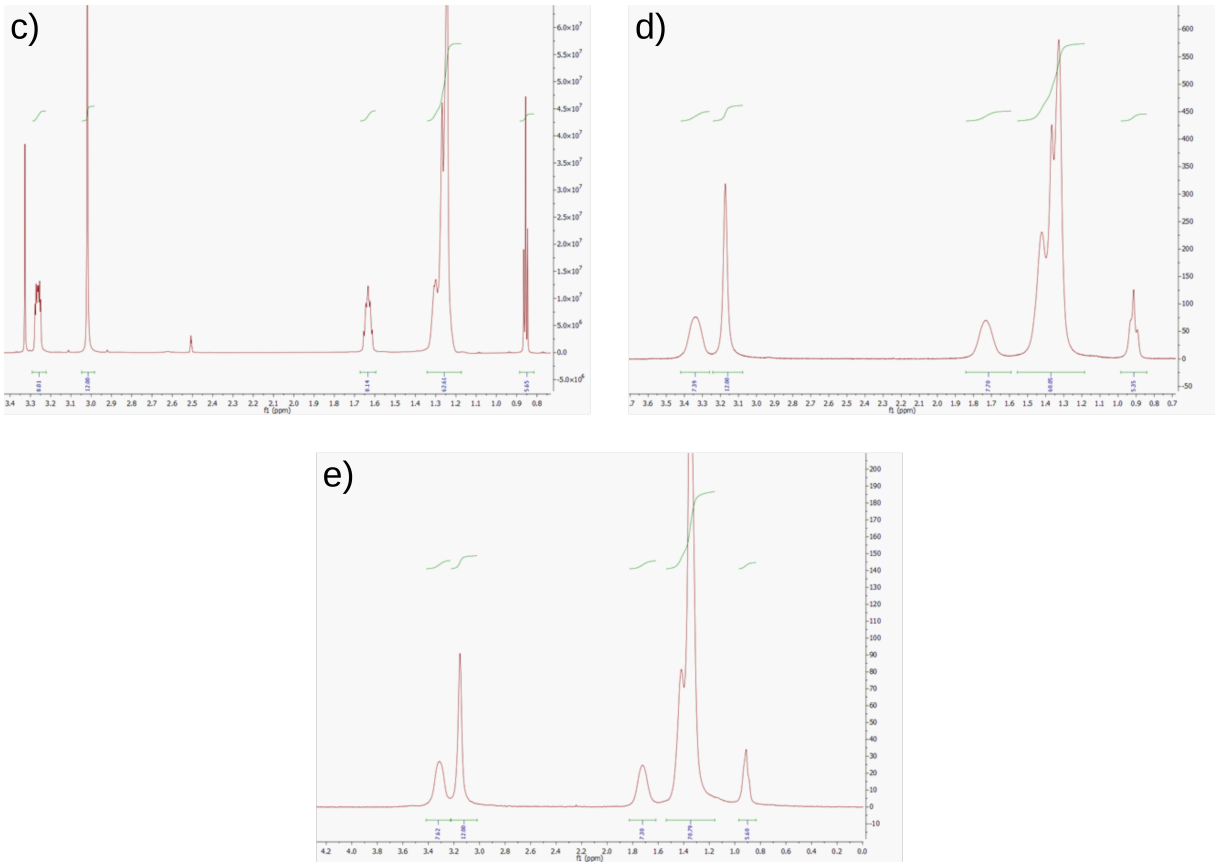

Figure 2.4: NMR spectra for the differents used gemini surfactants. c) GS12, d) GS14 and e) GS20

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3 Dialysis and Cell assays

3.1 Dialysis and Release experiments

3.1.1 Leakage of Carboxyfluorescein loaded in DMPC Liposomes induced by PEI

DMPC liposomes were prepared by extrusion following the freeze-thaw-vortex protocol[166]. This procedure entails freezing the phospholipid aqueous dispersion by immersion into liquid nitrogen, followed by thawing by immersion into 50 °C water and followed by thorough vortexing. This is an alternative method to the thin-film by organic phase assistance. The final dispersion was pre extruded by forcing it once through polycarbonate membrane filters with a nominal pore diameter of 0.8 μm, following the extrusion process explained in *Preparation of liposomes* in Chapter 2 of Part I. Then, the liposome dispersion of DMPC liposomes was extruded at least ten times through two polycarbonate membrane filters with a nominal pore diameter of 0.1 μm.

By incorporating the carboxyfluorescein into the previous formulation procedure, it has been obtained dispersion of DMPC liposomes entrapped self-quenched carboxyfluorescein (CF) (44 mM) in 70 mM NaCl, 10 mM HEPES (pH 7.4). Free CF was removed by chromatography on a Sephadex G 50 column[167], and the final concentration was estimated by spectroscopy. Liposomes were diluted in 10 mM HEPES with or without 150 mM NaCl. We monitored their integrity by recording the CF fluorescences at 520 nm (excitation at 490 nm) for 10 min at 20 °C using a PTI Quanta Master Luminescence

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

spectrofluorimeter. Increased fluorescence intensity at 520 nm measured after the addition of PEI indicated the release of vesicle-trapped CF in the bulk solution. To induce complete leakage of CF, vesicles were mixed with Triton X-100 (1%, v/v).

3.1.2 Release of Nile Red loaded in Cationic Liposomes embedded on LbL substrates

The build-up of LbL constructs with surface-exposed and embedded liposomes were replicated using negatively charged cover glasses as substrates. Cover glasses were placed on a vertical stand and submerged in containers with poly-L-lysine (PLL), hyaluronic acid (HA), or cationic liposomes loaded with Nile Red in the same sequence as in the QCM-D studies. The deposition times of each layer were set based on the QCM-D measurements (6 min for PLL and HA, 20 min for cationic liposomes, intercalated all submersion steps with rinsing with 0.15 M Na Cl for 10 min).

The assembled constructs were placed in a beaker at 37 °C with 500 mL of 0.15 M NaCl to satisfy sink conditions in the osmotic pressure. For the release studies (up to 300 min), cover glasses were taken from the beaker at different time points and dried. Then they were placed in separate containers, and DMSO (3 mL) was added to dissolve the dry LbL films deposited into already dry cover glasses. The cover glasses in DMSO are sonicated for 10 min. The amount of Nile Red in each film was determined from the intensity of the peas of the emission spectra (see *Fluorescence Spectroscopy* in Chapter 1 of Part I). The total mass of Nile Red entrapped in the LbL constructs (*i.e.*, encapsulation efficiency) was determined at time point "0 min" using the same previously film dissolution methodology, resulting approximately in 1.9 ng per coverglass.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.1.3 Release of DEX loaded in Cationic Liposomes free and embedded on HA hydrogels

To synthesize the dexamethasone-loaded cationic liposomes, the DEX was included in chloroform solution following the methodology of the *Preparation of liposomes* in Chapter 2 of Part I. Also, the Nile Red cationic liposomes to carry out the confocal microscopy experiments were synthesized under the same procedure. Preparation of hydrogel-embedded cationic liposomes was performed, including the cationic liposome dispersion sample as dispersant for the HAMA photo-crosslinking step (see *Preparation of Hydrogels* in Chapter 2 of Part I.)

The dialysis procedures were carried out to measure the release efficiency and the release profiles of the free cationic liposomes loaded with DEX or embedded in a HAMA hydrogel. A sample of 3 mL of a synthesis of cationic liposomes loaded with DEX was introduced into dialysis membrane tubing with 12-14 kDa cutoff. The filling dialysis tubing was immersed in 15 mL of PBS, enough quantity for satisfying sink conditions in the osmotic pressure. The system was placed under stirring conditions in a controlled oven at 37 °C. We take aliquots of 100 μL to determine the release profile for HPLC (see *HPLC methodology* in Chapter 1 of Part I). The dialysis procedures from hydrogels loaded with cationic liposomes with DEX have been carried out analogously to previously detailed, introducing the crosslinked hydrogel-liposome system inside the dialysis tubing, plus 2 mL of PBS to fill the tube. Newly, the dialysis tubing was submerged in 15 mL of PBS, and aliquots of 100 μL were token to determine the release profiles.

3.2 Cytotoxity Assays

USC
DE COMPOSTELA

Human Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) were cultured in DMEM supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) and 1% (v/v) amino acids, antibiotic and pyruvate. Before the cytotoxicity assays, the culture was washed with PBS, detached with

0.25% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution, and then centrifuged at 1000 rpm for 5 min, followed by cell resuspension. The cells were incubated at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere. To cytotoxicity assays, 10^4 cells from the fourth passage were placed per well in a 96-well cell culture plate. Then, after incubation at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere for 24 h, the culture medium was replaced by 100 μL of a solution with a series of liposomes systems to test their cell viability (see results in *Part III*).

Five replicates were made for each system; five replicates of blank culture were carried out as a control. The viability assays were carried out using three cell culture plates to obtain 24, 48 and 72 hours of incubation. The culture medium was removed from each well at each time point, and two washes were carried out with 100 μL of PBS. Then, 100 μL of culture medium composed with CCK-8 reagent was added into each well (10% CCK-8, 90% DMEM), followed by incubation for 2 h at 37 °C. Finally, a multifunction microplate reader measured the optical density at 450 mm. The percentage of cell viability was estimated from the optical density of the control.

3.3 MSC Differentiation Assays

The differentiation assays of MSC in osteoblasts were carried out with samples of cationic liposomes loaded with DEX at 100 and 400 ng/mL. Two samples at the same previously lipid and surfactant concentrations were used without DEX to have comparative control. The MSCs have been seeded in 24-well culture plates with 30000 cells/well. Five culture plates were prepared to obtain assays at 3, 7, 14, 21 and 28 days. The plates were incubated for 24 hours at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere. All wells were cultured with complete medium MesenPRO RS^{TM} supplemented with β-glycerophosphate at 10 mM and ascorbic acid at 50 μM. After an incubation of 24 hours, the medium was removed, and the plates were filled as follows:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Negative Control: MSCs cultured in complete medium MesenPRO RS^{TM} supplemented with β-glycerophosphate at 10 mM and ascorbic acid at 50 μM.

- Positive Control: MSCs cultured in complete medium MesenPRO RS^{TM} supplemented with β-glycerophosphate at 10 mM and ascorbic acid at 50 μM, and 0.1 μM of DEX.

- Unloaded Cationic Liposomes: MSCs cultured in complete medium MesenPRO RS^{TM} supplemented with β-glycerophosphate at 10 mM and ascorbic acid at 50 μM, and unloaded cationic liposomes at the same lipid and surfactant concentration that the following loaded DEX systems.

- DEX-loaded Cationic Liposomes: MSCs cultured in complete medium MesenPRO RS^{TM} supplemented with β-glycerophosphate at 10 mM and ascorbic acid at 50 μM, and cationic liposomes loaded with DEX. The needed volume of the sample synthesis was calculated to incorporate 100 and 400 ng/mL of DEX in the culture plate wells. The calculation was carried out with information on the initial amount of DEX in the cationic liposomes formulation.

Four replicas have been elaborated for each system examined. For 3, 7, 14 and 21 days, the supernatant was removed at the determined time. After, the cells were washed two times with PBS, and they were lysate with 1 mL of MilliQ water. The lysis of the cells was carried out by three consecutive cycles of freeze-thaw at -80 °C. After the cell lysis, the alkaline phosphatase (APL) activity was quantified as an early indicator of osteogenic activity. To determine the ALP activity, a calibration curve of 4-nitrophenol (4-NP) was carried out in a 0-25 nmol range[168]. Briefly, in a 96-well culture plate were placed different concentrations of 4-NP, 80 μL of each concentration were placed in each well, plus 20 μL of buffer solution of 2-amino-2-methyl-1-propanol at 0.5 M. At the same time, in each well with 80 μL of lysed cells, the same addition of 20 μL of 2-amino-2-methyl-1-propanol buffer solution at 0.5 M was made. Then, 100 μL of p-nitrophenyl phosphate at 5 mM was added and incubated at 37 °C for 30 min. Finally, the absorbance at 405 nm was recorded using a microplate reader FLUOstar Omega (BMG Labtech). With the calibration curve was calculated the concentration of 4-NP in the samples. The results of

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ALP were normalized, quantifying the total amount of protein in lysed cells. For that, a BCA kit (Sigma Aldrich) was used, with a calibration curve generated with bovine serum albumin (BSA) in a 20 to 2000 μg/mL concentration range. In a 96-well culture plate were placed 25 μL of each concentration points, and 25 μL of previously used samples. It was added 200 μL of Cu^{+2} solution, and the culture plates were incubated at 37 °C for 30 min. Then, the absorbance at 562 nm was recorded using a microplate reader FLUOstar Omega (BMG Labtech). With the calibration curve the protein concentration was calculated. The ALP activity was calculated using the following relationship:

$$\text{ALP Activity (nmol 4-NP/hour/ng of protein)} = 12.5 \cdot \frac{\text{4-NP concentration nmol}}{\text{protein content } \frac{ng}{mL} \cdot \text{time } h} \tag{3.1}$$

For the culture plates of the 28th incubation day, the content of calcium produced by cellular differentiation was observed. The supernatants were removed, and the wells were washed with PBS. Then, 400 μL of formaldehyde solution at 4% was added to each well for 15 min at room temperature to fix the cells. After that, the wells were washed three times with PBS, and 200 μL of Alizarine Red at 2% (w/v) at pH 4.2 previously adjusted with NaCl for 20 min at room temperature were added. Finally, the wells were washed three times with PBS to remove the excess of Alizarine Red and images of the staining were obtained by optical microscopy.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4 Materials

4.1 Part I

The gemini surfactans 1,4-bis(tetradecyl trimethyl ammonium) butane (14-4-14) and 1,6-Bis(tetradecyl trimethyl ammonium) hexane (14-6-14) were synthesized from the corresponding α,α'-dibromide, 1,4-dibromobutane or 1,6-dibromohexane (5 mmol), and anhydrous N,N-dimethyltetradecylamine (10 mmol) in 50 mL of acetone upon boiling under reflux for 96 h. The material obtained after removal of the solvent with a rotary evaporator was crystallized from ethanol-ether. The obtained crystals (recrysctallized from methanol) were, then, dried in a vacuum desiccator at ambient temperature to give the desired product (25% yield). These gemini surfactant were a generous gift from Prof. Luis García-Río's Group (University of Santiago de Compostela - USC). All other reactants were of the highest commercially available purity and were used as received. See *Gemini surfactants synthesis* (Chapter 2 of Part I) for more details with NMR data.

4.2 Part II

- The zwitterionic lipid 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) was purchased from Avanti Polar Lipids, Inc. (USA).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- The family of gemini surfactants used has two bromides as the anionic counterion, being the differential element the length of the hydrocarbon chain acting as

spacer group: N1,N1,N4,N4-tetramethyl-N1,N4-ditetradecylbutane-1,4-diaminium (GS4), N1,N1,N6,N6-tetramethyl-N1,N6-ditetradecylhexane-1,6-diaminium (GS6), N1,N1,N12,N12-tetramethyl-N1,N12-ditetradecyldodecane-1,12-diaminium (GS12), N1,N1,N14,N14-tetramethyl-N1,N14-ditetradecyltetradecane-1,14-diaminium (GS14), and N1,N1,N20,N20-tetramethyl-N1,N20-ditetradecylicosane-1,20-diaminium (GS20). Deionized water was used to prepare all solutions. These gemini surfactant were a generous gift from Prof. Luis García-Río's Group (University of Santiago de Compostela - USC). See *Gemini surfactants synthesis)* for more details with NMR data.

- Highly branched polyethylenimine (PEI) with high charge density, low molecular weight (Mw = 1800 g/mol, PDI = 1.14), and primary, secondary, and tertiary amine groups in a ratio of approximately 1/2/1 was purchased from Polysciences Inc.

- 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) was purchased from Avanti Polar Lipids.

- Triton X-100, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic sodium salt (HEPES), sodium bicarbonate and dimethyl sulfoxide (DMSO) were obtained from Sigma-Aldrich

- Carboxyfluorescein (CF) was from Kodak.

- Oregon Green 488 carboxylic acid, succinimidyl ester, Bodipy Phalloidin (650/665), Hoechst 33258, pentahydrate (bis-benzimide), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Fetal Calf Serum (FCS), Non-Essential Amino Acids (NEAA), L-glutamine, sodium pyruvate, and Penicillin Streptomycin (Pen Strep) were purchased from Invitrogen.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

- HeLa cells (CCL-2) were purchased from ATCC.

- Vectashield antifade mounting medium was purchased from R. Costoya S.L.

4.3 Part III

- Zwitterionic lipids 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) were purchased from Avanti Polar Lipids, Inc. (USA).
- Poly-L-lysine hydrobromide (15-30 kDa), Nile Red, Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose with phenol red were purchased from Sigma-Aldrich.
- Sodium hyaluronate (21-40 kDa) was purchased from Lifecore Biomedical (USA).
- Fetal bovine serum, antibiotic/antimycotic solution and TrypLE Express^{TM} were bought from Gibco
- Formalin from Thermo Scientific.
- The surfactant N1,N1,N14,N14-tetramethyl-N1,N14-ditetradecyltetradecane-1,14-diaminium dibromide (GS14) was a generous gift from Prof. Luis García-Río's Group (University of Santiago de Compostela - USC). See *Gemini surfactants synthesis)* (Chapter 2 of Part I) for more details with NMR data.
- Gold-coated AT-cut quartz crystals were bought from AWSensors (Spain).
- Square cover glasses of 24×24 mm^2 and 20×20 mm^2 were purchased from Agar Scientific and employed to assemble films by dip coating.
- Ultrapure water was used for the synthesis of liposomes and for the preparation of the polyions solutions.
- Human Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) were purchased from Sigma-Aldrich
- MesenPRO RS^{TM} was purchased from Gibco
- Alkaline Phosphatase Detection Kit (APL), BCA Protein Assay Kit and Alizarine Red were purchased from Sigma-Aldrich

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Part II

Procedemento, Resultados e Aplicacións

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5 Micelización e adsorción en interfases aire/auga de surfactantes gemini

As estruturas de autoensamblaxe de surfactantes diméricos ou gemini están caracterizadas, entre outras propiedades, por baixas CMCs. Esta característica pode deberse en gran medida ás súas extensas partes hidrofóbicas. Unha baixa CMC determina unha gran estabilidade das estruturas de autoensamblaxe e de monocapas adsorbidas en algunha interfase. Neste capítulo, o comportamento da micelización de dous surfactantes catiónicos gemini foi estudado mediante medidas de calorimetría de titulación isotérmica (ITC). Do mesmo xeito, a adsorción en interfases aire/auga foi modelizada a partires de datos de tensión superficial dinámica (DST).

5.1 Contextualización

Nun nivel enerxético inmediatamente superior ao atómico, atopamos unha realidade eminetenemente gobernada pola mecánica cuántica: a contorna molecular. A medida que o sistema a estudar vai aumentando o número dos seus elementos constituíntes, a modelización matemática dos fenómenos que atopemos neles, vai tornándose cada vez máis complexa e particularizada. As interaccións entre os sistemas moleculares, supoñen un campo de traballo tremendamente extenso dende o punto de vista da súa física. A miúdo, o estudo das interaccións nun sistema físico comeza dende a resposta a unha cuestión

USC
DE COMPOSTELA

primixenia, que debe responder á intensidade das interaccións. Nesta dirección, existen dúas repostas límite, unha na que asumiremos que a interacción ten unha intensidade desprezable, ao que chamaremos modelo de *gas ideal*; e outra na que a interacción ten un carácter forte, e extenso no espacio e no tempo, cunha periodicidade moi ben definida, sistema que entenderemos como *altamente acoplado*.

Como sempre, a realidade non atende estritamente a comportamentos límite, e moitos dos sistemas físicos que atopemos non serán parametrizables, polo menos dun xeito inmediato, empregando algún modelo ideal, ou límite. Unha das disciplinas na que esta imposibilidade de aplicación queda manifesta, en moitos supostos, é a *física da materia branda*. Aí, os sistemas mostran interaccións con acoplamentos débiles, nos que aparecen unha cantidade moi variable de intensidades de interacción, e presenzas máis ou menos relevantes de diferentes *campos* físicos. Así, manifféstanse moitos comportamentos que emerxen de fenómenos cooperativos nestes sistemas. Estes acoplamentos débiles resultan elementos cruciais, e están, a miúdo, na base fenomenolóxica de moitos sistemas, por exemplo, de interese biofísico. Será a biofísica onde centraremos o punto de partida para contextualizar os resultados que serán presentados nas seguintes seccións.

Con certa asiduidade, é común atoparse con sentencias que afirman que o elemento indispensable da vida é a auga. Sen cuantificar a súa indispensabilidade, o certo é que se trata dun elemento moi común, e maioritario, nos sistemas biolóxicos. A súa presenza introduce un fenómeno intrigante e, historicamente, sometido a gran debate: a interacción hidrofóbica. Dende un punto de vista etimolóxico, tal interacción fai referencia á *fobia*, ou aversión, dalgunhas especies moleculares pola auga. Definición cargada de elementos cuestionables e certo misticismo, que mostran unha realidade: a interacción hidrofóbica é un problema aberto da física, ó que pouco a pouco se lle vai estreitando o cerco da resposta e modelización. O que parece ser un punto de partida ecuánime, é que a interacción hidrofóbica non procede da existencia dun campo de interacción, senón que sería unha consecuencia directa da segunda lei da termodinámica: unha *interacción entrópica*.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Un experimento simple, e representativo, da interacción hidrofóbica, é a observación

da dispersión acuosa de moléculas anfifílicas. As moléculas anfifílicas son aquelas nas que, ao longo da súa extensión, podemos identificar unha rexión *polar* e outra *apolar*, dende o punto de vista electrostático. Como consecuencia da polaridade das moléculas da auga, estas van ter unha interacción diferente coas dúas partes diferenciadas das moléculas anfifílicas; interaccionando electrostaticamente coa parte polar, mentres que non será así coa parte apolar. Velaquí unha clave principal, as moléculas de auga non interaccionan electrostaticamente coa parte apolar. O conxunto formado por moléculas de auga, a condicións de temperatura e presión normais, é un sistema de estado líquido. Isto implica a existencia dun sistema físico de materia branda, onde o acoplamento entre as moléculas non é nulo, nin periodicamente ríxido. As moléculas de auga, nun sistema líquido, están interaccionando mediante o enlazamento de *ponte de hidróxeno*. Trátase dun enlazamento de orixe electrostático, que coordina aos hidróxenos dunha molécula de auga coa electronegatividade dos átomos de osíxeno doutras moléculas de auga. Pola súa natureza non periodicamente ríxida, o enlazamento por ponte de hidróxeno ten unha *vida* media, unha dependencia temporal. Este efecto determina unha realidade dinámica no seno dun sistema acuoso, no que cada molécula de auga terá un promedio de pontes de hidróxeno. Este promedio depende, entre outras, da temperatura á que se encontra o sistema; diminuíndo o número promedio de enlaces por ponte de hidróxeno a medida que aumenta a temperatura, sempre referíndonos á fase líquida.

Se supoñemos a dispersión nun medio acuoso dunha determinada especie anfifílica, as moléculas de auga terán, no seno do seu sistema, un número promedio de pontes de hidróxeno entre elas. Por outra banda, terán un determinado número de pontes de hidróxeno coa parte polar da molécula anfifílica, dependendo das súas características electrostáticas. Do mesmo xeito, parece evidente que as moléculas de auga que se atopen na contorna da rexión non polar, da molécula anfifílica, non van ter o mesmo número promedio de pontes de hidróxeno entre elas, comparado coas que se atopan no seno do fluído. Esta diferencia débese a cuestións xeométricas, unha molécula de auga do seno do fluído terá un número determinado de pontes de hidróxeno coas súas moléculas de auga de

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

veciñas. No entanto, unha molécula de auga situada na contorna da parte apolar dunha molécula anfifílica non vai ter tantas moléculas de auga veciñas coas que interactuar. Evolucionamos así o concepto un pouco máis, e estamos en posición de dicir que as moléculas de auga na contorna da parte apolar dunha molécula anfifílica teñen unha liberdade, de movemento e colocación, máis restrinxida que as moléculas de auga no seno do fluído.

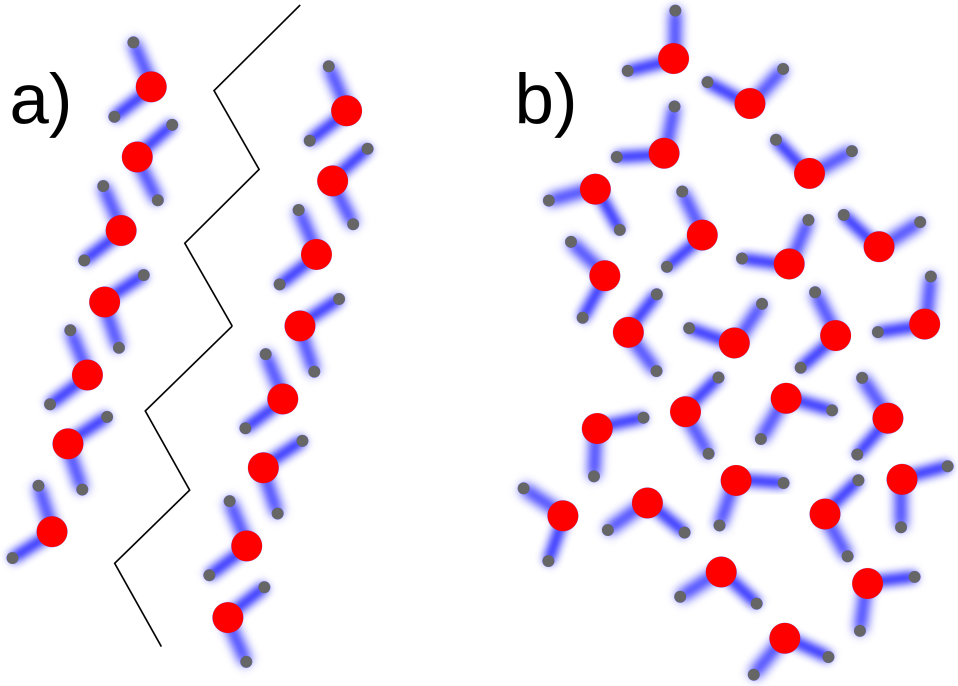

Figura 5.1: Esquema das implicacións estruturais na coordinación de moléculas de auga pola presenza de moléculas non polares. a) Representa o posicionamento ordenado de moléculas de auga na contorna dunha molécula non polar, neste caso unha cadea hidrocarbonada. b) Representación do seno de fluído acuoso, constituído unicamente por moléculas de auga, cunha coordinación por pontes de hidróxeno dependente da súa temperatura.

A figura 5.1a mostra un exemplo esquemático da colocación das moléculas de auga na contorna dunha cadea hidrocarbonada. A ausencia de interacción das moléculas de auga coa cadea de átomos de carbono provoca unha coordinación que pode ser identificada como unha *caixa* de auga. Na figura 5.2b móstrase un exemplo da interacción das moléculas de auga, entre elas, no seno dun fluído acuoso.

Un exemplo de molécula anfifílica é o tensioactivo ou *surfactante*. Estas moléculas

deben o seu nome a que, tradicionalmente, foron identificadas pola súa habilidade para modificar as propiedades de tensión superficial da auga. O surfactante está composto, dun xeito moi xeral, por unha rexión polar e unha rexión hidrocarbonada, con características de longura e configuración que poden ser moi variadas. Posto que a presenza de cadeas hidrocarbonadas restrinxe a mobilidade das moléculas de auga na súa contorna, a presenza de surfactantes no seno dun fluído acuoso vai ter repercusións na entropía do sistema. En virtude da segunda lei da termodinámica, as moléculas de surfactante terán unha configuración enerxética que favorecerá o seu posicionamento na superficie da auga. Esta colocación axudará a aumentar a liberdade das moléculas de auga do seno do fluído, co que se estará a cumprir a segunda lei da termodinámica.

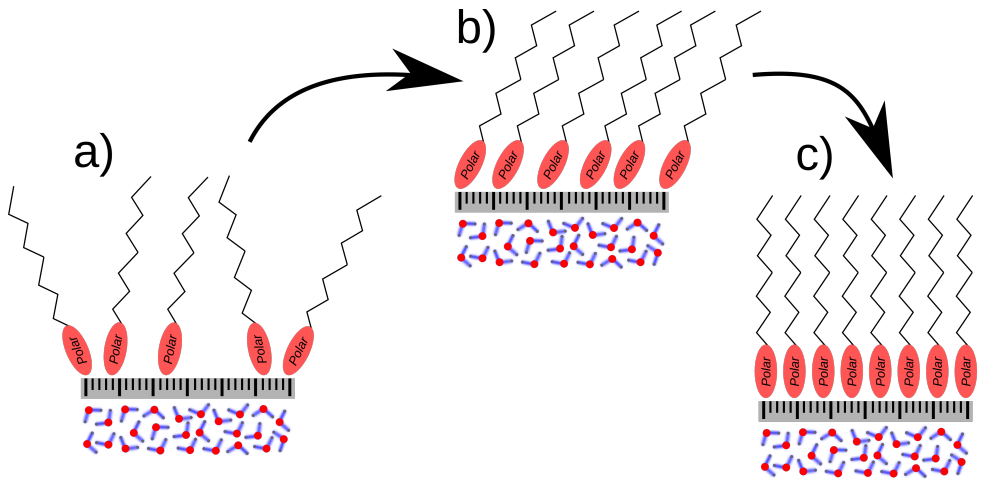

Figura 5.2: Representamos o esquema dos diferentes estadíos nos que se pode atopar a adsorción de surfactantes nunha superficie de auga. Como se pode apreciar nos tres esquemas, a escala de lonxitude que ocupan os surfactantes é sempre a mesma. a) Represéntase a adsorción de surfactantes nunha superficie acuosa, a baixa densidade de ocupación permite despreciar a interacción entre eles, compórtanse na superficie como un gas ideal. b) Aumenta o número de surfactantes na superfice, e con elo a densidade e a interacción entre as moléculas adsorbidas: temos un estado líquido en superficie. c) Representación da saturación da superficie, xa non é posible adsorber máis material.

Na figura 5.2 podemos apreciar unha secuencia da ocupación dunha superficie acuosa mediante a adsorción de surfactantes. En todas as configuracións, a parte polar está en contacto coas moléculas da auga e, ao mesmo tempo, a parte apolar, ou hidrocarbonada, está colocada sen contactar coas moléculas de auga. A colocación do surfactante na supe-

ficie axuda, polo que xa comentamos, a aumentar a liberdade das moléculas de auga, co que será o posicionamento máis esperable para o surfactante. No entanto, é preciso mencionar que estamos a traballar cun sistema no que as enerxías das moléculas de auga son moi considerables. A compoñente cinética da súa enerxía, que depende da temperatura, é o suficientemente elevada como para establecer un sistema no que non poderemos falar dun mínimo de enerxía, senón de equilibrios dinámicos. Así, a colocación dun surfactante na superficie non poderá ser entendida como un feito eterno, e a súa entrada no seno do fluído pode ser posible. Deste xeito, a medida que aumente a cantidade de surfactante no seno do fluído, aumentará tamén a súa densidade na superficie do líquido. Na figura 5.2a observamos a adsorción duns poucos surfactantes, a súa baixa densidade na superficie fai posible asegurar que se encontran desacoplados uns de outros, co que podemos empregar a hipótese de gas ideal de surfactantes na superficie.

Nas figuras 5.2b e 5.2c observamos que a densidade de surfactante é cada vez maior, unha maior cantidade de concentración de surfactantes no seno do fluído esixe unha maior cantidade de moléculas adsorbidas. No estadío correspondente á figura 5.2b, os surfactantes atópanse interaccionando entre eles, co que temos un estado acoplado na superficie. Por último, na figura 5.2c representamos a saturación da superficie, así xa non é posible adsorber máis surfactante. É preciso mencionar que, pola presenza das moléculas na superficie, propiedades como a tensión superficial vanse ver fortemente alteradas.

Fronte ás implicacións que o efecto hidrofóbico ten na superficie, no seno do fluído tamén están a acontecer fenómenos moi relevantes, cuxa causa principal é a interacción entrópica. En virtude da migración polo espazo de fases, o sistema termodinámico formado polas moléculas de auga vai intentar alcanzar situacións que se corresponden a maximizar a liberdade das moléculas de auga. Así, as *caixas* de auga, ás que nos referimos na solvatación das cadeas hidrocarbonadas, non van ser situacións favorables dende un punto de vista enerxético. Emerxe deste xeito un dos fenómenos máis paradigmático da física da materia branda: o autoensamblaxe. Co fin de aumentar a liberdade das moléculas de auga que forman parte desas caixas, a única posibilidade é que se *xunten* as zonas hidrocarbonadas,

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

e así as moléculas de auga, antes na súa contorna, *desfrutarán* agora dunha liberdade maximizada.

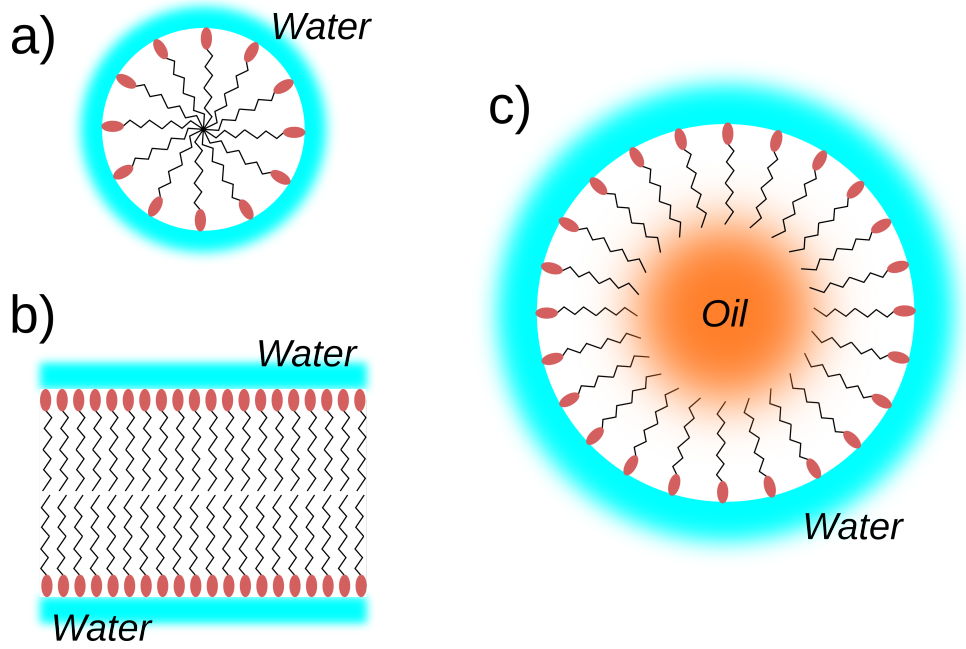

Figura 5.3: Representación de diferentes estruturas de autoensamblaxe de moléculas anfifílicas con grandes cadeas hidrocarbonadas. a) Esquema da forma primixenia de agregación, ou fase liotrópica primitiva: a micela. b) Esquema dunha estrutura complexa, a fase liotrópica lamelar. c) Esquema do autoensamblaxe por emulsión asistida por surfactantes, de fase oleosa e acuosa.

As implicacións do fenómeno do autoensamblaxe resultan inconmensurables dende un punto de vista estrutural. As formas dos complexos formados van a depender de moitos factores, entre os que se atopan a estrutura polar das moléculas anfifílicas e a súa extensión, e en gran medida a súa concentración. Así, unha primeira caracterización das posibles complexacións por autoensamblaxe pode ser feita en función da variable da concentración. As formas que se adoptan no autoensamblaxe, e que dependen da concentración, describen o espectro de fases *liotrópicas* dunha especie anfifílica. Na figura 5.3a represéntase o esquema da fase liotrópica máis primitiva: a micela. Basicamente, é a estrutura de autoensamblaxe, formada polo efecto entrópico da hidrofobicidade, e no que se xuntan as partes apolares das moléculas anfifílicas, mentres que as partes polares quedan expostas ao medio acuoso. A concentración de molécula anfifílica á que se alcanza

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

a formación da primeira fase liotrópica é un parámetro fundamental, coñécese co nome de *concentración micelar crítica* (CMC). Na figura 5.3b está representado o esquema dunha fase liotrópica máis complexa, a fase lamelar. Nesta fase fórmanse *capas*, ou *bicapas*, nas que as partes apolares quedan xuntas, formando estruturas extensas. A importancia desta fase liotrópica é determinante e relevante na biofísica, pois esta complexación é a que atopamos na membrana celular. Do mesmo xeito, podemos plantexar unha evolución do sistema no que dende o punto de partida temos unha mestura de auga e unha sustancia oleosa, así, a presenza dos surfactantes provocará unha emulsión do óleo na auga. Este fenómeno de emulsión está representado na figura 5.3c, e mostra que os dominios da existencia do efecto hidrofóbico non se limitan unicamente ás solucións puramente acuosas. Dun xeito moi simplificado, o fenómeno de emulsión inducida que se representa na figura 5.3c é o punto de partida para o deseño de sistemas de purificación, ou separación, baseado en surfactantes ou deterxentes.

Seguindo a contextualización plantexada, nas próximas seccións vanse presentar resultados que pretenden complementar, un pouco máis, o coñecemento das propiedades fisicoquímicas, da micelización e adsorción superficial, de un determinado tipo de surfactantes: os diméricos ou *gemini*. Presentaranse así, resultados da micelización obtidos mediante a calorimetría de titulación isotérmica, o que nos vai permitir examinar dun xeito directo as enerxías que actúan a nivel de complexación micelar. Do mesmo xeito, presentaremos resultados de tensión superficial, analizados con modelos que permitirán ter información da saturación da superficie, e da interacción entre as moléculas na mesma.

5.2 Termodinámica da micelización

Para analizar a termodinámica da autoagregación, ou micelización neste caso concreto, utilizamos a técnica de microcalorimetría de titulación isotérmica (ITC). Esta técnica xa permitiu analizar as interaccións involucradas na micelización de surfactantes[169–172], aquí empregarémola para os surfactantes gemini presentados na figura 5.4.

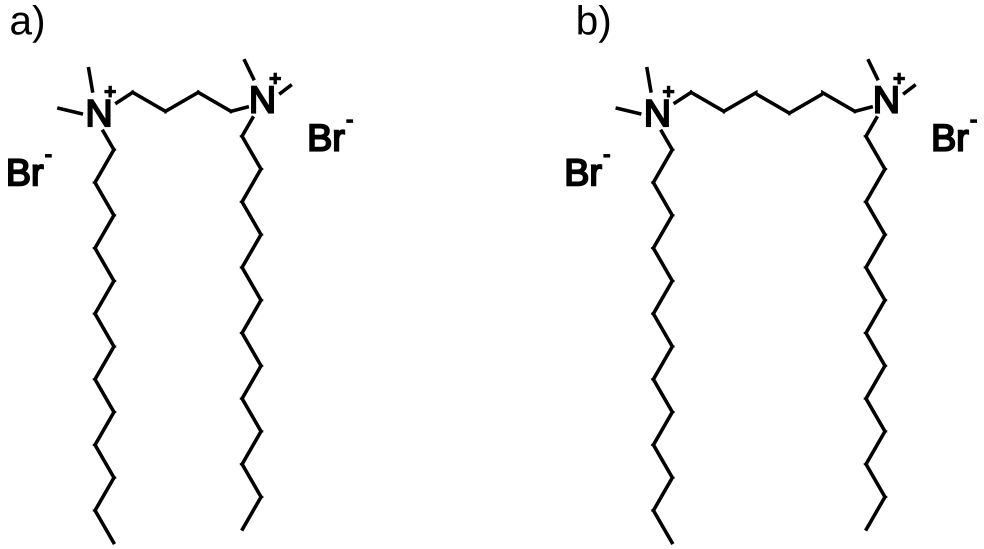

Figura 5.4: Estrutura molecular dos surfactantes gemini catiónicos empregados. a) Gemini cunha lonxitude de espazador de 4 carbonos e b) de 6 carbonos. En ámbolos dous casos a lonxitude das colas é de 14 carbonos.

Na figura 5.5 móstranse exemplos de medida da demicelización de surfactantes gemini. Todas as curvas mostran perfís similares, con dúas zonas claramente identificadas en cada xeira de datos correspondentes a unha secuencia de titulacións. As medidas foron realizadas nun microcalorímetro Microcal VP-ITC de Malvern Panalytical (suxírese ver a sección 1.2 *Methods and Fundamentals - Isothermal Titration Calorimetry*, para unha presentación da metodoloxía). En particular, cada medida de demicelización foi levada a cabo cargando na xiringa automática 270 μL dunha solución de surfactante gemini a 3 mM (C_{xer}^{gs}), para inxectala secuencialmente na celda mostra a razón de 5 μL por titulación. A celda mostra contén auga e o proceso de titulado faise en condición de axitación moderada de 100 rpm. A concentración de surfactante dentro da celda mostra (C_{cel}^{gs}) vai aumentado consecutivamente. Tanto a mostra cargada na xiringa como a auga da celda mostra foron previamente desgasificadas empregando unha bomba de baleiro. Por último, os tempos entre titulacións foron de 300 segundos.

Cando a C_{cel}^{gs} >CMC (lado dereito dos datos da figura 5.5), as titulacións mostran picos esencialmente endotérmicos. Dentro deste rango de concentracións, as micelas tituladas dende a xiringa son termodinamicamente estables na celda mostra, co que os calores

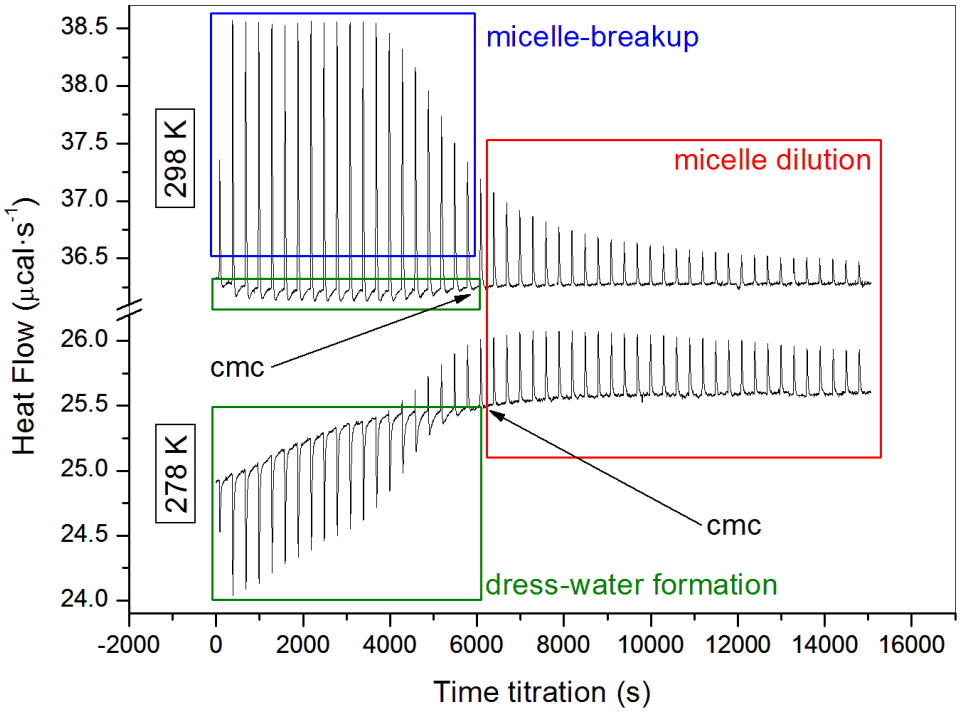

Figura 5.5: Identificación de diferentes partes en datos de titulación isotérmica da demicelización a dúas temperaturas diferentes. O rango de dilución de micelas está composto exclusivamente por compoñentes endotérmicas no réxime post-CMC. No réxime anterior aparecen dúas compoñentes nunha das temperaturas. As compoñentes endotérmicas neste réxime son entendidas como a enerxía de ruptura das micelas -*micelle-breakup*- e as compoñentes exotérmicas asócianse á clusterización da auga na contorna das cadeas hidrocarbonadas dos gemini -*dress-water formation*-. Estes dous experimentos de ITC correspóndense a temperaturas de 5 e 25 °C.

que se aprecian teñen unicamente compoñentes endotérmicas debido a que se trata de enerxías de dilución. A celda mostra debe obter enerxía para aumentar a temperatura, posto que parte da enerxía interna foi investida en dispersar homoxeneamente as micelas. Isto é, cando unha titulación no rango de concentracións post-CMC é levada a cabo, preto da punta da xiringa existe unha concentración local de surfactante -eventualmente micelas- que é a da xiringa, mentres que no resto do medio da celda mostra a concentración de surfactante é menor -aínda que superior á CMC-. Esta diferencia xera un gradiente de concentracións que deriva en presións osmóticas, procurando homoxeneizar a concentra-

ción en tódolos puntos da celda mostra. Esta homoxeneización implica un movemento de surfactantes e micelas dende a punta da xiringa ata tódolos lados da celda mostra, o que eventualmente precisa enerxía para acontecer. Esta enerxía é inicialmente proporcionada pola compoñente cinética das moléculas de auga, o que deriva nunha diminución da temperatura da celda mostra. Como a celda referencia se atopa a unha temperatura maior, un fluxo de enerxía aparece en sentido á celda mostra, de aí que os picos da rexión de dilución post-CMC, na parte dereita dos datos da figura 5.5, sexan endotérmicos. Esta hipótese é consistente co feito de que a entalpía -área baixo os picos de fluxo por titulación- diminúe a medida que aumentan as titulación no réxime post-CMC. Deste xeito, o gradiente osmótico que procura homoxeneizar a concentración é cada vez máis pequeno, posto que a concentración na celda mostra é cada vez máis elevada.

Cando C_{cel}^{gs} <CMC (lado esquerdo dos datos da figura 5.5), o proceso móstrase máis complexo. Os datos experimentais mostran diferencias substanciais coa temperatura, e tamén se observa a presenza de compoñentes tanto endotérmicas como exotérmicas, polo menos a unha das temperaturas. Para analizar as compoñentes enerxéticas máis relevantes neste réxime pre-CMC vaise introducir unha metodoloxía novidosa. As titulacións da parte esquerda nas representacións da figura 5.5 mostran, polo menos, tres fenómenos diferentes:

i. A ruptura micelar ou *micelle-breakup* (MB), que se manifesta mediante a enerxía necesaria para separar as entidades monoméricas das micelas que son tituladas na celda mostra.

ii. Un segundo fenómeno dáse unha vez que as micelas rompen, e na contorna das cadeas hidrocarbonadas dos surfactantes as moléculas de auga adoptan un enlazamento por ponte de hidróxeno, entre elas, diferente ao que teñen cando non se atopan próximas a un surfactante. Este proceso é chamado *dress-water formation* (DW), facendo referencia á particular morfoloxía que as moléculas de auga adoptarían na contorna dos surfactantes. A súa natureza, por tratarse dun fenómeno de unión, é exotérmica (ver figura 5.1).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

iii. O terceiro fenómeno identificable é o representado pola contribución relacionada coa dilución dos surfactantes, que aparece despois de que o proceso de ruptura micelar (MB) e de formación de caixa de auga (DW) teña acontecido. De novo, un gradiente de concentracións aparece entre as inmediacións da punta da xiringa e o resto da celda mostra. Esta compoñente de dilución, eminentemente endotérmica, considérase desprezable fronte á magnitude enerxética da ruptura micelar.

Avaliemos dun xeito meticuloso os procesos identificados. En termos de entalpía, o proceso MB está asociado coa presenza de compoñentes endotérmicos. O incremento da separación entre as moléculas de surfactante, que supón a ruptura micelar, orixina un aumento da enerxía potencial entre as moléculas de surfactantes. Este aumento de enerxía potencial é posible só cando a enerxía necesaria é subministrada ao sistema. Como a celda referencia se atopa en contacto térmico cun baño termostático constante, aparecerá un fluxo de enerxía en sentido cara a celda mostra. Deste xeito, a enerxía do sistema na celda mostra incrementa, e este incremento débese ao aumento da entalpía no proceso termodinámico de ruptura da micela, $\Delta H_{MB} > 0$. Por outra banda, as moléculas de auga teñen un número promedio característico de pontes de hidróxeno entre elas. Este factor depende fundamentalmente da temperatura. Cando as moléculas de auga se atopan nas inmediacións dunha cadea hidrocabonada -secuencias consecutivas de CH_2-, non establecen pontes de hidróxeno con estas estruturas moleculares, co que a súa liberdade queda restrinxida e o número promedio de pontes de hidróxeno que deberían formar coas moléculas de auga veciñas, vese alterado. Fórmanse así as caixas de auga, que determinan, de maneira inmediata, unha restrición moi relevante sobre a formación de pontes de hidróxeno das moléculas de auga involucradas. Este proceso é un fenómeno de unión, no que sucede unha perda de enerxía por parte das moléculas de auga involucradas, aparecendo entón un fluxo de enerxía no calorímetro con sentido cara fóra da celda mostra, polo tanto exotérmico, $\Delta H_{DW} < 0$. Si ben é certo que baixo estas hipóteses, estas dúas compoñentes deberan estar presentes en calquera proceso de demicelización de calquera surfactante, plantexamos a hipótese de que a compoñente exotérmica é máis identificable no caso dos

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

surfactante gemini debido ás súas numerosas zonas hidrofóbicas, colas e espazador.

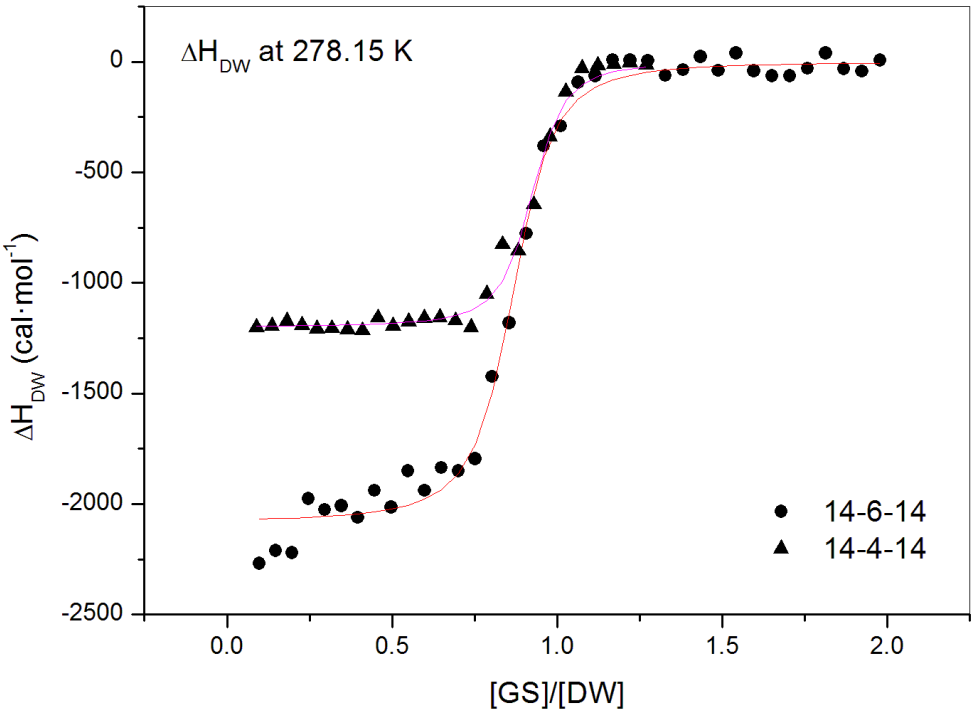

Figura 5.6: Datos determinados coa integración das compoñentes exotérmicas das titulacións do réxime pre-CMC a 25 °C para o gemini 14-4-14 (triángulos) e 14-6-14 (círculos). No eixo X represéntase o ratio de concentracións de gemini [GS] e de *caixas* [DW]. As curvas de axuste resultan de aplicar un modelo de ocupación de ocos indistinguibles. Os datos de entalpía e parámetros de axuste para as restantes temperaturas son mostrados na táboa 5.1

Na figura 5.6, móstranse as entalpías que resultan da integración exclusiva das compoñentes exotérmicas. Estes perfís obtidos, mostran o proceso de formación das caixas de auga na contorna dos surfactantes. Así, para obter información termodinámica do sistema, consideramos un modelo de *binding*. Neste modelo, o substrato serían os ocos ou *water dresses*, mentres que o ligando sería o propio surfactante. Este método permítenos establecer un novo criterio para a identificación da CMC mediante os datos que nos aporta a técnica da microcalorimetría ITC. Cando a compoñente exotérmica mencionada desaparece, isto implica que non hai surfactantes que estean a ser *encaixados* en auga,

co que isto só é posible si xa non se están a romper as micelas, e polo tanto a CMC foi alcanzada na celda mostra.

Tendo en conta o anterior, imos propoñer unha nova metodoloxía para a análise dos datos: dado un sistema formado por unha determinada concentración de *ligando* $[\mathrm{L}]_T$ e *substrato* $[\mathrm{S}]_T$, podemos aplicar un modelo de *binding* ideal a partires da ocupación de ocos indistinguibles[173] usando o seguinte balance de masas:

$$[L]_T = [L] + \bar{i}[S]_T \tag{5.1}$$

onde $[L]$ é a concentración de ligando libre mentres a complexación está a ter lugar, e $\bar{i}$ é a ocupación media do substrato. Cando $\bar{i} = 0$ non se da a complexación, e o substrato está completamente dispoñible; por outra banda, cando $\bar{i} = 1$ o substrato está saturado. Na imaxe que se está a implementar neste sistema, a $\bar{i} = 0$ corresponde co feito de que todas as potenciais caixas que se poden formar para un determinado volumen de auga están dispoñibles. Mentres que cando $\bar{i} = 1$, implicaría que todas as caixas de auga que se poden formar no volume de auga dispoñible están ocupadas. O valor máximo de caixas dispoñibles é debido á necesidade do aumento da entropía nun sistema illado. A presenza dun surfactante restrinxe a liberdade dun determinado número de moléculas de auga, o sistema pode soportar termodinamicamente estas restricións ata que son o suficientemente numerosas, e entón é cando se deixan de encaixar surfactantes e se comeza coas estruturas de agregación. Podemos considerar unha forma para a isoterma de unión surfactante-xaula asumindo que non existen interaccións preferentes entre o substrato e o ligando, co que a isoterma que se plantexa é a de gas ideal de Hill-Langmuir:

$$K = \frac{\theta}{(1-\theta)[L]} \tag{5.2}$$

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

onde K é constante de equilibrio ou de adsorción, e θ é a fracción de ocupación do substrato polo ligando. Cando $\theta = 0$ o substrato está completamente baleiro, mentres que cando $\theta = 1$ o substrato atópase saturado. Hai unha relación entre a fracción de ocupación

e a ocupación media:

$$\theta = \frac{\bar{i}}{N} \tag{5.3}$$

onde N é a *ocupabilidade* do substrato. Si $N = 1$, a fracción de ocupación e a ocupación media son iguais.

Para os axustes plantexados na figura 5.6 e os datos da táboa 5.1, a relación entre o calor involucrado (Q) e a entalpía (ΔH_{DW}) proposta é:

$$Q = N\theta[S]_T \Delta H_{DW} V_0 \tag{5.4}$$

onde V_0 é o volume da disolución na celda mostra. O modelo aplicado é levado a cabo empregando o software de Origin© 7.0 co complemento de tratamento de datos de Microcal LLC ITC. De tal xeito, o modelo aplicado é o mostrado na ec. 5.4 con unha corrección implementada no V_0, debido ao incremento deste coas sucesivas titulacións.

Os cambios nos valores das entalpías de micelización ás diferentes temperaturas e para os dous surfactante gemini empregados son mostrados na figura 5.7. Por suposto, a entalpía de micelización é da mesma magnitude pero signo distinto da entalpía de demicelización. Esta entalpía foi estimada sumando as áreas das contribucións endotérmicas e exotérmicas dos picos que apareceron en cada titulación. O procedemento está mostrado na figura 5.8, na cal cada titulación está composta de unha compoñente endotérmica (ruptura micelar) e un pico exotérmico (resultado da formación das caixas de auga). Para estimar a entalpía de demicelización unicamente se tiveron en conta as cinco primeiras titulacións de cada experimento, posto que se considerou que as seguintes titulacións xa tiñan unha maior presenza de fenómenos de equilibrio por aproximarse á CMC.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

As enerxías libres de micelización foron estimadas a partir dos valores determinados da CMC mostrados na táboa 5.1. Para iso empregouse a seguinte ecuación reportada[169, 174] para surfactantes diméricos con contraións monovalentes:

Táboa 5.1: Parámetros termodinámicos derivados de datos de ITC e da aplicación do modelo de binding proposto. Os valores da CMC foron estimados examinando os datos de titulación. A concentración de surfactante en celda á cal non se detectou a presenza de compoñente exotérmica foi asumida ser a CMC, en concordancia co criterio establecido no modelo DW.

	T (K)	ΔH_{DW} (kJ·mol^{-1})	ΔG_{DW} (kJ·mol^{-1})	$T \cdot \Delta S_{DW}$ (kJ·mol^{-1})	K_{DW} M^{-1}	CMC (M)
14-4-14	278.15	-5.01	-33.16	28.15	$1.72{\cdot}10^6$	0.23
	298.15	-2.86	-34.40	31.54	$1.06{\cdot}10^6$	0.19
	303.15	-2.37	-35.20	32.83	$1.17{\cdot}10^6$	0.23
	308.15	-2.81	-36.58	33.76	$1.58{\cdot}10^6$	0.25
14-6-14	278.15	-8.55	-32.21	23.66	$1.05{\cdot}10^6$	0.22
	280.15	-4.94	-32.87	27.93	$1.33{\cdot}10^6$	0.20
	288.15	-2.08	-30.27	28.20	$3.15{\cdot}10^6$	0.19
	293.15	-2.36	-33.01	30.65	$7.80{\cdot}10^6$	0.19
	298.15	-2.73	-33.65	30.92	$7.89{\cdot}10^6$	0.20
	303.15	-3.48	-29.09	25.61	$1.29{\cdot}10^6$	0.22

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

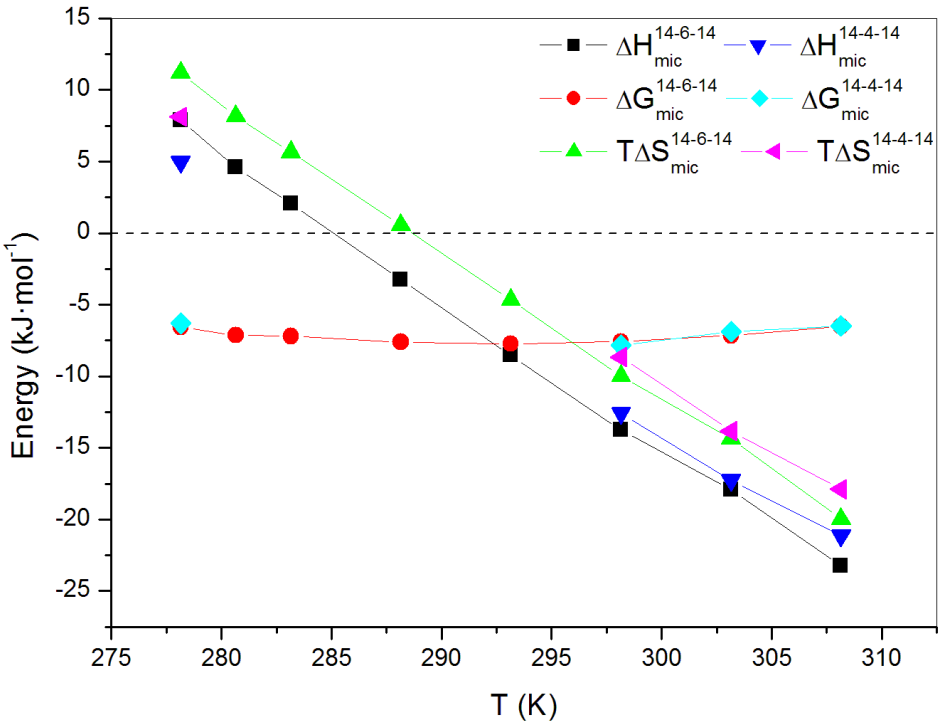

Figura 5.7: Representación das variacións de entalpía, entropía e enerxía libre no proceso de micelización. ΔH_{mic} foi estimada mediante o promedio da integración dos cinco primeiros picos nos que apareceron compoñentes endotérmicas e exotérmicas.

$$\Delta G_{mic}^{cadea} = RT\left(\frac{1}{2}+\beta\right)\log(CMC) - \left(\frac{RT}{2}\right)\log(2) \tag{5.5}$$

onde a CMC está expresada en termos da molaridade por cada unha das dúas cadeas hidrocarbonadas (as colas), e β e a fracción das cargas neutralizadas dos surfactantes micelizados. Este parámetro é calculado por medidas de condutividade empregando $\beta = 1-\alpha$ e datos da literatura para o surfactante C_{14}TAB, relacionado estruturalmente cos geminis empregados[175]. Os valores estimados para a ΔG_{mic} poden ser observados na figura 5.7. Como pode verse, os valores negativos das enerxías libres en todos os casos indica que o proceso de micelización é espontáneo. Unha vez obtidos os valores para ΔG_{mic} e ΔH_{mic} é posible calcular a ΔS_{mic} empregando a expresión da enerxía libre de Gibbs

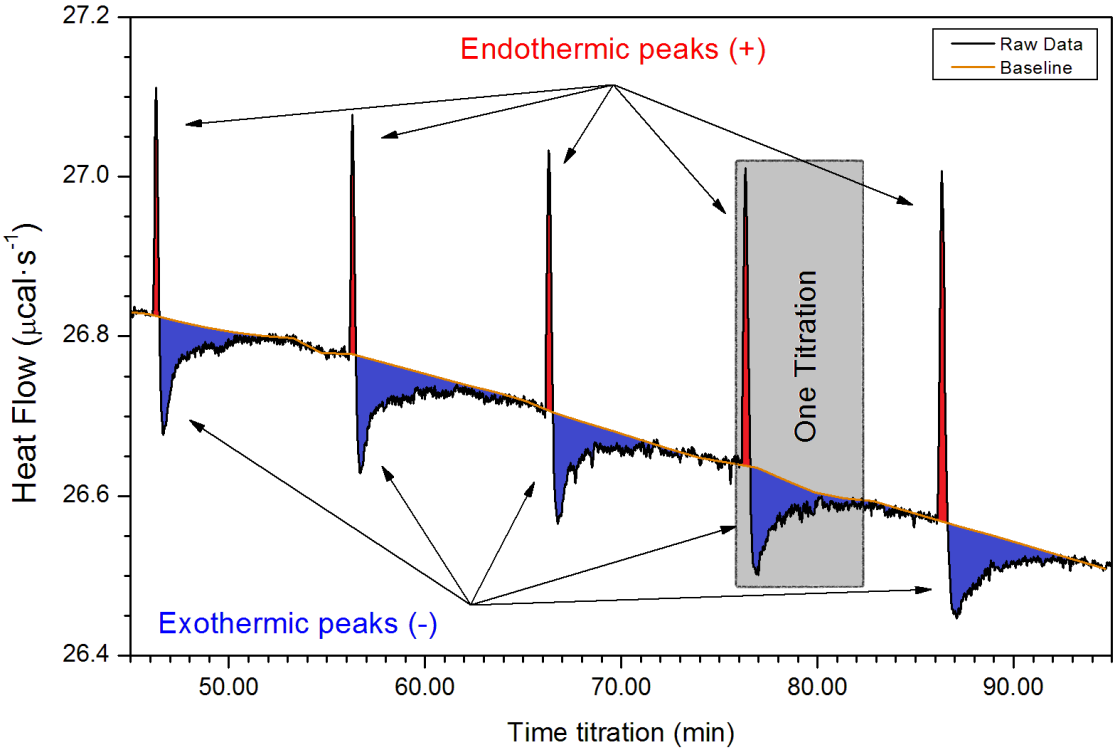

Figura 5.8: Representación das áreas por titulación empregadas para o cálculo das compoñentes enerxéticas da figura 5.7.

para un sistema baixo un cambio isobárico e isotérmico:

$$\Delta G_{mic} = \Delta H_{mic} - T\Delta S_{mic} \tag{5.6}$$

Os valores de ΔH_{mic}, ΔG_{mic} e ΔS_{mic} para os dous surfactantes estudados son representados na figura 5.7 para as diferentes temperaturas analizadas, dende 5 a 35 °C. Como previamente se reportou para sistemas similares[171], a baixas temperaturas $\Delta H_{mic} > 0$ e $\Delta S_{mic} > 0$, deste xeito o proceso de micelización é gobernado pola entropía. A medida que a temperatura do sistema baixa, o movemento das moléculas de auga é cada vez máis lento, deste xeito, o número de configuracións microtermodinámicas das moléculas de auga é cada vez menor. Así, a restrición sobre os grados de liberdade que supón a *clusterización* das moléculas de auga na contorna dos surfactantes, supón para o sistema

un *peso* maior. Polo tanto, o fenómeno de autoensamblaxe (micelización) acontece debido á necesidade termodinámica do aumento da entropía. Pola contra, a medida que a temperatura do sistema aumenta, o número enlazamentos por ponte de hidróxeno entre as moléculas de auga diminúe, co que o número de configuracións microtermodinámicas das moléculas de auga é cada vez maior. Así, a restrición sobre a súa liberdade por atoparse preto de cadeas hidrocarbonadas, non afecta substancialmente á entropía do sistema. A interacción que determina a micelización é a de van der Waals entre os grupos CH_2 dos surfactantes. Neste caso, o proceso de micelización é gobernado pola entalpía, como pode observarse na figura 5.7, para altas temperaturas, $\Delta H_{mic} < 0$ e $\Delta S_{mic} < 0$.

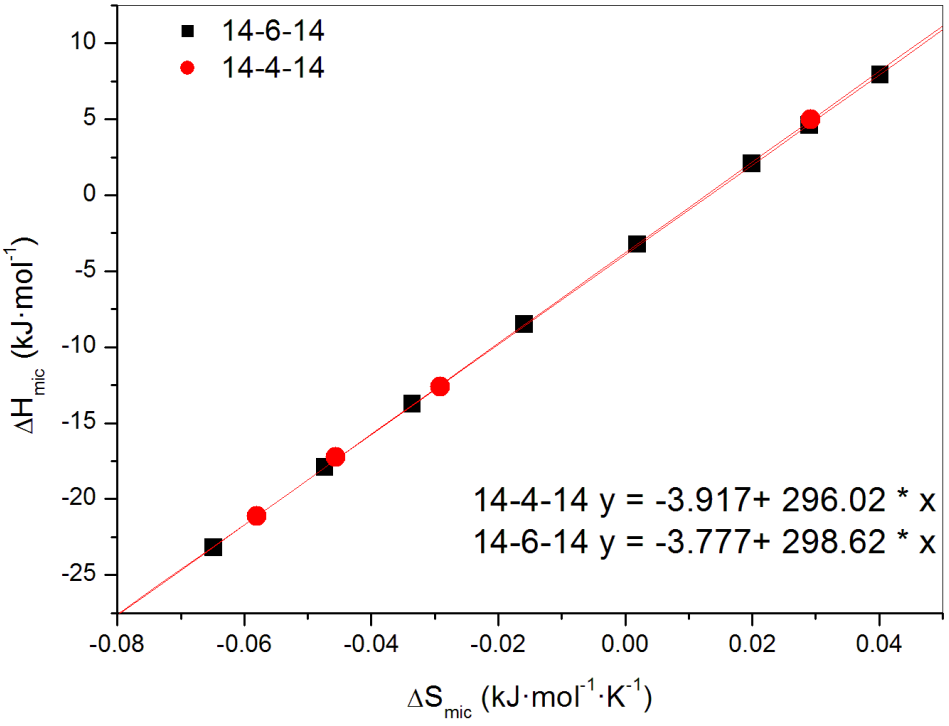

Figura 5.9: Compensación entalpía-entropía a diferentes temperaturas. O axuste lineal foi realizado empregando a Ec. 5.7.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Na figura 5.9 pode observarse a relación entre ΔH_{mic} e ΔS_{mic}. O comportamento observado podería ser entendido como un exemplo de proceso de compensación entalpía-

entropía. Este fenómeno de compensación xurde de evidencias experimentais reportadas e discutidas en varios experimentos de adsorción ou procesos de micelización[176–179]. Aínda que hai unha gran cantidade de datos experimentais mostrando a súa presenza en numerosos sistemas[180, 181], esta sorte de compensación non é un fenómeno completamente explicado na actualidade. No noso sistema intentaremos identificar a natureza dos parámetros obtidos baixo a análise da compensación, onde a enerxía libre ΔG xoga un papel principal na compensación. Nalgúns experimentos reportados, o efecto da compensación en sistemas con rangos de variación estreitos da ΔG -comparado coa ΔH- foron estudados dende a perspectiva da primeira ley da termodinámica[182]. Así, o punto de intersección da liña de compensación mostraría a enerxía libre de Gibbs, mentres que a pendente mostraría a temperatura de compensación, que estaría nas inmediacións das temperaturas experimentais. Os datos mostrados, da micelización dos gemini seleccionados, mostran entalpía e enerxías libres determinadas a diferentes temperaturas, tema que xa foi mostrado e discutido na literatura[28], co que a compensación e os parámetros da liña non poden ser explicados usando os mesmos argumentos que os empregados en sistemas con variacións pouco significativas da ΔG e temperaturas case constantes. Así, a natureza da intersección e a pendente da liña de compensación observada na figura 5.9 vai ser avaliada.

Na figura 5.9, a rexión con $\Delta S_{mic} > 0$ corresponde a un goberno entrópico do proceso de micelización, mentres que a rexión con $\Delta H_{mic} < 0$ corresponde a un goberno entálpico. A relación linear da compensación pode ser parametrizada da seguinte forma:

$$\Delta H_{mic} = \Delta H^* + T_C \Delta S_{mic} \tag{5.7}$$

onde ΔH^* é a entalpía de micelización correspondente a un proceso con $\Delta S_{mic} = 0$. Un proceso destas características, isoentrópico, é reversible. A enerxía de micelización será enteiramente considerada como a parte química do proceso. Polo tanto, podemos decir que ΔH^* representa a interacción surfactante-surfactante[170]. A pendente T_C é a temperatura de compensación. Para plantexar o significado desta temperatura, consideramos

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

conveniente reescribir a Ec. 5.7:

$$\Delta S_{mic} = \frac{\Delta H_{mic} - \Delta H^*}{T_C} \tag{5.8}$$

Cabe mencionar que se identifican dous procesos de interacción que resultan fundamentais na micelización: as interaccións soluto-soluto e as soluto-solvente. As interaccións soluto-solvente poderían ser caracterizadas pola T_C, posto que o numerador da Ec. 5.8 representa a enerxía resultante do proceso de desolvatación, xa que ΔH_{mic} cuantifica a enerxía correspondente a micelización e ΔH^* a correspondente ás interaccións soluto-soluto. A magnitude de T_C determinará entón a variación da entropía para o proceso de micelización a partires da diferencia de enerxía no numerador da Ec. 5.8. A ausencia de cambios substanciais en estes parámetros entre os dous geminis estudados débese, principalmente, ás pequenas diferencias a nivel de estrutura molecular entre ámbolos dous.

5.3 Tensión superficial dinámica

A tensiometría de gota pendente, baseada no sistema amosado na sección de métodos, foi empregada para obter os resultados de tensión superficial dinámica dos gemini da sección anterior. Para analizar o proceso da dinámica da adsorción dende o seno da auga ata a interfase aire/auga (a/w) foi desenrolado un modelo teórico. Varios modelos similares ao analizado nesta tese foron implementados[27, 177, 183–186], no entanto o modelo que se vai presentar permite obter propiedades do estado de equilibrio e características da interacción dos surfactantes na superficie. O modelo baséase nun conxunto de tres ecuacións que toman conta do (1) proceso de difusión dos gemini dende o seno do fluído ate a superficie, da (2) adsorción dos surfactantes á interfase e da (3) relación entre a concentración e a variación da tensión superficial.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Este procedemento posúe varias vantaxes, entre elas a posibilidade de obter tanto valores de equilibrio como propiedades dinámicas a partires dun único conxunto de datos como as isotermas de tensión dinámica. Deste xeito, obteranse:

- Valores da concentración máxima na interfase.
- Constantes de adsorción.
- Constante de interacción lateral.

Neste modelo, vanse establecer tres zonas diferenciadas no proceso de adsorción, tal e como se representan na figura 5.10: o *Bulk* ou seno do fluído, a *SubSurface* ou subsuperficie e a *Adsorption Surface* ou límite da interfase.

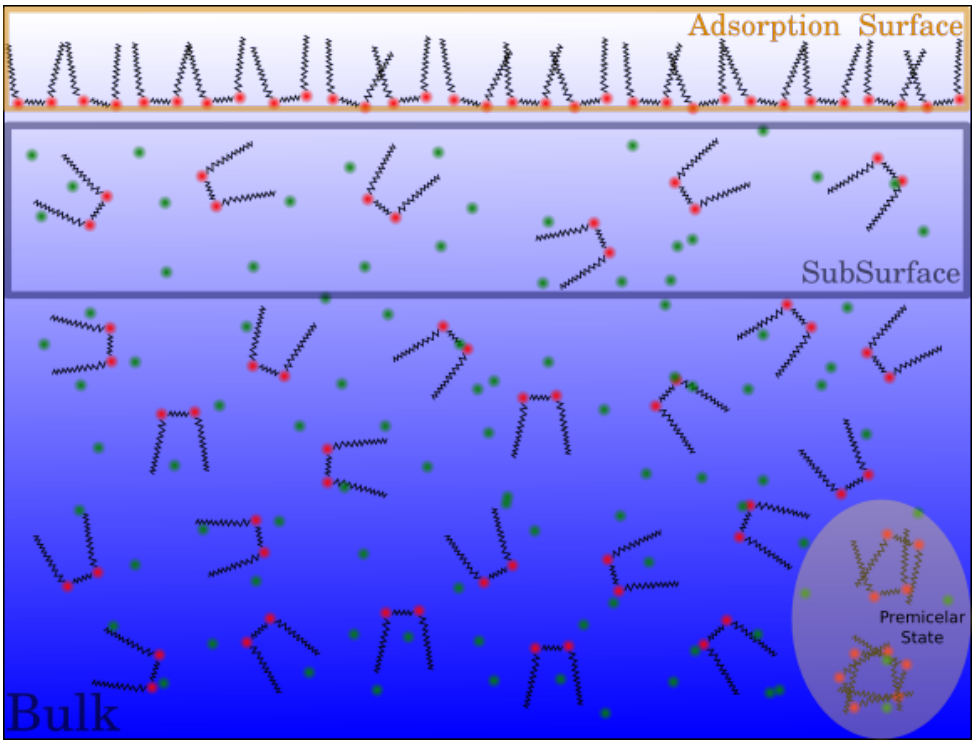

Figura 5.10: Representación esquemática do sistema no que se vai expoñer a difusión e adsorción. Obsérvanse as tres zonas relevantes na parametrización do modelo: o *Bulk*, a *SubSurface* e a *Adsorption Surface*. A adsorción dende a subsuperficie asúmese instantánea. O círculos vermellos representan os nitróxenos dos gemini, mentres que os círculos verdes representan os contraións de bromo.

No seno do fluído os surfactantes están dispersos ou forman estructuras de autoensamblaxe, ademais dende calquera das posicións que se seleccionen, dentro do seno do fluído, existirá unha isotropía determinada pola presenza de moléculas de auga en todas as direccións. A subsuperficie está definida como a zona localizada entre a interfase e o

seno do fluído, representa unha parte deste e sofre un importante cambio na concentración de surfactante debido ao proceso de adsorción. A subsuperficie ten unha concentración de surfactante ($c_S(t)$) máis baixa que a concentración no seno do fluído, isto débese á necesidade de satisfacer o equilibrio dinámico co soluto adsorbido na interfase. Do mesmo xeito, o plano de adsorción ou interfase é unha área onde o surfactante é adsorbido. Este fenómeno, a efectos do modelo que se propón, considerámolo un proceso instantáneo.

Dende a teoría xeral da difusión podemos expoñer o problema de contorno nun sistema linear e semiinfinito mediante unha ecuación de calor:

$$\frac{\partial c(x,t)}{\partial t} = D\frac{\partial^2 c(x,t)}{\partial x^2} \tag{5.9}$$

onde D é o coeficiente de difusión e c a concentración en cada punto x. Propoñendo o contorno da ecuación anterior determinado por un sistema semiinfinito con:

$$c(\infty,t) = c_b$$
$$c(0,t) = c_S(t)$$
$$c(x,0) = c_b$$

as condicións anteriores permiten unha solución analítica á Ec. 5.9. Baseada nunha solución de Green, a transferencia de masa dende o seno do fluído ($x = \infty$) ata a subsuperficie ($x = 0$) é modelada polo resultado coñecido como a ecuación de Ward-Tordai[29]:

$$\Gamma(t) = 2c_b\sqrt{\frac{D}{\pi}}\sqrt{t} + 2\sqrt{\frac{D}{\pi}}\int_0^t c_S(t)d(\sqrt{t-\tau}) \tag{5.10}$$

onde D é o coeficiente de difusión, c_b a concentración de gemini no seno do fluído, τ é a variable temporal de integración, $\Gamma(t)$ é a concentración dinámica na superficie e $c_S(t)$ a concentración dinámica de gemini na subsuperficie. O primeiro termo da Ec. 5.10 corresponde á solución homoxénea do problema de contorno, mentres que a segunda parte representa a compoñente referida á condición variable $c_S(t)$. Para o límite de tempos curtos (primeiro termo da Ec. 5.10), é dicir, nas primeiras etapas da difusión, pódese desprezar

USC
DE COMPOSTELA

o retroceso dos monómeros surfactantes. A superficie está o suficientemente baleira como para adsorber as moléculas de surfactante mentres chegan.

Posto que asumimos unha adsorción instantánea dende a subsuperficie ata a interfase, presentaremos un modelo cuasi-ideal para reproducir a adsorción do surfactante na interfase. Ademais, terase en conta a posible interacción lateral dos surfactantes adsorbidos. Así, a isoterma que se propón é a de Frumkin[28, 187], que relaciona $\Gamma(t)$ e $c_S(t)$ mediante unha relación baseada na ecuación de Hill-Langmuir (Ec. 5.2):

$$c_S(t) = \frac{1}{K}\frac{\Gamma(t)}{\Gamma_m - \Gamma(t)}e^{-A\frac{\Gamma(t)}{\Gamma_m}} \tag{5.11}$$

onde K é a constante de adsorción en termos da fracción de ocupación na interfase $\Gamma(t)/\Gamma_m$, Γ_m é a máxima concentración de exceso na interfase e A é o parámetro relacionado coa interacción lateral entre os surfactantes. Ambas Ecs. 5.10 e 5.11 poden resolverse simultaneamente tomando conta de determinadas condicións de contorno. Usando os datos experimentais das isotermas de tensión dinámica, é preciso establecer a relación entre $\Gamma(t)$, $c_S(t)$ e $\gamma(t)$. Para facer isto, é necesario discernir si a tensión superficial é un fenómeno debido principalmente ó seno do fluído ou a propiedades superficiais. Non son poucos os esforzos implicados na tarefa de concluír o rol da concentración de surfactante no seno do fluído e o seu posicionamento na interfase no fenómeno de tensión superficial.

Tomemos, como punto de partida, as discusións referentes á aplicabilidade[23, 188, 189] ou non[21, 22, 25] da isoterma de adsorción de Gibbs, dun xeito universal, no estudo das variacións da tensión superficial en actividades de surfactantes. Na simple, e non por iso menos poderosa, derivación termodinámica da isoterma de adsorción de Gibbs reside un gran escollo para aplicar o formalismo a especies de surfactantes con un estrutura iónica non convencional, como no caso dos surfactantes gemini cuxa actividade superficial sería necesario coñecer para estimar un adecuado valor de n (constante adimensional que da conta do estado iónico do surfactante) na Ec. 1. Por outra banda, a isoterma de adsorción de Gibbs, en termos xerais, é quen de predicir a variación da tensión superficial debido ao incremento da concentración de surfactante no seno do fluído, incluso despois de alcanzar a

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

saturación da superficie. Debido a isto, empregar a Ec. 1 sería suficiente para determinar o valor Γ_m mediante a determinación da pendente da recta γ_{eq} vs. $\log(c_b)$, figuras mostradas no *inset* das figuras 5.11 e 5.12, sempre que a Ec. 1 puidera ser completamente aceptada en aplicabilidade a este tipo de surfactantes.

Si a fronteira entre dúas fases é observada como unha pura interfase aire/auga, é posible asumir que a tensión superficial é unha propiedade relacionada coa cohesión da fase máis densa, froito dunha interacción máis forte entre as moléculas de auga. Neste sentido, cando a interacción entre as moléculas dun medio aumenta, a tensión superficial tamén o faría, mostrándose así a tensión superficial como un fenómeno *interior* ou de *bulk*. Por outra banda, se nunha interfase se atopa unha terceira especie, diferente de auga ou aire, a tensión superficial xa non será a mesma á que existiría sen a presenza de esa terceira especie, entre outras cousas porque a enerxía en xogo nesa fronteira xa non sería a mesma. Polo tanto, así mostraríamos á tensión superficial como un propiedade relacionada coa concentración dunha terceira especie adsorbida ou na contorna da interfase. Concluímos axeitado introducir unha forma variacional para relacionar a tensión superficial coa concentración de surfactante nas inmediacións da interfase:

$$\left.\frac{\mathrm{d}\gamma(t)}{\mathrm{d}c_S(t)}\right|_{T,P,c_b} = -\kappa\left(\gamma(t) - \gamma_*\right) \tag{5.12}$$

onde $\gamma(t)$ é a tensión superficial dinámica, $c_S(t)$ é a concentración de gemini na subsuperficie, κ é unha constante en termos da tensión superficial relativa e γ_* é a tensión superficial no equilibrio para unha concentración c_b. A forma variacional proposta na Ec. 5.12 mostra que a tensión superficial decrece máis lentamente cando o valor diferencial $\gamma(t) - \gamma_*$ se fai máis pequeno. O límite desta diminución está na tensión de equilibrio, γ_*. Esta forma diferencial relaciona a variación da tensión superficial coa adsorción da terceira especie -surfactante- e, ó mesmo tempo, coa saturación da interfase.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Se representamos a Ec. 5.12 na súa forma integral, obtemos unha expresión para a tensión superficial dinámica:

$$\gamma(t) = \gamma_* + (\gamma_0 - \gamma_*)\, e^{-\kappa c_S(t)} \tag{5.13}$$

onde γ_0 é a tensión superficial da auga, nesta situación.

A Ec. 5.13 é similar á reportada ecuación de May-Jeelani-Hartland[30] posposta para analizar o comportamento da tensión superficial de equilibrio baixo cambios de concentración no seno do fluído. Deste xeito, unha rutina computacional foi desenvolta para resolver o axuste dos datos da tensión dinámica cun sistema formado polas Ecs. 5.10, 5.11 e 5.13.

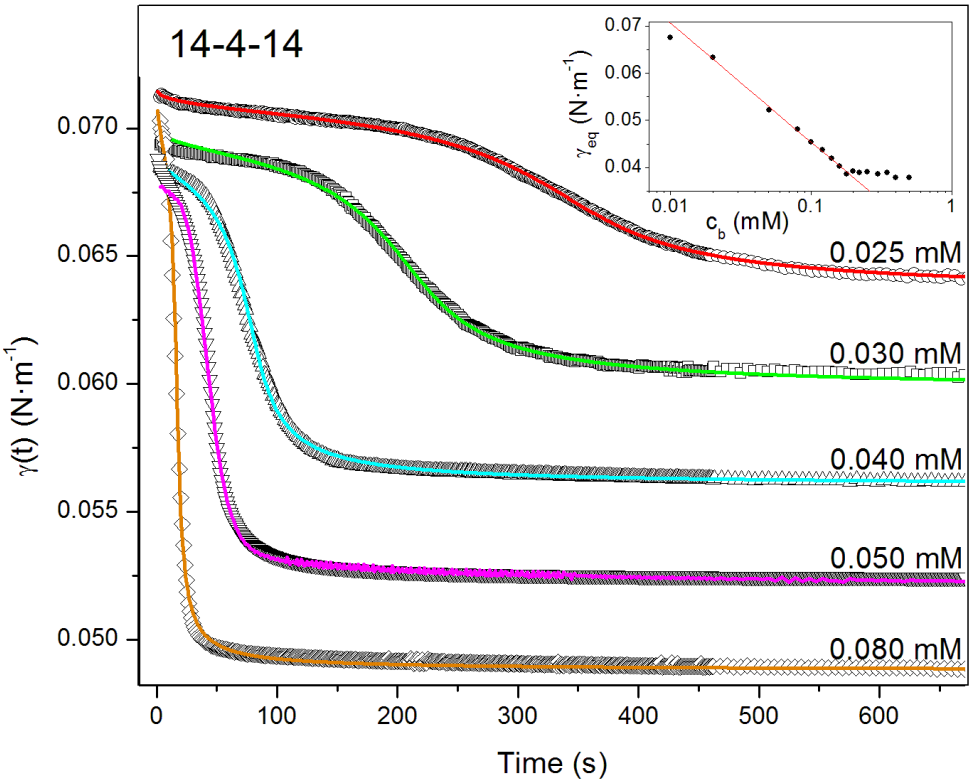

Figura 5.11: Representación dos datos experimentais e o axuste ao modelo implemntado para diferentes concentracións pre-micelares do gemini 14-4-14. No cadro insertado (*inset*) pódese apreciar o axuste aos valores da tensión supercial de equilibrio, cos resultados seguintes: $\gamma_{eq} = 20{,}19 - 25{,}20\log(c_b)$ (unidades do sistema internacional).

Nas figuras 5.11 e 5.12 represéntanse os valores das isotermas de tensión dinámica para

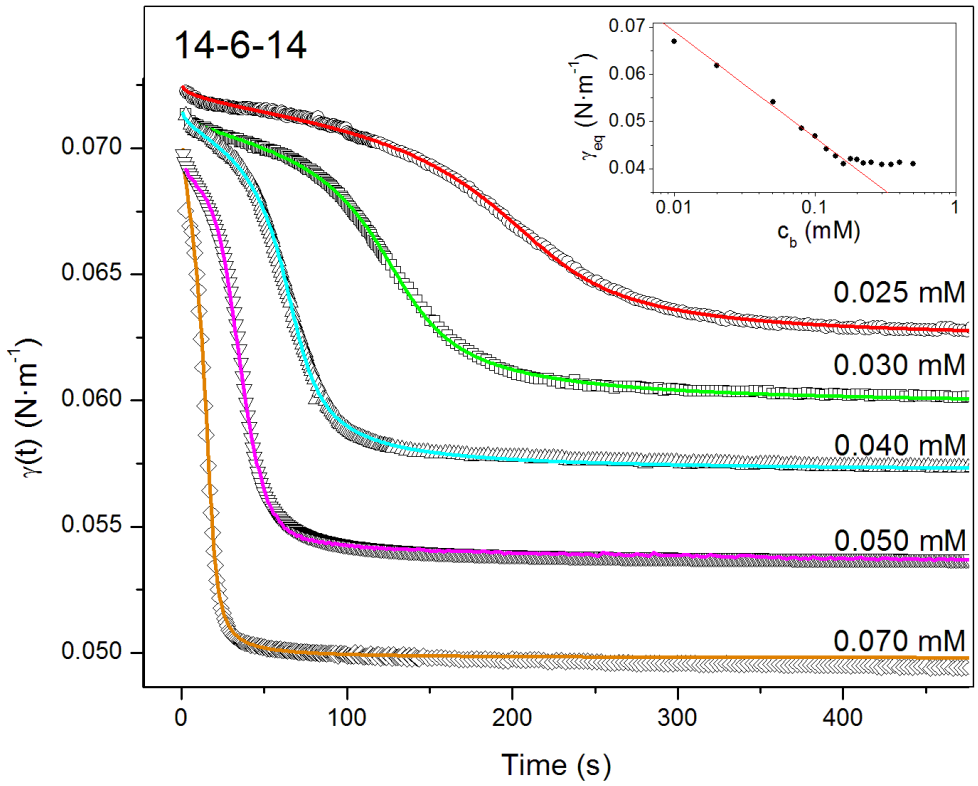

Figura 5.12: Representación dos datos experimentais e o axuste ao modelo implementado para diferentes concentracións pre-micelares do gemini 14-6-14. No cadro insertado (*inset*) pódese apreciar o axuste aos valores da tensión superficial de equilibrio, cos resultados seguintes: $\gamma_{eq} = 24{,}06 - 22{,}46\log(c_b)$ (unidades do sistema internacional).

os gemini 14-4-14 e 14-6-14, respectivamente. O modelo empregado asume que a variación da tensión superficial está relacionada coa concentración de surfactante na subsuperficie, na táboa 5.2 preséntanse os valores dos principais parámetros obtidos despois do axuste dos datos da tensión superficial dinámica ao modelo proposto.

O coeficiente de difusión empregado para os surfactantes estudados foi o mesmo, $D = 3{,}00\times10^{-10}$ m^{2}s^{-1}, supoñendo argumentos similares aos previamente reportados[190, 191] debido á similitude das moléculas sometidas a estudo, dende un punto de vista da súa estrutura molecular (ver figura 5.4) . Os valores das CMCs obtidos mediante unha determinación clásica, segundo os valores de equilibrio da tensión superficial, están mostrados nos recadros das figuras 5.11 e 5.12. Como pode observarse, foron atopados

Táboa 5.2: Valores estimados dos principais parámetros obtidos logo do axuste dos datos de tensión dinámica ao modelo presentado. κ é unha constante de adsorción en termos da tensión superficial, Γ_m é a concentración de surfactante máxima de exceso na superficie, A é o parámetro relacionado coa interacción lateral entre os surfactantes na interfase, K é a constante de adsorción en termos da concentración da interfase. D é o coeficiente de difusión e foi proposto baseado en datos reportados na bibliografía.

	κ (M^{-1})	K (M^{-1})	A	Γ_m (mol·m^{-2})	D (m^2s^{-1})
14-4-14	123.80	724.38	1.16	$7.40 \cdot 10^{-6}$	$3.0 \cdot 10^{-10}$
14-6-14	140.35	816.46	0.93	$6.31 \cdot 10^{-6}$	$3.0 \cdot 10^{-10}$

valores de 0.18 mM e 0.19 mM para os gemini 14-4-14 e 14-6-14 respectivamente, datos en concordancia cos valores obtidos das CMCs mediante o criterio aplicado aos datos de ITC (ver táboa 5.1).

A táboa 5.2 mostra os valores obtidos ao axustar os datos de tensión superficial dinámica ao modelo desenrolado coas Ecs. 5.10, 5.11 e 5.13. Os valores das constantes de adsorción κ e K son grandes, de acordo coas evidencias de alta actividade dos surfactantes gemini, que se reflicte en valores da súas CMCs ordes de magnitude máis baixos que os dos surfactantes monoméricos correspondentes. Como se mencionou previamente, a Ec. 5.11 introduce unha desviación ideal a unha isoterma Hill-Langmuir mediante a presenza dun factor de Frumkin que ten en conta a interacción lateral do surfactante na interfase: A. Un valor positivo de A reproduce a inflexión inicial que se aprecia nas isotermas de tensión dinámica (ver *inset* da figura 5.13); así, unha interacción lateral positiva implicaría unha gran estabilidade da capa de surfactante adsorbida comparada cunha adsorción de gas ideal ($A = 0$). A medida que a interfase tende a saturarse a Ec. 5.13 foi a proposta para explicar a relación da concentración na subsuperficie coa tensión superficial. Os cambios da tensión superficial son debidos a c_S e, indirectamente a c_b. Os perfís da variación da concentración na subsuperficie poden ser observados na figura 5.14, onde os valores de c_S no equilibrio son sempre menores que o respectivo valor de c_b.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Os valores da concentración máxima de exceso na superficie Γ_m son mostrados na

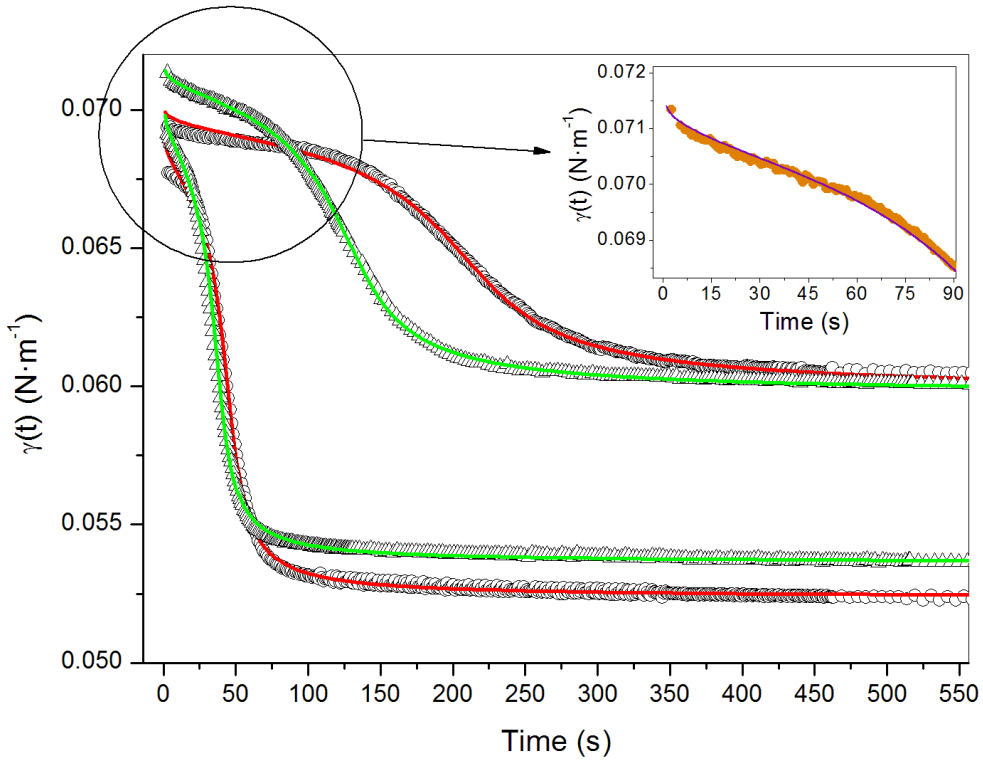

Figura 5.13: Representación de catro curvas de tensión superficial dinámica 0.030 e 0.050 mM para 14-4-14 (círculos) e 14-6-14 (triángulos). No inset apréciase a inflexión inicial froito dunha resposta non ideal da isoterma de adsorción.

táboa 5.2. Como pode apreciarse, Γ_m é maior para 14-4-14 que para 14-6-14, significando que no equilibrio, unha maior cantidade de surfactantes 14-4-14 collen na interfase. Este fenómeno está de acordo coas diferencias estruturais entre os dous surfactantes, onde o 14-6-14 é lixeiramente maior ao ter dous grupos CH_2 a maiores no seu espazador. A relación $\Gamma_m^4 > \Gamma_m^6$ maniféstase tamén no feito de que as isotermas de tensión dinámica para o 14-6-14 decaen máis rápido que para o 14-4-14 para unha mesma concentración (ver figura 5.13). En outras palabras, os valores de tensión superficial no equilibrio son alcanzados antes para o 14-6-14 que para o 14-4-14 para unha mesma concentración.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

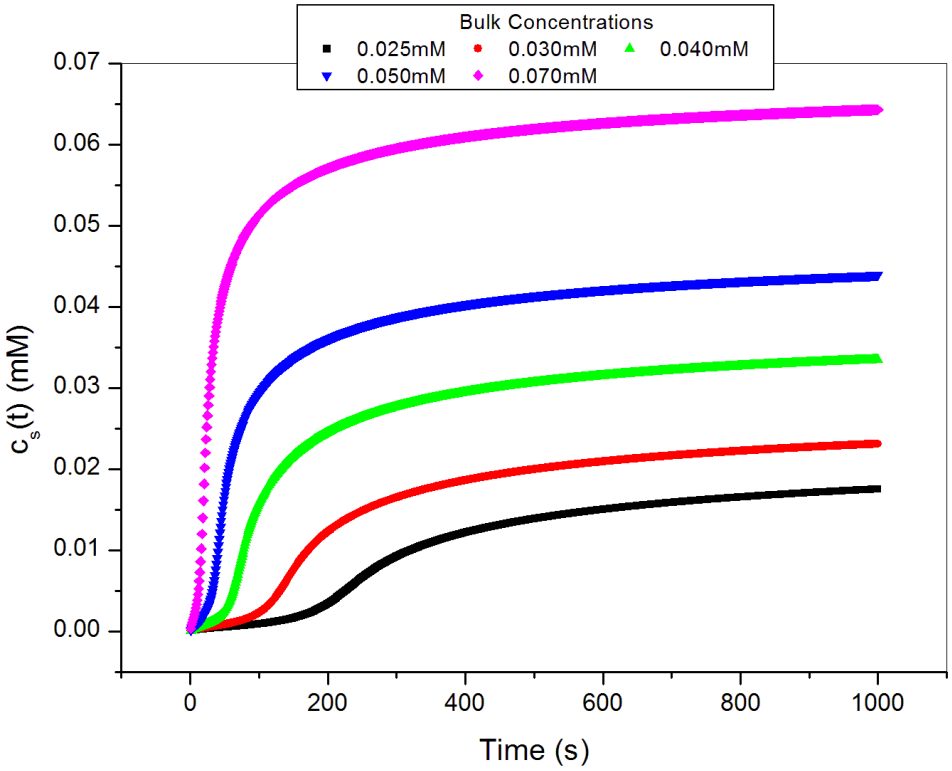

Figura 5.14: Representación da variación da concentración na subsuperficie a medida que acontece a adsorción na interfase, para diferentes concentracións de surfactante gemini no *bulk*.

5.4 Conclusións

A actividade superficial e a termodinámica da micelización de dous tipos de surfactante gemini foi estudada implementando metodoloxías lixeiramente diferentes ás plantexadas na literatura previa.

Nunha primeira sección, foi estudada a demicelización mediante datos de ITC a diferentes temperaturas para dous tipos de surfactantes gemini con diferencias na longura do seu espazador. Os datos mostraron diferencias na manifestación de compoñentes endotérmicas e exotérmica a diferentes temperaturas para o proceso de demicelización. Un modelo novidoso e intuitivo foi aplicado para analizar as dúas compoñentes enerxéticas no réxime de demicelización. Determinouse así os valores das CMCs dos surfactantes empre-

gados. Esta metodoloxía permitiu desacoplar as contribución enerxéticas da hidratación e da ruptura micelar mediante a consideración dun proceso de *binding*, complementando os análises previamente reportados[169–171, 176, 179].

Na segunda sección analizouse o comportamento no equilibrio e a cinética de adsorción dos surfactantes gemini empregados mediante o uso da tensiometría de gota pendente, con datos de tensión superficial dinámica. O comportamento experimental dos datos foron explicados en termos dun novo modelo co uso da isorterma de adsorción non ideal de Frumkin e a difusión de Ward-Tordai. Este procedemento permitiu explicar o comportamento inicial da variación da tensión superficial dinámica en termo da interacción lateral dos surfactantes gemini e da estabilidade da interfase co material adsorbido. O modelo proposto permite analizar as isotermas de tensión dinámica prescindindo do uso da isoterma de adsorción de Gibbs, así púidose evitar entrar en conflitos con hipóteses referentes ao papel do potencial químico e actividade dos surfactantes gemini debidos á súa natureza iónica.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

6 Explorando estruturas lipídicas: dopaxe con gemini e poración con polietilenimina

Coñecer a natureza de fenómenos inducidos na bicapa lipídica debido a interacción con diferentes especies moleculares é de vital importancia. Tales fenómenos van dende alteracións na densidade superficial de carga ata cambios morfolóxicos da fase lamelar, tales como canais ou poros, ou cambios conformacionais na cadeas dos lípidos. Neste capítulo estudarase a interacción dunha familia de surfactantes gemini coa bicapa lipídica de DPPC. Variando a longura do espazador observaranse os cambios inducidos na estrutura lamelar por calorimetría diferencial de varrido (DSC), por dispersión elástica dinámica de luz (DLS) e dinámica molecular (MD). Dun xeito complementario, tamén se presentarán os resultados da interacción dun polímero con aminas susceptibles de protonación, e analizarase a interacción destes con bicapas lipídicas de DMPC mediante DSC e MD, entre outras técnicas.

6.1 Contextualización

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Logo da micelización, unha fase liotrópica moi relevante na biofísica, e que supón un paradigma de sistemas autoesamblados, é a fase lamelar. Nela, as moléculas anfifílicas

dispóñense de xeito que a súas partes hidrófobas concéntranse ao longo dun plano, expoñendo as partes polares cara ao medio acuoso. Existe un sistema na natureza cuxo rol supón unha clave para a existencia dos sistemas vivos: a membrana celular. Composta dun xeito primitivo pola fase lamelar dun conxunto de lípidos, evoluciona ata converterse na plataforma que conecta o medio intracelular co exterior. Na figura 6.1 observamos unha representación esquemática da membrana celular. Esta sorte de configuración liotrópica está localizada na membrana plasmática, pero tamén na membrana nuclear e en outras partes do interior das células. Basicamente, onde teñamos identificada unha fronteira entre orgánulos dentro da célula, será posible observar unha fase lamelar.

Cando a fase liotrópica lamelar está constituída por lípidos, chamamos a ese sistema *bicapa lipídica*. Polas súas características de mímese coa membrana celular, a bicapa lipídica é empregada como modelo para o estudo de interaccións con fármacos, entre outras moitas aplicacións. Tal versatilidade faina ser un elemento principal na nanobiotecnoloxía. A configuración máis recoñecida da bicapa lipídica en dispersión coloidal é a vesícula, ou liposoma.

O liposoma é un sistema amplamente estudado, con aplicacións recoñecidas no eido da tecnoloxía farmacéutica. Dende o seu uso como *vehículos* farmacolóxicos, ata a súa utilidade como modelo de membrana celular, o liposoma resulta un sistema clave no desenrolo nanobiotecnolóxico. Dende o punto de vista estrutural, o liposoma é un sistema formado por unha bicapa lipídica cerrada, con propiedades electrostáticas debido a súa densidade superficial de carga. A dispersión coloidal dun sistema liposomal vai a estar condicionada ás propiedades iónicas do medio acuoso no que se atope, así como da estabilidade da bicapa lipídica. Unha das características máis relevantes, neste sentido, é comprender os efectos que certas especies moleculares poden ter sobre a fase lamelar. Por exemplo, a interacción de especies surfactantes coa bicapa lipídica conduce a unha perda de estabilidade conformacional da fase lamelar, que implica a súa *solubilización*. Este fenómeno, que depende en gran medida da química do surfactante, e da súa concentración, é un mecanismo amplamente empregado para conseguir o illamento de diferentes elementos

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

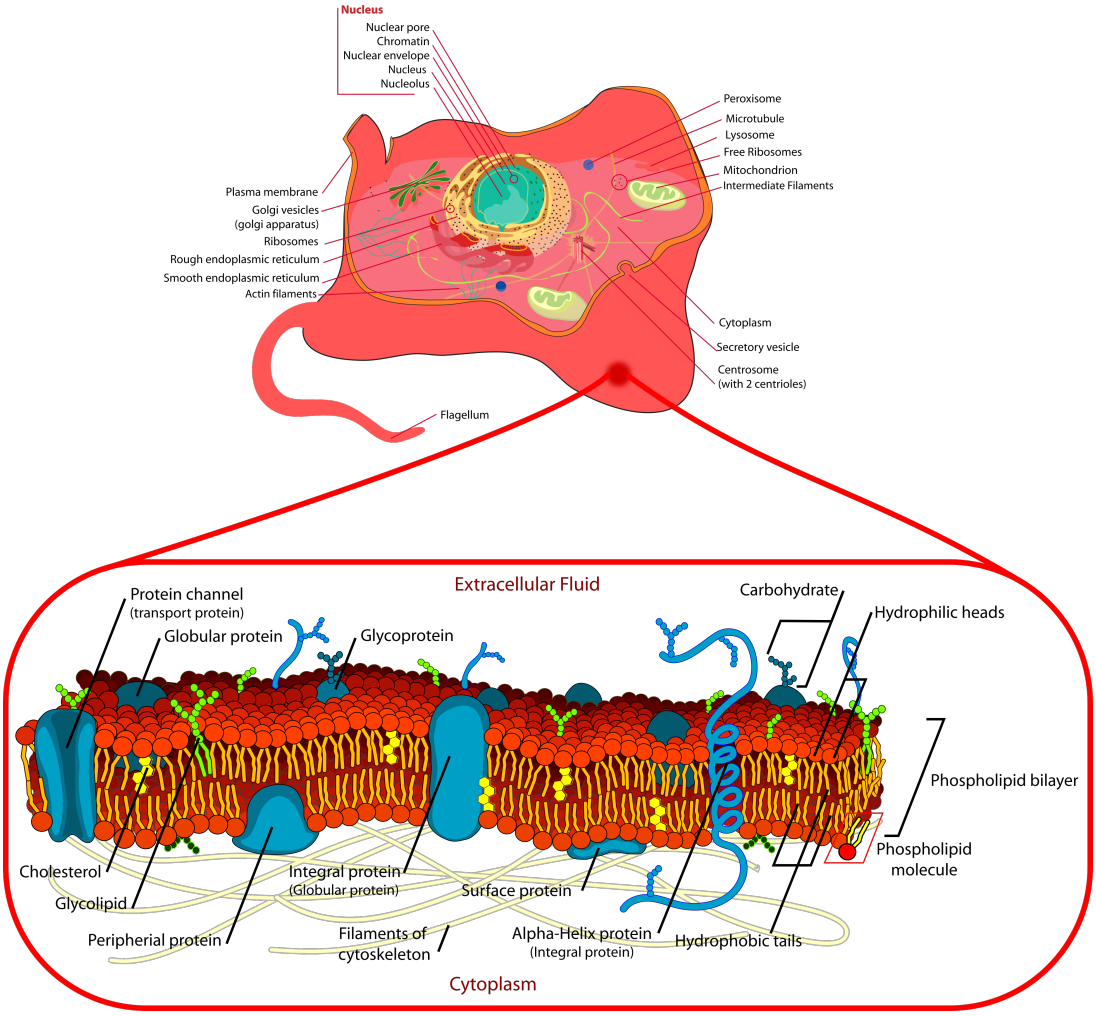

Figura 6.1: Representación esquemática dunha célula, e as súas partes principais. Apréciase tamén a configuración lamelar da membrana celular.

que conforman a membrana celular, como algunhas proteínas (ver figura 6.1). Si a concentración de surfactante non é o suficientemente elevada, a solubilización da membrana non se producirá, de xeito que estaremos a obter unha bicapa lipídica non homoxénea, con diferentes alteracións como a formación de canais por poros, ou a modificación de propiedades electrostáticas ou conformacionais. Do mesmo xeito, a estabilidade dos liposomas vese alterada pola concentración de ións no medio, que poden inducir agregación ou fusión, modificando así o uso do sistema liposómico con interese biofísico.

A modificación das propiedades da bicapa lipídica é un requirimento en diferentes es-

tratexias seguidas na tecnoloxía de liposomas. Por exemplo, se as pretensións sobre o uso do sistema liposomal implican un contacto directo cun sistema vivo, será preciso garantir baixos efectos citotóxicos. Posto que se atopan en gran medida na membrana celular, os fosfolípidos son os candidatos ideais para iniciar a configuración dun sistema liposómico, e poder asumir unha baixa citotoxicidade. A partir de aí, é preciso ir modificando as propiedades do sistema coa presenza de diferentes especies moleculares. Unha das plataformas liposómicas máis requiridas son os liposomas catiónicos. Neles, a densidade superficial de carga é positiva, característica que é empregada no plexado de ADN para estudo en terapias xénicas, na tecnoloxía de vacinas ou na difusión de medicamentos a través da pel.

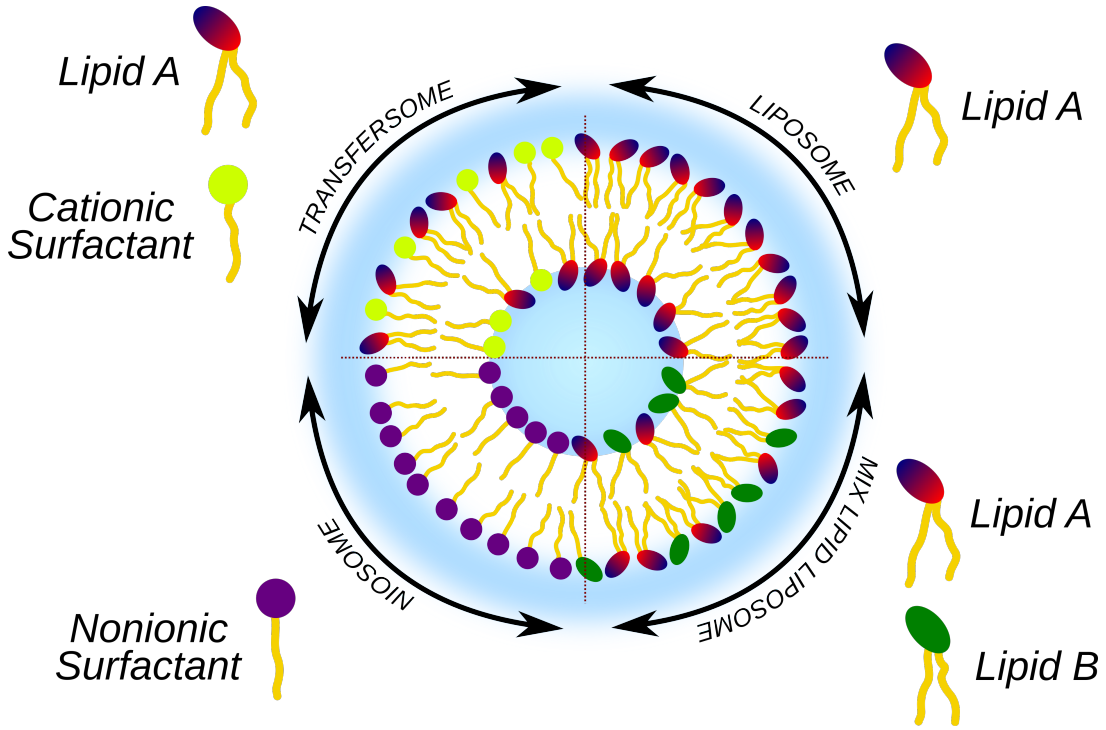

Figura 6.2: Esquema de diferentes formulacións de fases lamelares. Bicapa lipídica homoxénea e con mestura de lípidos. Conformación lamelar de surfactantes non iónicos: *niosoma* e sistemas de bicapa lipídica dopados con surfactantes catiónicos: *transferosomas*.

Unha das estratexias seguidas, para conseguir mudar as propiedades electrostáticas de liposomas formulados con fosfolípidos, está baseada na introdución de surfactantes catiónicos. Na figura 6.2 represéntase un esquema de diferentes bicapas lipídicas, a primeira delas está formada por unha única especie de lípido (liposoma homoxéneo). A segunda

está formada por unha mestura de lípidos (liposoma de formulación heteroxénea). Tamén se poden obter fases liotrópicas lamelares con especies surfactantes non iónicas, os *niosomas*, empregados como bos candidatos a transporte eficiente de fármacos. Por último identificamos os *transferosomas*, un sistema lamelar formulado empregando lípidos e surfactantes catiónicos. Nun primeiro momento, os *transferosomas* foron utilizados no transporte a través do *stratum corneum*, posto que a presenza dos surfactantes na bicapa lipídica confire aos liposomas propiedades de flexibilidade e ductilidade, que non teñen na configuración pura de lípidos. Posteriormente, as modificacións da densidade superficial de carga dos liposomas, inducidas pola presenza do surfactante, tamén resultaron vantaxosas para propiciar a interacción electrostática entre as vesículas e un determinado substrato, ou medio.

O estudo e caracterización da interacción entre surfactantes e bicapas lipídicas é un paso esencial para lograr evolucionar no estudo e aplicación das plataformas liposómicas. Na sección anterior, examinouse a adsorción nunha interafase aire/auga dun surfactante gemini, así como a súa micelización. Na figura 6.3 represéntase un esquema de como se expoñerá a interacción dos surfactantes gemini, dende a interfase aire/auga ata a bicapa lipídica. Agora propoñemos o escenario no que as propiedades dunha bicapa lipídica van a mudar debido á presenza de surfactantes gemini. A cuantificación das variacións vai ser levada a cabo empregando calorimetría diferencial de varrido, dispersión dinámica de luz e simulación de dinámica molecular. A colocación do surfactante gemini na bicapa lipídica será un factor determinante, e do mesmo xeito, as alteracións sobre as diferentes fases conformacionais no interior da bicapa lipídica serán obxectos de atención e debate.

Alternativamente, outras especies moleculares poden ser empregadas para causar cambios relevantes na fase lamelar dos lípidos. Neste sentido, se os surfactantes, a baixas concentracións, provocan cambios nas características mecánicas da membrana, existen outro tipo de moléculas que van a xerar cambios estruturais, tales como canais ou poros na bicapa lipídica. En concreto, a polietilenimina (PEI) linea ten reportada a habilidade para establecer canais nas membranas lipídicas, aínda que a información referente á dinámica

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

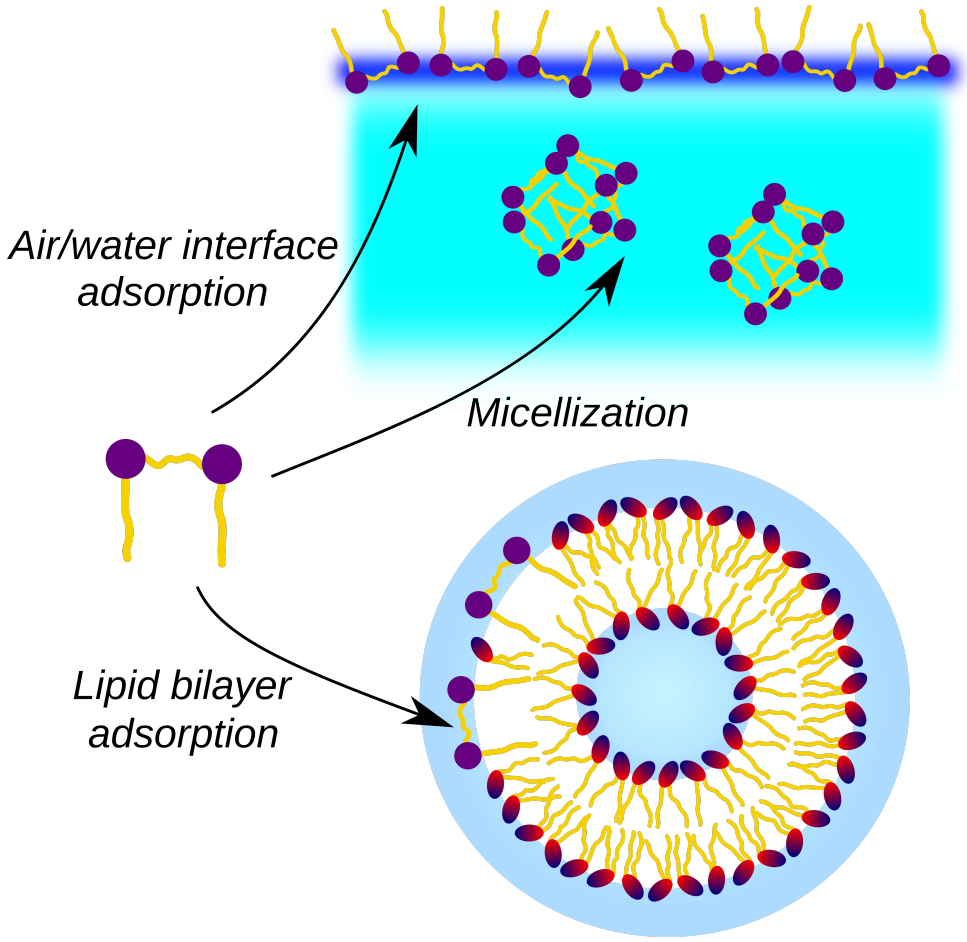

Figura 6.3: Esquema da evolución do estudo da interacción dos surfactantes catiónicos gemini que se están a empregar. Analizouse, na sección anterior, a variación da tensión superficial dinámica por tensiometría de gota pendente, e a súa micelización por calorimetría de titulación isotérmica. Neste capítulo a finalidade é analizar a súa interacción en bicapas lipídicas.

da formación non está esclarecida. Estudado como adxuvante no plexado de ADN, o PEI está tamén relacionado activamente con diferentes procesos no fenómeno da transfección xénica e do tráfico intracelular. Unha das características que diferencia á configuración molecular do PEI da dos surfactantes gemini que empregamos, pode ser inferida da figura 6.4. Pódese observar como o PEI está configurado por aminas primarias, secundarias e terciarias, todas elas susceptibles de protonación mediante variacións de pH no que se atopen solvatadas. Os gemini, pola contra, están constituídos por ións de amonio cuaternario (ver figura 1). A habilidade do PEI para responder a cambios de pH é empregada como

o punto de partida para liberar o ADN plexado no interior da célula, posto que existe un gradiente de pH significativo entre o interior e o exterior da célula.

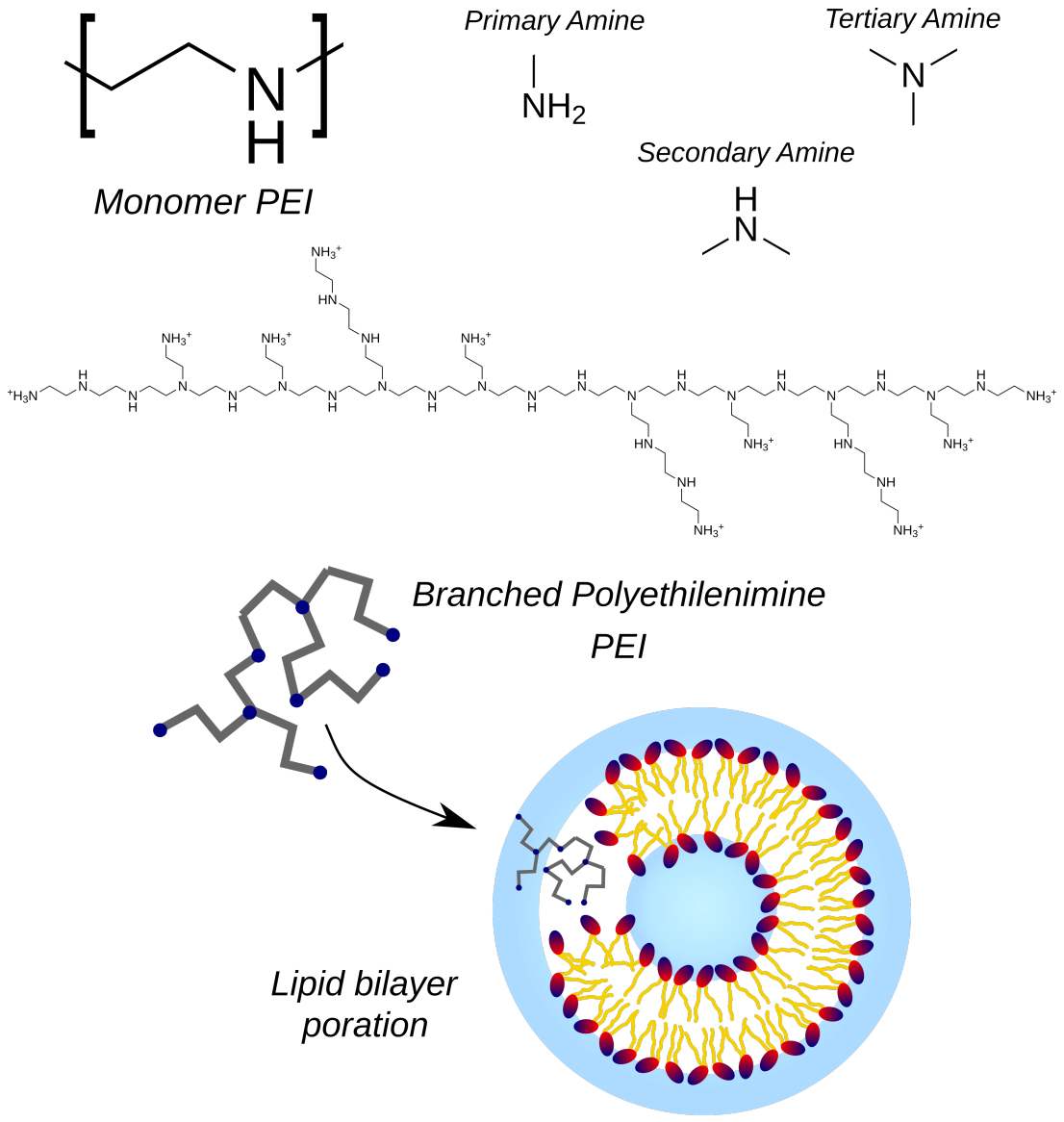

Figura 6.4: Esquema que presenta a estrutura molecular do PEI e a formación do poro nunha membrana lipídica.

Os liposomas serán empregados agora como modelo de membrana, e a calorimetría diferencial de varrido e a simulación de dinámica molecular, entre outras técnicas experimentais, mostrarán resultados para entender a dinámica da formación do poro debido á presenza do polímero PEI. En particular, utilizarase un PEI altamente ramificado e de

baixo peso molecular.

6.2 Bicapas lipídicas dopadas con surfactantes gemini

6.2.1 Caracterización termodinámica de liposomas dopados con gemini

A bicapa lipídica é un exemplo de fase liotrópica que consiste nunha colocación dos lípidos unindo as súas cadeas hidrocarbonadas e expoñendo as súas unidades polares cara ao exterior, en contacto coa auga (ver a figura 2). As cadeas hidrocarbonadas dos lípidos teñen diferentes conformacións, cuxa natureza reside nos diferentes valores que pode adoptar o diedro dos dous planos que se forman en catro átomos de carbono consecutivos. Na figura 6.5 preséntanse as posicións do diedro e os seus equilibrios estables (*trans* e *gauche*) e inestables (*eclipsed* e *cys*).

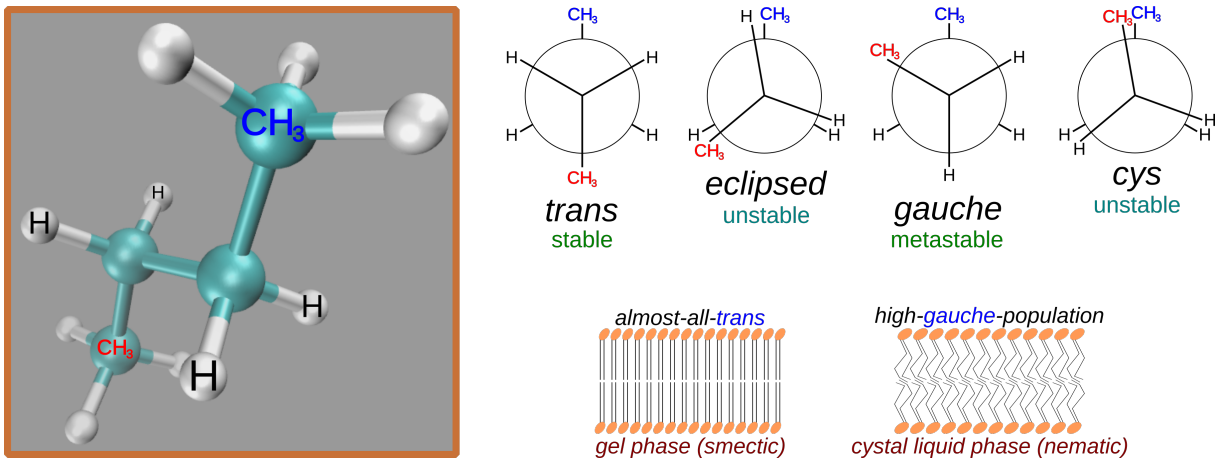

Figura 6.5: Representación esquemática dos isómeros do butano observando os diferentes diedros formados na súa cadea. Establécese a relación coas fases xel e cristal-líquido nunha bicapa lipídica

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Un posible método a considerar para caracterizar dúas fases diferenciadas na bicapa lipídica -*xel* e *cristal-líquido*- pode centrarse na identificación dos isómeros do butano presentados na figura 6.5. Segundo este criterio, a fase *xel* correspondería a unha confi-

guración *trans* na gran maioría dos diedros, mentres que na fase *cristal-líquido* teríamos unha relevante poboación de *gauche*[192–194]. Debido ás características cuánticas da natureza da isomerización, os intercambios entre os estados *trans* e *gauche* dependen da enerxía dispoñible para superar o salto en enerxía entre os dous estados. A enerxía conformacional entre *trans* e *gauche*, nunha cadea simple de catro carbonos -butano-, ten un valor de 3.8 kJ·mol^{-1}[195]. A magnitude desta enerxía corresponde con lonxitudes de onda no espectro infravermello e a enerxías da orde de movementos Brownianos. O principal composto dunha dispersión de fases lamelares, ou liposomas, é a auga. Así, podemos considerar ás moléculas de auga como o contacto térmico das bicapas lipídicas ou, dito doutro xeito, o elemento encargado de subministrar enerxía ás bicapas lipídicas para os seus cambios conformacionais. A parte polar das bicapas lipídicas forman unha barreira difusiva para o transporte da enerxía dende as moléculas de auga ata as cadeas hidrocarbonadas. Empregando o argumento de transporte da enerxía previamente introducido, é posible explicar o fenómeno experimental de que a lonxitude das cadeas hidrocarbonadas determina diferentes temperaturas de transición[196]. A temperatura de transición indicaría o límite ao cal a poboación *gauche* comeza a ser o suficientemente relevante para mostrar cambios a nivel conformacional na bicapa. A enerxía para explorar as diferentes configuracións dos isómeros nos diedros das cadeas de carbono son sempre as mesmas, pero as diferentes lonxitudes implican un número distinto de diedros, co que será preciso máis enerxía canto maior sexa o número de diedros. Así enténdese que a temperatura de transición en bicapas lipídicas formadas por fosfatidilcolinas se incremente gradualmente coa longura das cadeas hidrocarbonadas[196].

Seguindo a dinámica establecida, un elemento que tamén implica cambios na transición entre conformacións da bicapa lipídica é a presenza de surfactantes. No noso traballo imos estudar estas interaccións empregando unha familia de surfactantes gemini como a presentada na figura 6.6 (14-4-14 (GS4), 14-6-14 (GS6), 14-12-14 (GS12), 14-14-14 (GS14) e 14-20-14 (GS20) -ver sección de materiais). As transicións *xel* a *cristal-líquido* na membrana lipídica son estudadas dende modelos simples de dous estados, teorías de

USC DE COMPOSTELA

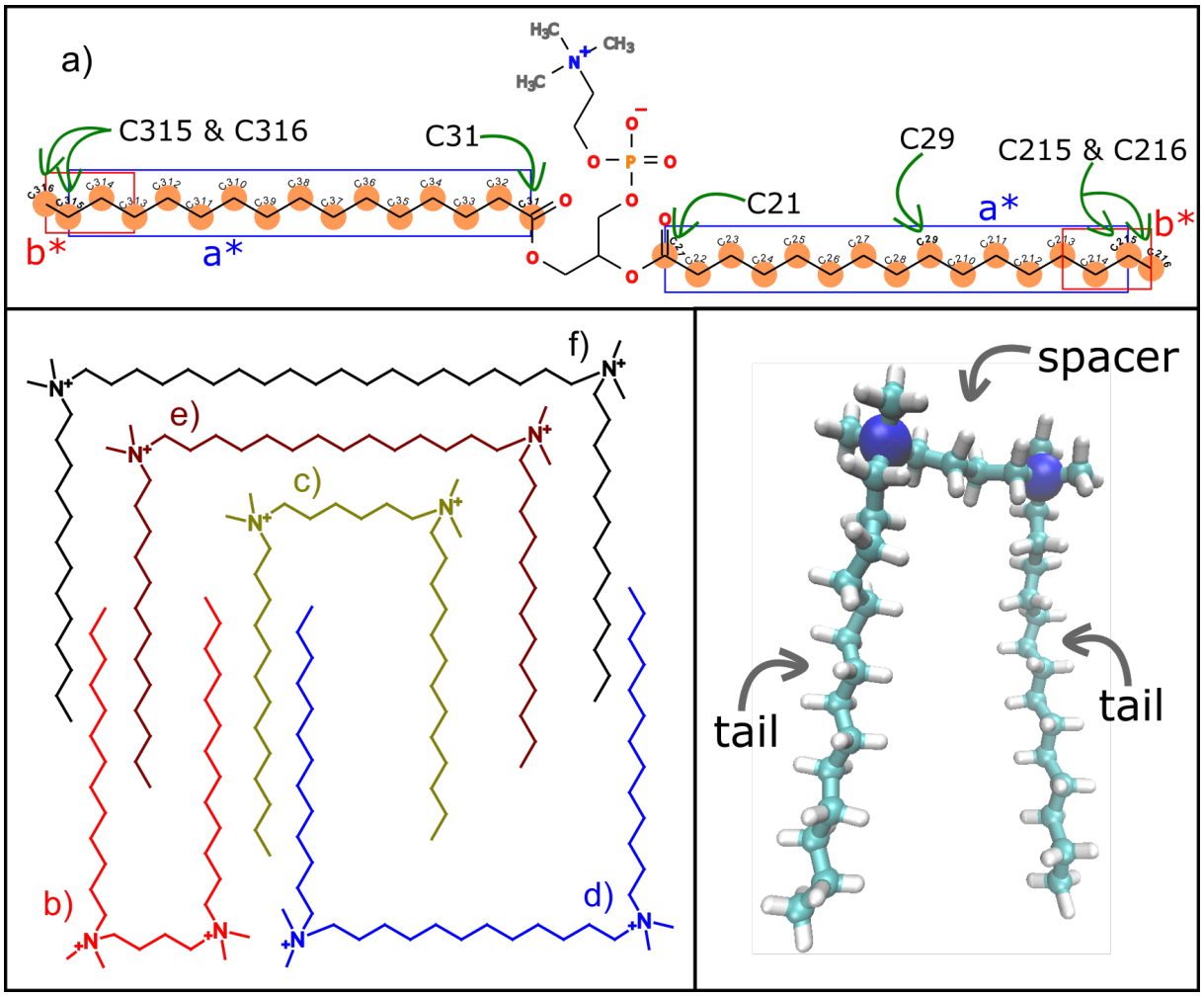

Figura 6.6: Representación da estrutura molecular do DPPC, identificando os átomos de carbono segundo serán empregados para a análise de traxectorias de dinámica molecular: rexión a* identifica os diedros do interior das colas do DPPC, a rexión b* os diedros dos extremos das colas. Tamén se presentan as estructuras moleculares dos surfactantes gemini empregados: b) GS4, c) GS6, d) GS12, e) GS14 e f) GS20. Representación da estrutura xeral dun surctante gemini: *tail* (colas) e *spacer* (espazador).

cooperatividade ou metodoloxías baseadas en Montecarlo. Nós imos usar un entorno de traballo centrado no paradigmático modelo de Ising para interpretar o rol dos surfactantes gemini na bicapa lipídica. O modelo de Ising é un modelo da mecánica estatística que foi orixinalmente empregado para explicar o ferromagnetismo e outras transicións de fase dependentes da temperatura[49]. En temos xerais, o modelo de Ising convencional, para transicións de fase nun sistema bidimensional, está baseado na existencia de partículas

centradas nos nodos dunha rede con dous posibles estados (+1 ou -1). Cada partícula está acoplada cos seus primeiros veciños; é dicir, o estado da partícula i-ésima está influenciado polo estado dos seus veciños inmediatos. Baixo esta hipótese, existirá unha temperatura crítica por debaixo da cal as partículas atoparanse no mesmo estado. O modelo de Ising bidimensional xa foi aplicado con éxito en sistemas de bicapa lipídica[50]. Deste xeito, empregaremos o modelo para comprender os factores que xogan un rol principal, así como as características da temperatura de transición, en sistemas formados por bicapas lipídicas dopadas con surfactantes gemini.

O modelo de Ising toma a seguinte forma matemática en ausencia dun campo externo: $H = -J\sum s_i s_j$, onde s_i e s_j son os valores dos estados de cada partícula na rede. Na nosa representación, estes parámetros representan os isómeros *trans* (+1) e *gauche* (-1); e J é o termo enerxético que toma conta da magnitude da interacción entre veciños, ou do acoplamento. A medida que este valor decrece, a temperatura de transición tamén decrece. Aplicaremos este modelo aos nosos sistemas estudados experimentalmente, plantexando novas interpretacións ou adaptacións dos parámetros de modelos de Ising aplicados a bicapas lipídicas[50].

Seguindo os argumentos propostos, podemos propoñer unha secuencia de acontecementos que explique os cambios na temperatura de transición en bicapas lipídicas inducidos pola presenza de surfactantes gemini. As figuras 6.7 mostran os entalpogramas de DSC de sistemas lamelares compostos por DPPC e dopados con diferentes cantidades de surfactantes gemini de distintas longuras de espazador: 14-4-14 a 14-20-14 (ver a figura 6.6). Como pode apreciarse nas figuras 6.7, a temperatura de transición das fases *xel* a *cristal-líquido* diminúe, en xeral, a medida que aumenta concentración de surfactante, ao mesmo tempo que a anchura dos sinais da transición aumenta.

A figura 6.8 mostra a relación das temperatura de transición, adoptando o criterio da selección do máximo valor nos sinais das figuras 6.7. Como se apreciaba anteriormente, manifféstase, en xeral, unha diminución da temperatura de transición debido ao aumento da concentración de surfactante gemini. A inserción do surfactante na bicapa lipídica estaría

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

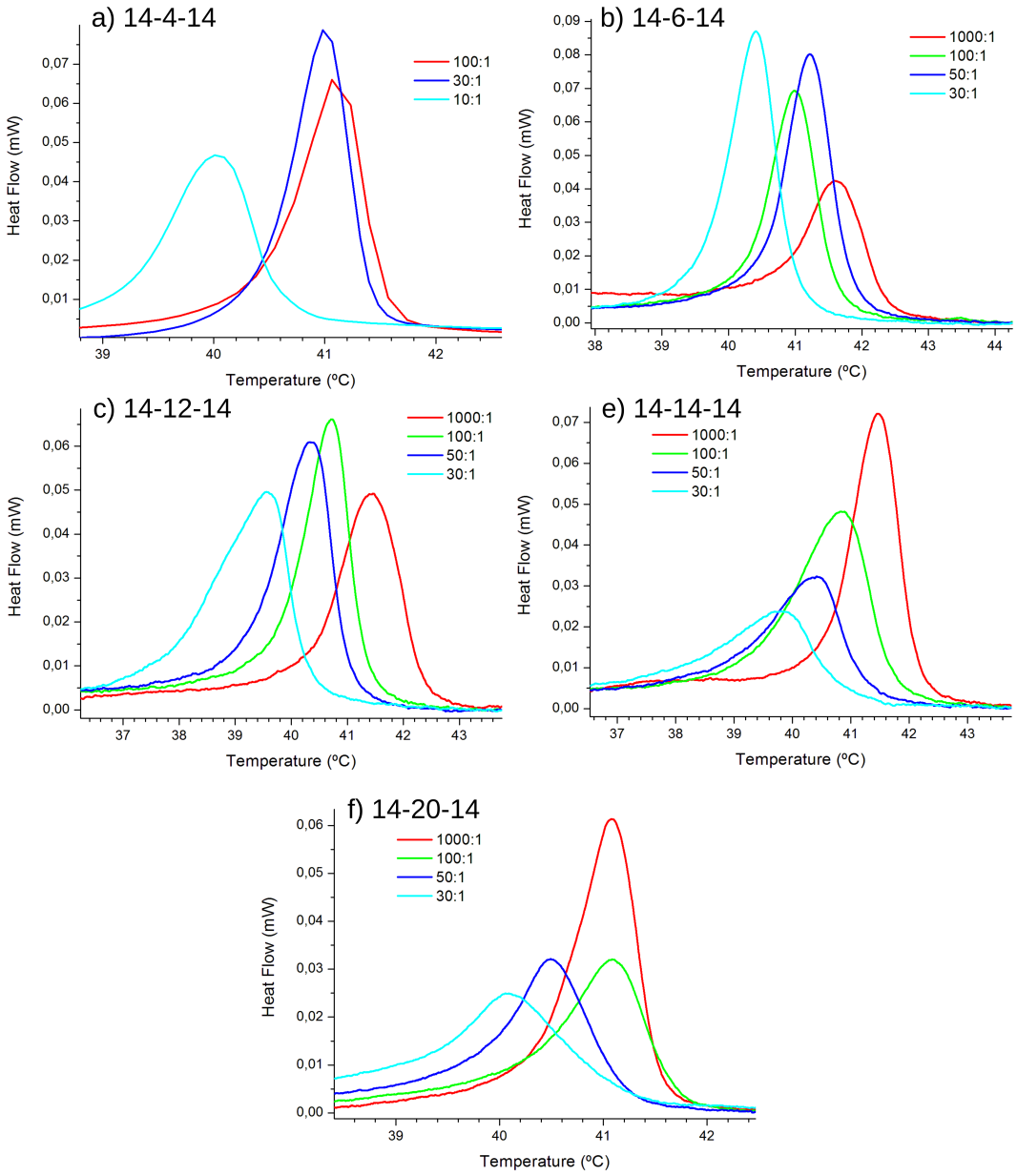

Figura 6.7: Entalpogramas de DSC para os liposomas de DPPC/gemini a diferentes concentracións de surfactante e con diferentes longuras de espazador. Cada color corresponde a un ratio DPPC/gemini diferente, dende 1000/1 a 30/1. O diferentes conxuntos mostrados son para os diferentes sistemas estudados: a) DPPC/gemini 4 (14-4-14), b) DPPC/gemini 6 (14-6-14), c) DPPC/gemini 12 (14-12-14), d) DPPC/gemini 14 (14-14-14) e e) DPPC/gemini 20 (14-20-14).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

a reducir a interacción entre os lípidos, ao tempo que estaría acoplando máis intensamente os lípido coa auga, que cedería a enerxía necesaria para os cambios conformacionais a

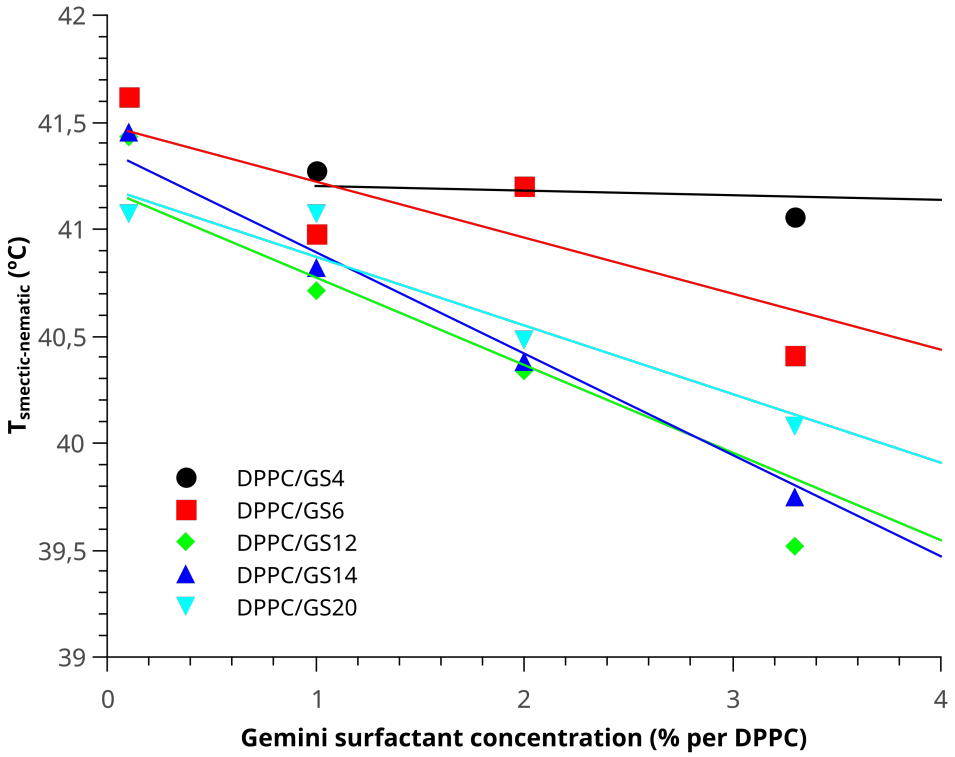

Figura 6.8: Representación das temperaturas de transición *xel* a *cristal-líquido* para os sistemas liposómicos baseados en DPPC dopados con surfactante gemini. Represéntanse os valores dos máximos dos sinais de transición das figuras 6.7

unha temperatura cada vez menor. Explicaremos este proceso en termos do modelo de interacción de Ising, anteriormente mencionado. A presenza dos surfactantes gemini na bicapa lipídica provocaría que os cambios de isomerías fosen accesibles a temperaturas máis baixas. Posto que a presenza dos gemini non implica reaccións químicas que muden a estrutura molecular nin dos surfactantes nin dos lípidos, as enerxías necesarias para os cambios entre os isómeros non se modifican. Como as moléculas de auga son as encargadas de subministrar a enerxía para os cambios de isomería, a presenza dos surfactantes gemini aumentaría a probabilidade de transmisión da enerxía necesaria, dende a auga ás cadeas hidrocarbonadas. O decaemento do valor J no modelo de Ising podería entenderse como un aumento da probabilidade de contacto entre os grupos CH_2 e as moléculas de auga.

A figura 6.9 mostra a variación da anchura a metade de altura para os picos das figuras

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

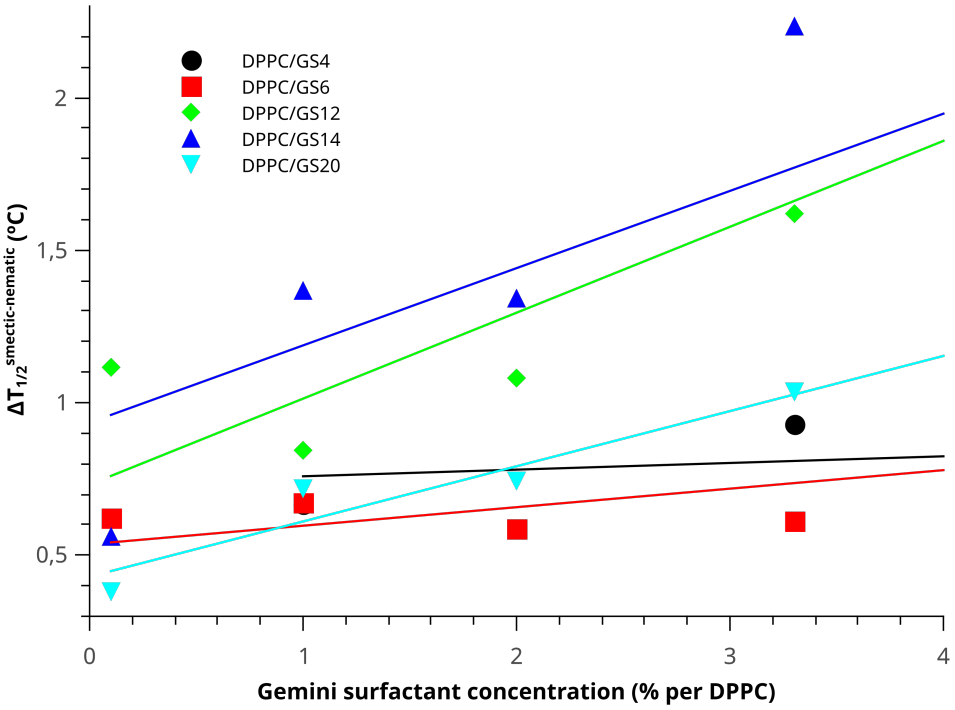

Figura 6.9: Representación das anchuras a metade de pico das transicións *xel* a *cristal-líquido* para os sistemas liposómicos baseados en DPPC dopados con surfactante gemini. Represéntanse os valores de amplitude dos sinais de transición das figuras 6.7

6.7, todo coa variación da concentración de gemini e a longura dos seus espazadores. A presenza de surfactante gemini implica cambios na temperatura de transición, decrecendo a súa temperatura crítica; mentres, a probabilidade de absorber a enerxía de isomerización está asociada con un rango de temperatura cada vez máis grande, canto máis gemini hai na bicapa. Comparando co sistema puro de bicapa de DPPC, os sistemas compostos DPPC/gemini posúen unha heteroxeneidade intrínseca a nivel molecular, posto que hai zonas de bicapa onde un lípido ten unha contorna de lípidos, e outras onde o gemini está presente. Nun sistema heteroxéneo a transmisión daquela enerxía acontecerá nun rango máis ancho de temperatura, simulando á convolución dunha xeira de transicións consecutivas (véxase o esquema da figura 6.10). Botando man do modelo de Ising, o termo enerxético do acoplamento (J) non ten unha distribución homoxénea ao largo da bicapa cando hai gemini presente, debido á inhomoxeneidade que a dopaxe implica. Así, cada

zona da bicapa cunha determinada J terá asociada unha temperatura crítica, que variará sensiblemente en función das flutuacións que sufre o acoplamento.

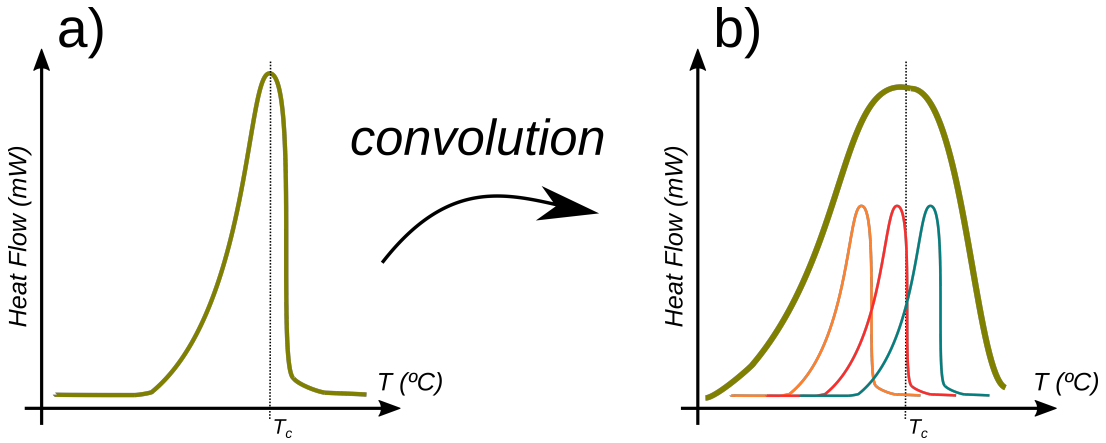

Figura 6.10: a) Esquema da representación dunha transición debida a un sistema homoxéneo gobernado cun factor único de acoplamento J. b) Esquema da convolución de diferentes transicións nun sistema con heteroxeneidades, gobernada a súa transición por diferentes valores de J_1, J_2, J_3, ...

A figura 6.11 mostra os valores das entalpías calculadas como a área baixo os picos de transición medidas a través de DSC. De novo, preséntanse os datos en función da variación da concentración de surfactante e dos distintos espazadores. O cálculo da entalpía, aínda que sinxelo, garda unha pequena complicación. Para a correcta estimación é preciso asumir unha liña base que une as rexións dunha fase e da outra, unindo os "brazos" dos picos. Se a anchura do pico é relativamente pequena, este proceso é moi simple; pola contra, se a anchura do pico é notable o éxito no cálculo vai a estar sometido á boa determinación desa liña base. As entalpías preséntanse en función da molaridade. A primeira das conclusións é que a presenza do surfactante gemini, polo menos ata ratios DPPC/gemini de 30/1, non fai desaparecer o sinal da transición, co que a fase lamelar está sempre presente. Ademais, si se representa o valor medio das entalpías para todas as concentración de cada sistema DPPC/gemini, o resultado mostra valores menores que a entalpía da transición en bicapas de DPPC puro. Empregando o rol de grado de acoplamento de J, o decaemento neto da entalpía implicaría un diminución da intensidade de interacción entre os DPPC causada pola presenza dos gemini. É preciso sinalar aquí que tamén as diferencias estruturais entre

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

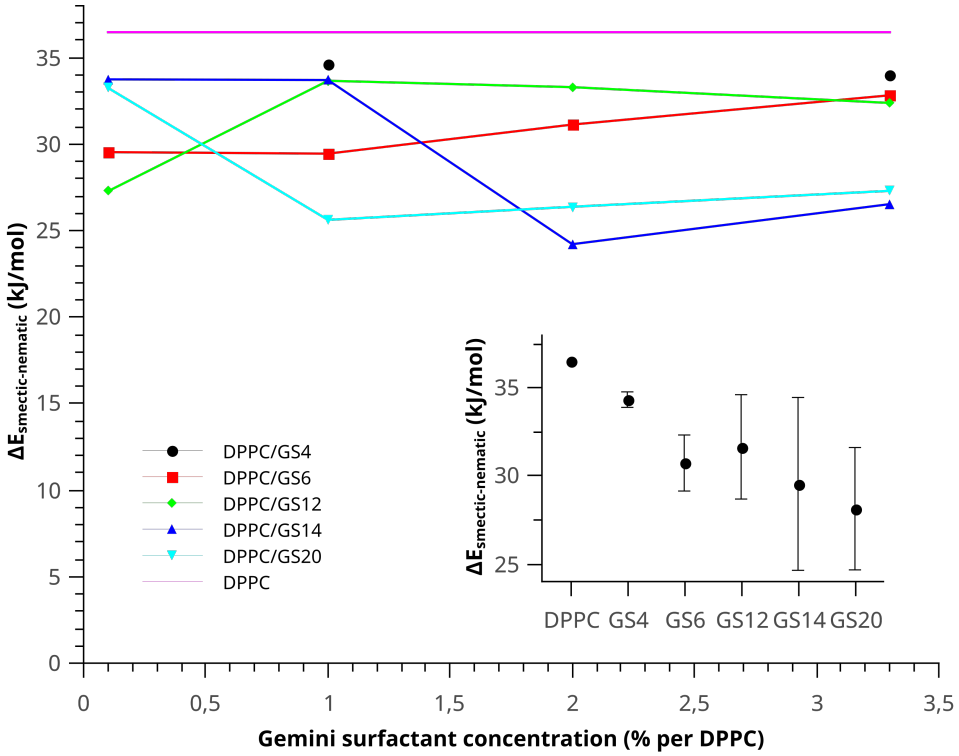

Figura 6.11: Variación da entalpía das transicións para os sistemas DPPC/gemini fronte á concentración relativa de surfactante en relación á cantidade de DPPC, para as diferentes longuras de espazador. A figura insertada mostra os valores medios e a desviación estándar dos valores da entalpía para canda unha das longuras de espaciador.

os lípidos e os gemini promoverían alteracións a nivel de empaquetamento molecular nas bicapas lipídicas. Este feito apunta cara a posible relevancia que poden ter os modos e formas que os gemini adopten dentro da bicapa.

O incremento da cantidade de gemini, co que se dopan a bicapas lipídicas, implica, en xeral, alteracións na conformación da bicapa que se acentúan con ese aumento. Tamén, a figura 6.12 mostra diferencias importantes nas implicacións da presenza do gemini dependendo da longura do espazador do gemini empregado. Como pode verse na figura 6.12a, a temperatura de transición decrece co aumento da longura dende 4 a 6, mentres que a temperatura aumenta do espazador 12 ao 20. Cos datos de DSC representados e analizados ata o momento, podemos concluír sospeitas de que este comportamento podería estar relacionado con diferentes configuracións e colocacións dos gemini de corto espazador fronte os de largo espazador na bicapa lipídica. Para confirmar esta hipótese,

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

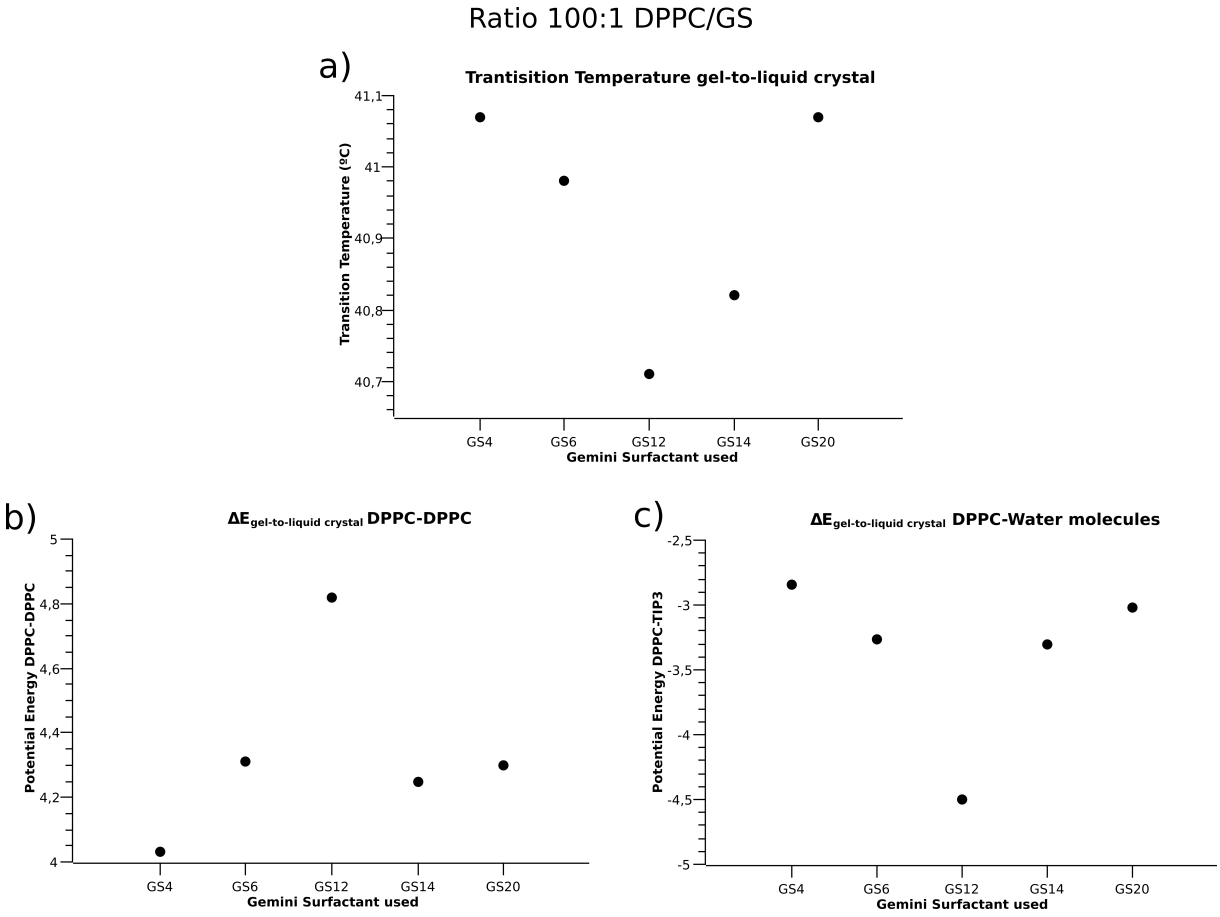

Figura 6.12: a) Representacións dos cambios na temperatura de transición para os sistemas DPPC/gemini con ratio 100/1 para as diferentes longuras de espazador. Tamén se representa a enerxía de interacción Coulomb e Lennard-Jones determinada con simulación de dinámica molecular para b) DPPC-DPPC e c) DPPC-moléculas de auga.

realizaranse simulacións de dinámica molecular.

6.2.2 Dinámica molecular *In silico*. A colocación dos gemini

Empregamos simulacións de dinámica molecular para observar a localización na bicapa e tamén as interaccións dos surfactantes gemini coa bicapa lipídica. Para levar a cabo este estudio realizáronse cinco simulacións en celdas constituídas por 128 moléculas de lípido DPPC e 1 molécula de surfactante gemini. Cada unha das simulacións correspondeu a cada un dos gemini de espazador 4, 6, 12, 14 e 20. As cinco simulacións foron realizadas primeiro a unha temperatura de 20 °C e, logo, a 50 °C. A selección destas temperaturas

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

débese a que pertencen de maneira ben establecida a cada unha das dúas fases que as medidas de DSC mostraron na conformación da bicapa -*xel* e *cristal-líquido* (ver figuras 6.5).

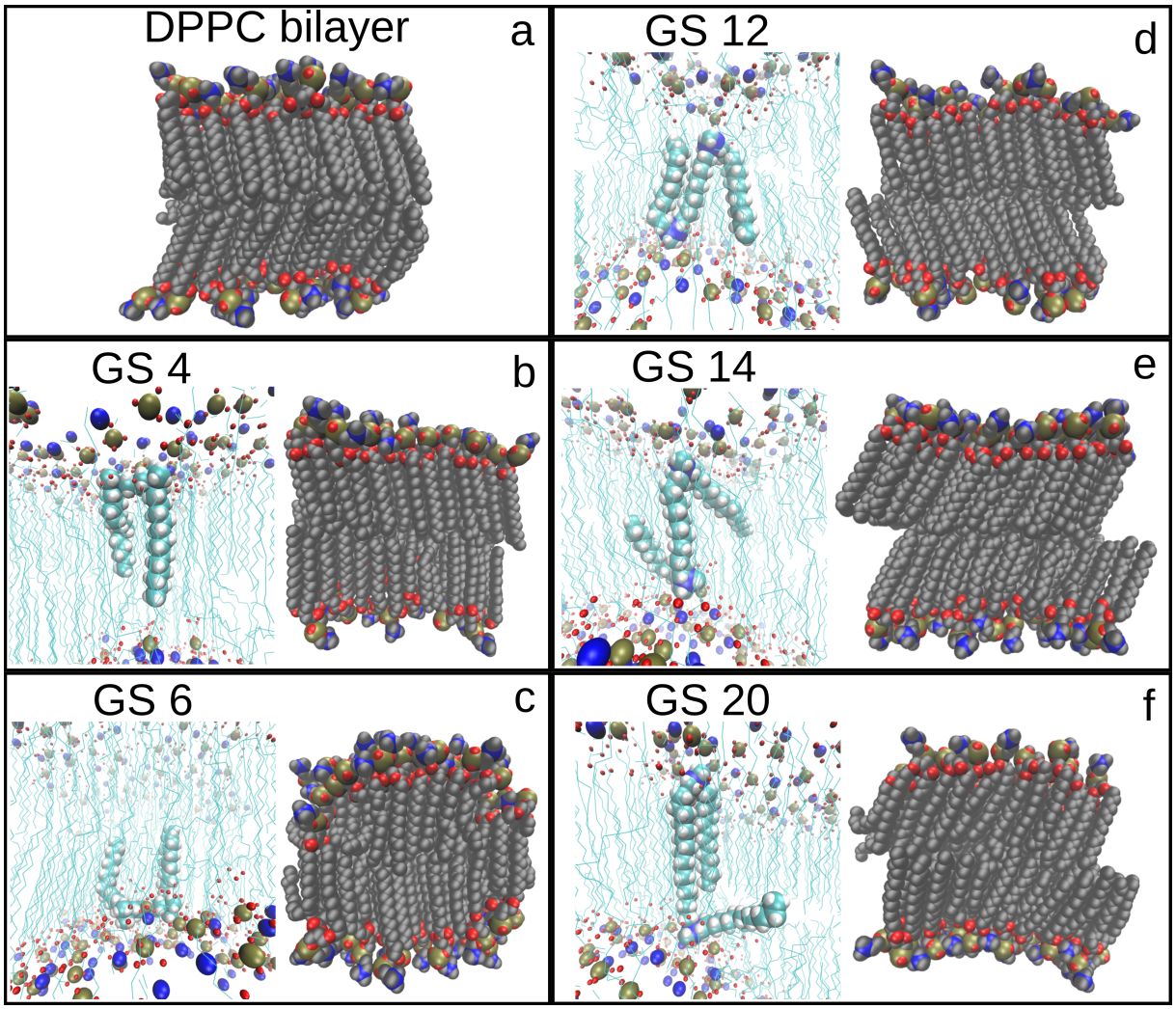

Figura 6.13: Representación de *snapshots* de simulación de dinámica molecular a 20 °C para os sistemas DPPC e DPPC/gemini con diferentes longuras de espazador, para un ratio 128/1. As imaxes da dereita en cada unha das representacións mostra a conformación das cadeas hidrocarbonadas do DPPC, e as imaxes da esquerda mostran a parte interna da bicapa lipídica, resaltando a representación polar dos lípidos e cada un dos surfactantes gemini, co fin de apreciar a súa colocación específica. a) DPPC, b) DPPC/gemini 4, c) DPPC/gemini 6, d) DPPC/gemini 12, e) DPPC/gemini 14 e f) DPPC/gemini 20.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A figura 6.13 mostra *snapshots* para cada simulación nalgún instante final correspondente a zonas de equilibrio, en termos enerxéticos. A 20 °C, o gemini de espazador 4 e

o de 6 teñen unha colocación determinada, orientando as súas dúas partes polares cara unha única folla da bicapa lipídica. Alternativamente, os gemini de espazador 12, 14 e 20 adoptaron unha acomodación en *zigzag*, de xeito que colocaron cada unha das súas partes polares cara ás dúas follas da bicapa. As implicacións desta disposición dos gemini na bicapa poden resultar moi relevantes a efectos por exemplo da temperatura de transición. O primeiro é observar que a diferente colocación dun gemini de corto espazador fronte a un de largo, implica variacións importantes no potencial eléctrico transmembrana, a nivel local. Isto é evidente pois no caso do espazador corto, as dúas cargas están situadas nunha das follas da bicapa, deixando a súa *antípoda* (a cara oposta) sen contribución de carga debida ao gemini. Mentres, a colocación dos gemini de espazador longo permite un reparto equitativo das cargas, posicionando unha carga nunha folla, e outra na folla contraria. Na figura 6.14 pódense observar os perfís de potencial electrostático nas bicapas simuladas, no que se observan as asimetrías no potencial inducidas por un reparto non simétrico da carga -espazador corto-, e unha simetría no potencial debida a un reparto equilibrado da carga -espazador longo-. A 50 °C os resultados en canto á colocación foron os mesmos.

Os perfís de densidade, ao longo da dirección normal á bicapa, son mostrados tamén na figura 6.14. Como pode apreciarse, a colocación *unilateral* e asimétrica dos gemini de espazador 4 e 6 queda manifestada no perfil da densidade dos átomos N^+. Do mesmo xeito, a colocación *bilateral* e simétrica dos gemini de espazador 12, 14 e 20 queda tamén mostrada na densidade dos seus átomos N^+.

As diferencias significativas na localización, dos surfactantes gemini con diferentes longuras, observadas mediante simulación de dinámica molecular axúdannos a avaliar o rol do gemini na conformación da bicapa lipídica. Na figura 6.15 móstranse as funcións de distribución radial (RDF), centrando a referencia para o cómputo da distribución no átomo de carbono C29 dos DPPC (ver figura 6.6). A 20 °C as RDF mostran seis picos para todos os sistemas DPPC/gemini. Os máximos nas funcións de distribución radial indican presenza dun veciño acoplado, co que podemos determinar a existencia de acoplamento entre os seis primeiros veciños en orde radial. Este acoplamento explica o fenómeno de or-

USC DE COMPOSTELA

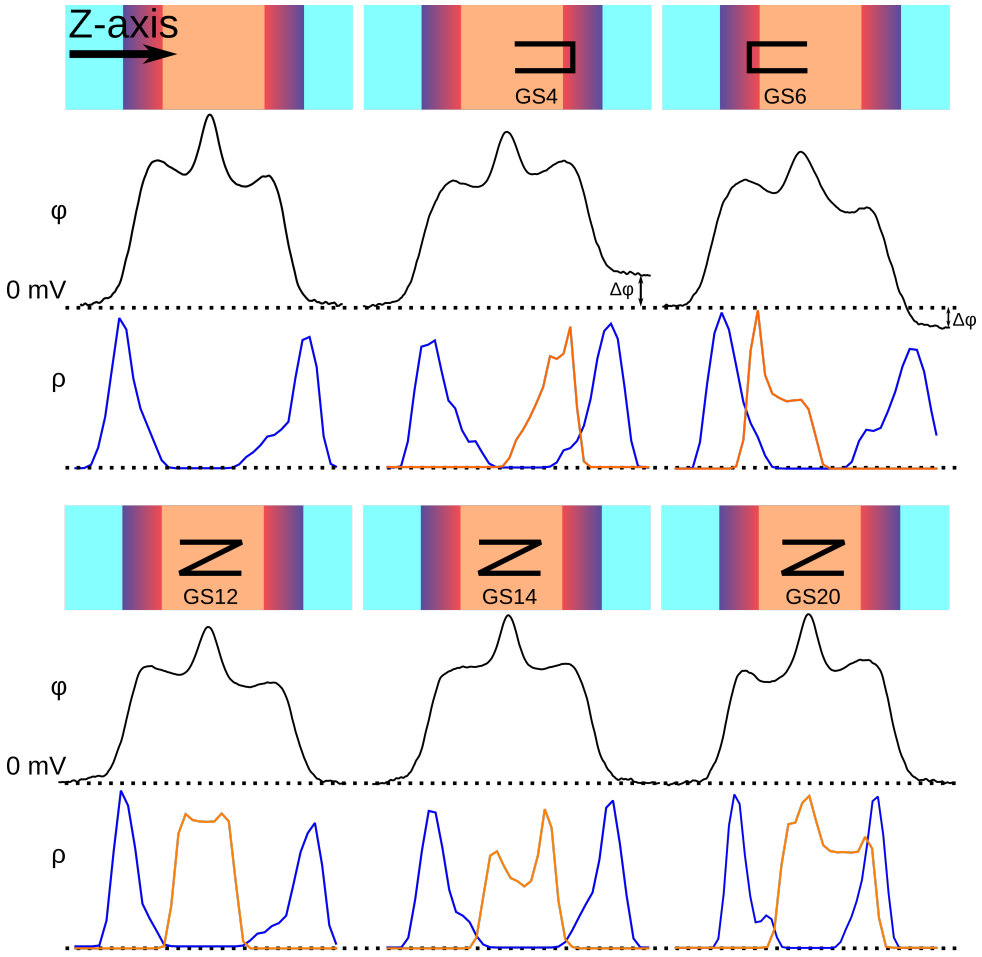

Figura 6.14: Representación do potencial transmembrana (liñas negras), dos perfís de densidade dos N^+ dos DPPC (liñas azuis) e dos N^+ dos surfactantes gemini (liñas laranxa). As representacións coloradas mostran un esquema simplificado da bicapa lipídica ao largo do eixo Z, as *N* negras mostran a colocación dos surfactantes de espazador longo. Tanto os potenciais eléctricos como os perfís de densidade foron construídos co promedio nos últimos 50 ns das traxectorias de simulación.

denamento *xel* que se observa a estas temperaturas, manifestando unha fase *esméctica* na materia branda que se caracteriza pola existencia dunha dirección privilexiada cara onde as cadeas hidrocarbonadas parecen orientarse. A 50 °C, as RDF involucran unicamente aos tres primeiros veciños en orde radial. Así, o acoplamento é máis débil, traducíndose estruturalmente nunha fase *cristal-líquido* ou *nemática*. Existe unha dirección sobre o sistema, pero esta vez as cadeas hidrocarbonadas non se orientan rixidamente cara a esa dirección. O feito de que non se aprecien grandes diferenzas na distribución radial entre

todos os sistemas concorda cos resultados de DSC. A ruptura dese orde e o salto dunha coordinación de sexto orde a unha de terceiro refléxase nas medidas calorimétricas onde acontecía unha transición.

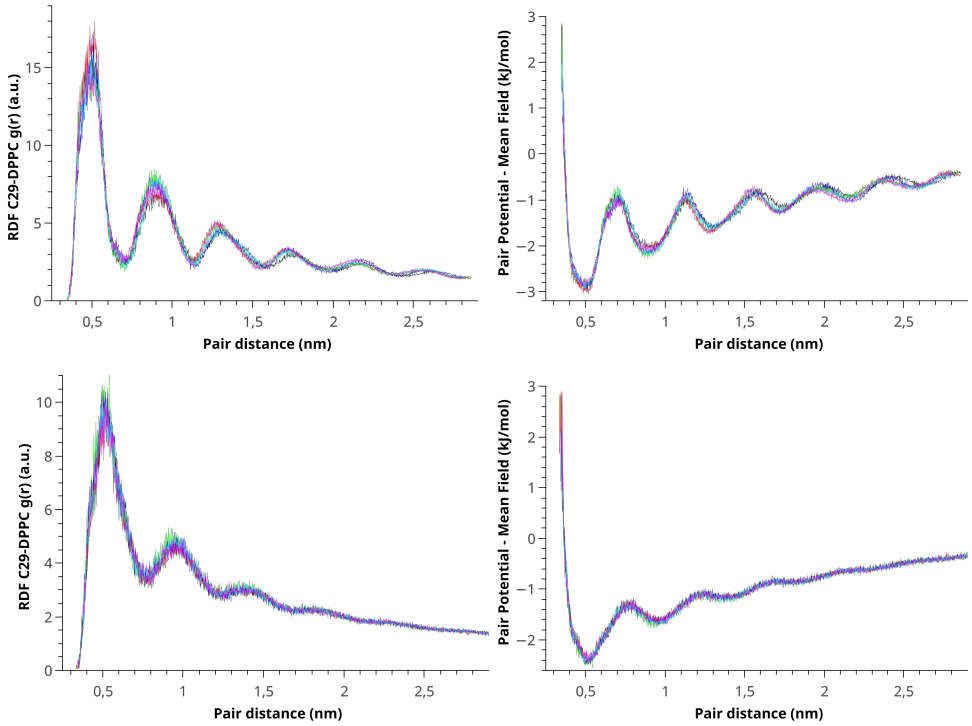

Figura 6.15: Representacións das funcións de distribución radial (RDF) e o potencial de parellas de campo medio para o carbono C29 do DPPC (véxase a figura 6.6). As RDF foron computadas empregando os datos dos últimos 50 ns das traxectorias de simulación de dinámica molecular. As enerxías potenciais calcúlanse relacionando o potencial de parellas ($w^{(2)}$) e a RDF ($g(r)$): $w^{(2)}(r) = -k_B T \log g(r)$

As imaxes mostradas na figura 6.13 mostran tamén outras diferencias apreciables, ademais das comentadas. Mentres que para a bicapa composta unicamente por DPPC as cadeas hidrocarbonadas dos lípidos mostran unha configuración *cross-tilted* ou inclinada e cruzada entre as follas da bicapa; a presenza do gemini elimina aparentemente o cruzamento e apenas existe a compoñente inclinada nas dúas follas. Este fenómeno non se aprecia nas RDF da figura 6.15 debido a que a coordinación entre as cadeas hidrocarbonadas é a mesma radialmente, nas dúas configuracións que se aprecian: inclinada-cruzada ou inclinada. Unha forma cuantitativa de observar este efecto de cruzamento é representar

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

o valor medio das inclinacións de cada unha da follas da bicapa para todos os sistemas, na figura 6.16 obsérvase o ángulo promedio da inclinación das cadeas hidrocarbonadas de cada folla. Como pode verse, a orientación media para a bicapa de DPPC mostra a inclinación cruzada, mentres que cando o gemini é incorporado á formulación, o ángulo entre os vectores aproxímase a 180°, reflexando así unha organización inclinada e non cruzada.

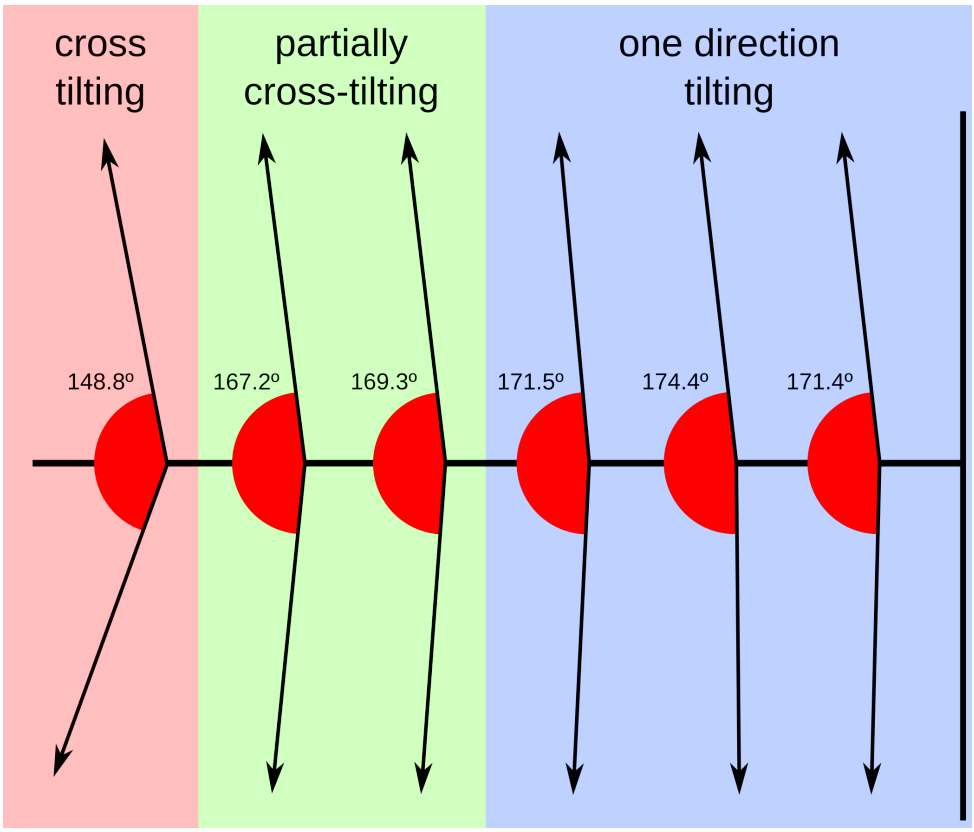

Figura 6.16: Diagrama vectorial representando a os ángulos de inclinación promedio das cadeas hidrocarbonadas dos lípidos en cada unha das follas da bicapa. O ángulo entre o vector superior e o inferior está calculado promediando os valore dos últimos 50 ns das traxectorias das simulacións. O eixo vertical non corresponde á compoñente normal á bicapa, os vectores foron rotados para mostrar unha representación menos sesgada pola dirección, pero mantendo o ángulo entre eles.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

As diferencias sobre estas conformacións no estado *xel* xogarían un papel determinante na permeabilidade da membrana[197]. Así, a presencia dos gemini implica cambios na membrana lipídica, eliminando a organización inclinada e cruzada e favorecendo unha

organización apenas inclinada. A figura 6.17 representa a mesma información que a figura 6.16, complementada co efecto visual de observar a inclinación media sobre os eixos Y e Z.

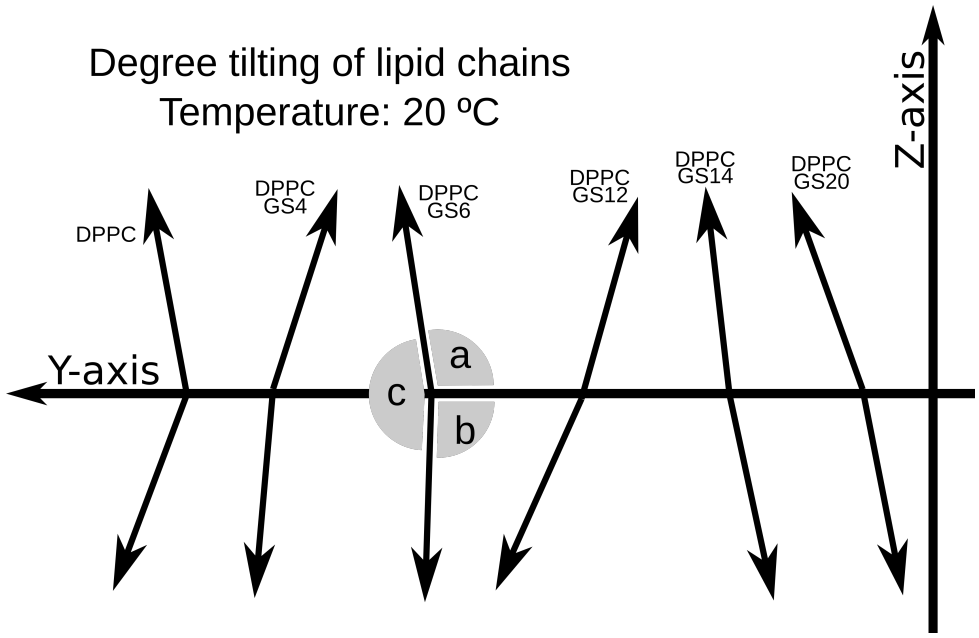

Figura 6.17: Representación vectorial dos valores medios dos ángulos formados polas cadeas hidrocarbonadas dos DPPC coa dirección normal á bicapa.

Como se expuxo en seccións previas, as diferencias entre a fase *xel* e a *cristal-líquido* ten a súa orixe no cambio de poboacións nos diedros das cadeas hidrocarbonadas dos DPPC. Así, computáronse os diedros entre todos os consecutivos carbonos das cadeas hidrocarbonadas dos DPPC, e promediouse os valores durante os últimos 50 ns de cada simulación. O criterio para determinar o tipo de isómero, en función do diedro calculado, está representado na figura 6.18.

A táboa 6.1 mostra os porcentaxes de cada un dos isómeros en función dos diedros nas cadeas dos lípidos. Pode observarse unha diferencia significativa entre os porcentaxe de *gauche* entre os diedros de C315 a C31 e C215 a C21, ou os diedros C316-C313 e C216-C213. Este últimos son os diedros do extremo das cadeas hidrocarbonadas. A diferencia nas poboacións entre os isómeros a diferentes temperaturas, como xa foi introducido, é a causa das transicións de fase conformacionais na bicapa lipídica[50].

USC DE COMPOSTELA

Táboa 6.1: Porcentaxes de isomerías calculadas computando os diedros nas cadeas hidrocarbonadas dos DPPC nos 50 ns últimos das traxectorias de simulación. *a* son as porcentaxes dos diedros entre C215 a C21 e C315 a C31 (ver figura 6.6). *b* son as porcentaxes dos diedros C216-C213 e C316-C313 (ver figura 6.6).

Porcentaxes de conformación dos diedros de DPPC a 20 °C

	DPPC		DPPC/GS4		DPPC/GS6		DPPC/GS12		DPPC/GS14		DPPC/GS20	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
trans	90.38	75.82	90.68	76.82	90.43	77.23	91.29	77.06	90.63	76.93	90.93	78.14
eclipsed	2.51	3.74	2.45	3.66	2.55	3.67	2.41	3.64	2.53	3.67	2.45	3.61
gauche	7.09	20.40	6.85	19.48	7.00	19.06	6.30	19.25	6.82	19.36	6.60	18.21
cys	0.02	0.04	0.02	0.05	0.01	0.05	0.01	0.05	0.02	0.04	0.02	0.05

Porcentaxes de conformación dos diedros de DPPC a 50 °C

	DPPC		DPPC/GS4		DPPC/GS6		DPPC/GS12		DPPC/GS14		DPPC/GS20	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
trans	69.60	61.30	69.49	61.39	69.60	61.27	69.18	61.20	70.15	61.51	69.64	61.32
eclipsed	6.34	5.81	6.30	5.85	6.33	5.89	6.36	5.81	6.23	5.81	6.31	5.83
gauche	23.97	32.78	24.13	32.72	23.98	32.73	24.37	32.88	23.54	32.56	23.97	34.74
cys	0.08	0.11	0.08	0.11	0.09	0.11	0.09	0.12	0.09	0.12	0.09	0.11

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

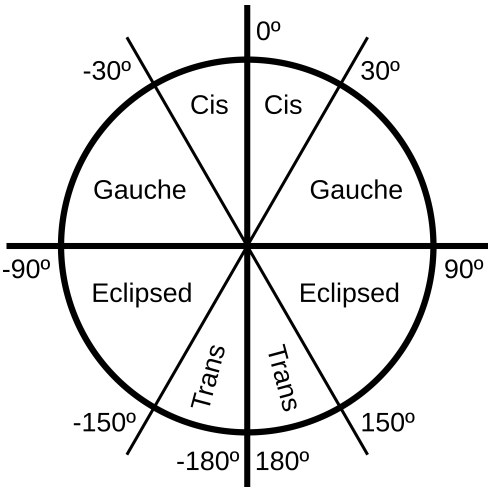

Figura 6.18: Representación esquemática do criterio empregado para identificar isómeros *trans*, *gauche*, *eclipsed* ou *cys* cando se computaron os valores dos diedros nas simulacións de dinámica molecular.

Na táboa 6.1 podemos observar unha lixeira diferencia entre as porcentaxes de poboación *gauche* a 20 °C entre os sistemas DPPC/gemini e DPPC puro. O sistema de DPPC mostra os valores máis altos para a poboación *gauche* a 20 °C. Este feito estaría a indicar que o gemini ten a habilidade de captar a enerxía necesaria para os cambios de isomería antes que as moléculas de DPPC. Así pódese confirmar que, levemente, a presenza de surfactante gemini favorece unha configuración *trans* nas cadeas hidrocarbonadas dos lípidos.

A táboa 6.2 mostra o valor medio das porcentaxes de isómeros a 20 °C e 50 °C para as colas e os espazadores dos surfactantes gemini. Como pode observarse, as diferencias para as dúas temperaturas non son significativas respecto das determinadas para os DPPC.

Co fin de concluír a relación efectiva entre a variación das poboacións de isomerías, determinadas por dinámica molecular, e as enerxías medidas por DSC, empregaremos as traxectorias de dinámica molecular para calcular un valor aproximado dos cambios de enerxía entre diferentes partes do sistema, entre as dúas temperaturas empregadas. Deberase considerar a existencia de 26 diedros na cadeas hidrocarbonadas dos DPPC, 24 dos cales determinan a parte interna das cadeas hidrocarbonadas, e os 2 restantes son os diedros configurados nos extremos de ámbalas dúas cadeas. Empregando as diferencias

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Táboa 6.2: Porcentaxes de isomerías calculadas computando os diedros nas cadeas hidrocarbonadas dos gemini nos 50 ns últimos das traxectorias de simulación. As porcentaxes preséntanse divididas en sectores da estrutura do gemini, colas (cola) e espazadores (esp) (ver figura 6.6).

Porcentaxes de conformación dos diedros dos gemini a 20 °C										
	GS4		GS6		GS12		GS14		GS20	
	cola	esp	cola	esp	cola	esp	cola	esp	cola	esp
trans	73.74	96.82	86.91	35.85	78.57	83.48	71.16	82.04	81.46	73.80
eclipsed	2.67	3.18	2.63	1.73	2.65	1.82	3.65	2.64	2.61	3.00
gauche	23.49	0.00	10.44	62.34	18.78	14.70	25.12	15.32	15.90	23.18
cys	0.10	0.00	0.02	0.09	0.00	0.00	0.07	0.00	0.03	0.01

Porcentaxes de conformación dos diedros dos gemini a 50 °C										
	GS4		GS6		GS12		GS14		GS20	
	cola	esp	cola	esp	cola	esp	cola	esp	cola	esp
trans	73.74	90.73	73.75	44.32	68.29	60.45	65.47	81.44	66.86	72.41
eclipsed	4.70	5.34	5.00	2.14	5.20	3.07	4.89	3.43	4.96	4.52
gauche	21.51	3.92	21.42	53.49	26.43	36.37	29.59	15.10	28.13	23.02
cys	0.05	0.00	0.03	0.04	0.08	0.11	0.05	0.03	0.05	0.05

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Táboa 6.3: Valores da variación das enerxías entre 20 °C e 50 °C tomando conta das diferenzas nas poboacións *trans* e *gauche*, así como a enerxía de interacción (Lennard-Jones e Coulomb) para o DPPC-DPPC e DPPC-moléculas de auga. A ΔE_{total} foi estimada como a suma de todas as contribucións anteriores.

kJ·mol$_{DPPC}$	DPPC	DPPC/GS4	DPPC/GS6	DPPC/GS12	DPPC/GS14	DPPC/GS20
ΔE_{gauche}	15.37	15.48	15.23	15.86	15.89	15.53
$\Delta E_{eclipsed}$	16.34	16.77	16.52	17.52	16.25	16.95
$\Delta E_{DPPC-DPPC}$	3.84	4.03	4.31	4.82	4.25	4.30
$\Delta E_{DPPC-auga}$	-2.49	-2.84	-3.26	-4.50	-3.30	-3.02
ΔE_{total}	33.06	33.44	32.80	33.69	32.10	33.75

de enerxía das isomerías do butano[195]: $\Delta E_{eclipsed}$ = 16,0 kJ·mol^{-1} e ΔE_{gauche} = 3,8 kJ·mol^{-1}, calcúlanse as enerxías asociadas ás diferencias de poboación de isomería entre as dúas temperaturas das simulación de dinámica molecular. Tamén, para complementar o valor o máis representativo posible da diferencia enerxética entre as temperaturas empregadas, inclúense no cálculo xeral a enerxías de Coulomb e Lennard-Jones para as interaccións DPPC-DPPC e DPPC-moléculas de auga.

A táboa 6.3 mostra os valores das diferencias de enerxía asociada a variación entre as dúas temperaturas, incluíndo a contribución referida aos cambios na isomería *gauche* e *eclipsed* e as enerxías de Coulomb e Lennard-Jones entre DPPC-DPPC e DPPC-moléculas de auga. Como se pode apreciar, o valor xeral da diferencia de enerxía implicada nestes cambios está en moi bo acordo co rango de valores determinados mediante as medidas de DSC, confirmando que os cambios nas isomerías son a principal compoñente nas enerxías que se detectan no calorímetro. Un comportamento necesariamente destacable é o que se pode apreciar na variación das enerxías de interacción DPPC-DPPC e DPPC-moléculas de auga. Na figura 6.12b e 6.12c observamos que o acoplamento DPPC-DPPC diminúe (aumentan os valores de enerxía positiva) nos gemini de espazador 4 a 6; mentres que o acoplamento entre ambas aumenta (diminúen os valores de enerxía positiva) do gemini 12 ao 20. Este comportamento concorda completamente co observado nas temperaturas de transición para o sistema con dopaxe similar ao empregado nas simulacións (128/1 e 100/1). O feito tamén se observa na enerxía de interacción entre o DPPC-moléculas de auga para os sistemas. Vese que para os gemini de espazador 4 a 6 o DPPC está

USC DE COMPOSTELA

máis ligado á auga, mentres que do espazador 12 ao 20 vai diminuíndo esa interacción. A interacción ou acoplamento da auga está relacionado co transporte da enerxía entre a auga e o interior da bicapa lipídica. Esta relación entre enerxías de interacción, acoplamento e temperaturas de transición tamén concorda coa lectura do sistema crítico mediante o modelo de Ising, no que J ten o rol de factor de acoplamento.

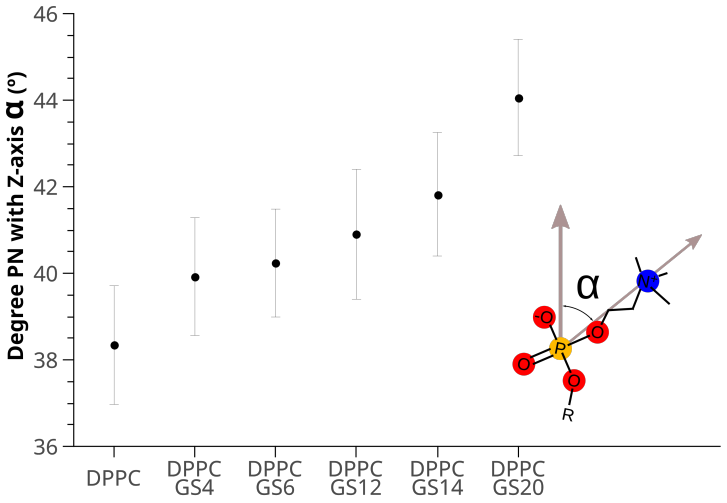

Figura 6.19: Valores promedios dos ángulos do vector P-N con referencia á normal á bicapa lipídica. Os cálculos foron computados empregando os 50 ns últimos das traxectorias de simulación para todos os DPPC de cada cela. A temperatura seleccionada para o cálculo foi a de 20 °C, debido a que as medidas DLS foron tomadas a temperaturas próximas a esta.

Empregando as traxectorias de simulación da dinámica molecular, tamén é posible monitorizar os posibles efectos inducidos na parte polar dos DPPC pola presenza dos gemini. A parte polar dos DPPC está formada por un dipolo eléctrico no que o extremo máis externo está formado por un N^+. Esta configuración determina que, aínda que a densidade superficial de carga dunha bicapa lipídica de DPPC sexa case nula -por estar neutralizadas as cargas-, unha colocación preferencial do N^+ cara fóra e unha colocación do O^- cara dentro vai a acontecer. Esta orientación do dipolo P-N -o formado polas cargas N^+ e O^-- vai a determinar certas propiedades electrostáticas da bicapa lipídica, que estarán relacionadas coa estabilidade coloidal dunha dispersión de liposomas. Isto será tratado de seguido mediante resultados de dispersión elástica dinámica de luz. Aquí, mostraremos os

cambios observados na orientación do dipolo P-N inducidos pola presenza dos gemini. A figura 6.19 mostra o valor medio do ángulo descrito polo vector P-N contra a normal á superficie, como pode verse, a presenza do gemini implica orientacións máis verticais do P-N, expoñendo máis o átomo N^+ cara ao exterior. Este resultado está a indicar que o comportamento catiónico das bicapas lipídicas de DPPC dopadas con gemini non se debe unicamente á presenza dos átomos N^+ dos gemini, senón a unha reordenación dos dipolos eléctricos das partes polares dos DPPC.

6.2.3 Estabilidade coloidal dos liposomas DPPC/gemini

Empregaremos medidas de dispersión elástica dinámica de luz (DLS) para determinar a estabilidade coloidal de dispersións de liposomas DPPC/gemini, para isto centraremos a atención no tamaño hidrodinámico, no índice de polidispersividade (PDI) e no potencial ζ. Así como os datos de DSC e os resultados de MD confirman a habilidade dos gemini para introducirse na bicapa lipídica, e as variacións resultantes das diferentes longuras do espazador, os datos de DLS van aportar información sobre cambios no tamaño hidrodinámico (que poderían reflexar cambios na lamelaridade pola presenza dos gemini) e cambios no potencial ζ.

Tendo en conta que o método de síntese dos liposomas xa foi descrito, en termos xerais, na parte de metodoloxía, comentarase en cada sistema os pasos que foron empregados. Os liposomas formados unicamente por DPPC foron preparados mediante unha rotoevaporación de fase orgánica e redispersión con sonicación en fase acuosa. Deste xeito, as medidas de DLS mostran radios hidrodinámicos de 400(40) nm e altos PDI de 0.5. Estes valores indican a presenza de vesículas oligolamelares. O potencial ζ determinado para estes liposomas foi de +3(1) mV, valor en acordo co carácter *zwitteriónico* do DPPC. Despois de proceder cos ciclos do proceso de extrusión, empregando membranas de policarbonato de 100 nm de tamaño de poro, tanto o radio hidrodinámico como o PDI diminuíron radicalmente: 51(2) nm e 0.125, respectivamente. Mentres que o potencial ζ non manifestou cambios substanciais. Estes valores reflexan unha dispersión de vesículas

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de DPPC relativamente monodispersas e unilamelares.

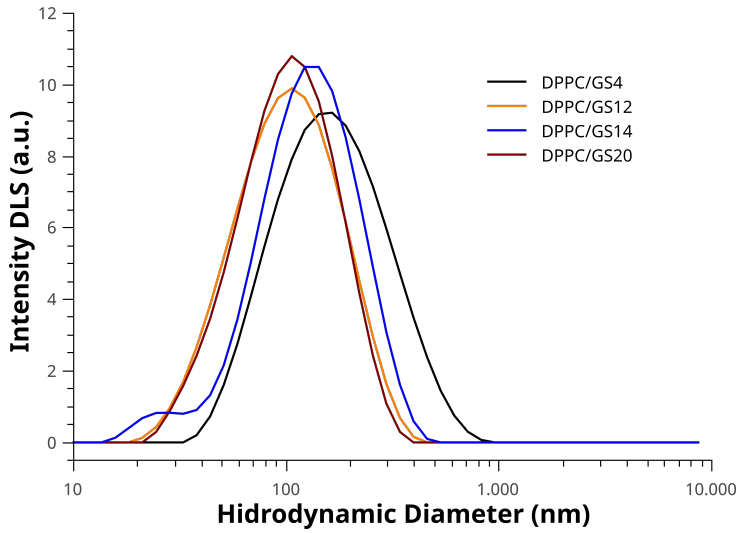

Figura 6.20: Perfís da intensidade colectada por DLS en función dos tamaños hidrodinámicos para os sistemas DPPC/gemini. Nótese que, con carácter importante, estes resultados están tomados en mostras a 100/1 e antes de calquera proceso de extrusión.

A síntese dos liposomas de DPPC dopados con gemini foron realizadas segundo a metodoloxía descrita. Neste caso, a figura 6.20 mostra o perfil das intensidades para o diámetro hidrodinámico dos sistemas DPPC/gemini para ratios 100/1 con todas a longuras de espazador, antes de incluír calquera proceso de extrusión. Pode apreciarse unha diferenza substancial respecto aos liposomas de DPPC sen extruír, os valores de radio hidrodinámico medio para todos os sistemas DPPC/gemini mostran un valor de 64(13) nm e o PDI de 0.23. Así concluímos que a presenza dos gemini en réximes diluídos de 100/1 -DPPC/gemini-, inclusive 1000/1, inducen unha diminución considerable no tamaño das vesículas e na súa polidispersividade. Esta diminución de tamaño e PDI pode asociarse a unha diminución da multilamelaridade que mostraron os liposomas de DPPC sen extruír.

Procédese ao proceso de extrusión dos liposomas DPPC/gemini, empregando de novo membranas de policarbonato de 100 nm de tamaño de poro. A figura 6.21 mostra os perfís das intensidades de DLS, no que non se aprecian diferencias importantes respecto das intensidades mostradas na figura 6.20, cuxos valores promedios para o radio hidrodinámico e PDI son 47(1) nm e 0.12, respectivamente.

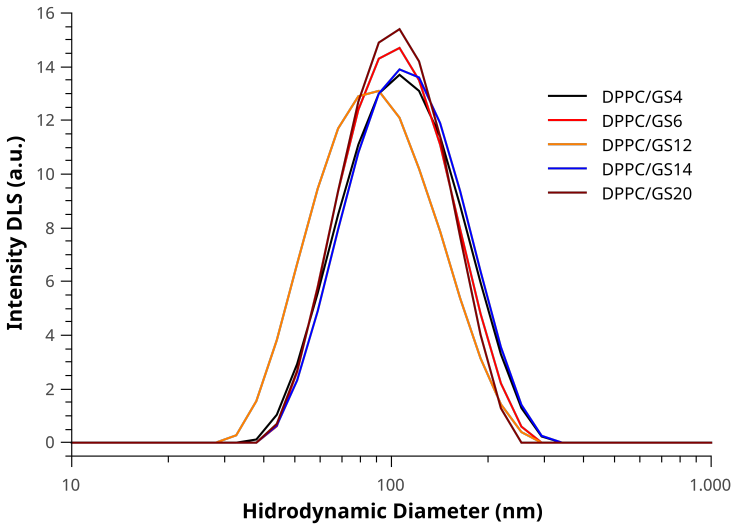

Figura 6.21: Perfís da intensidade colectada por DLS en función dos tamaños hidrodinámicos para os sistemas DPPC/gemini. Nótese que, con carácter importante, estes resultados están tomados en mostras a 100/1 e despois do proceso de extrusión. Suxírese unha comparación visual coa figura 6.20.

Os valores do potencial ζ para os sistemas DPPC/gemini mostraron unha característica moi relevante, un incremento considerable no seu valor respecto do potencial ζ rexistrado para os liposomas de DPPC. Inclusive a réximes moi diluídos de gemini, 1000/1 DPPC/gemini, o valor medido para o potencial ζ foi de $+37(4)$ mV, un valor medio para os sistemas con todos os espazadores. Este incremento substancial garante unha boa estabilidade coloidal dende o punto de vista electrostático, e tamén concorda coa partición do gemini na bicapa lipídica mostrada por DSC e MD. O feito de obter un valor tan alto do potencial zeta con tan pouca cantidade de gemini tamén concorda coas variacións inducidas no ángulo P-N dos lípidos que foron rexistradas por MD, e nas que se previa un efecto colectivo no que os N^+ quedaban máis expostos á rexión acuosa pola presenza dos gemini.

A figura 6.22 mostra valores do potencial ζ para a concentración 100/1 de formulacións DPPC/gemini, representándoos en función da longura do espazador. Queda manifestamente clara a gran diferencia entre os valores do potencial ζ para calquera formulación DPPC/gemini e os liposomas de DPPC. Tamén se aprecia un lixeiro aumento xeral entre

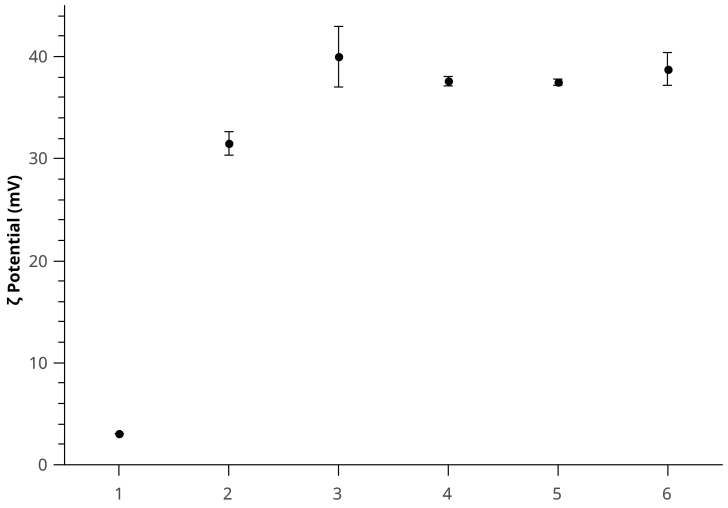

Figura 6.22: Valores para o potencial ζ dos sistemas DPPC/gemini para concentracións 100/1. No eixo X: 1-DPPC, 2-DPPC/GS4, 3-DPPC/GS6, 4-DPPC/GS12, 5-DPPC/GS14 e 6-DPPC/GS20

os valores do potencial ζ entre os sistemas con gemini de espazador 4 e o 20. Isto concordaría coa variación progresiva do ángulo P-N observado en simulación por dinámica molecular (véxase a figura 6.19). É relevante mencionar que a variación na forma de colocación dos gemini no interior da bicapa lipídica non ten efectos substanciais no potencial ζ, a pesar de que localmente aparecían diferencias significativas no potencial transmembrana. Isto explícase centrando a idea de que o potencial ζ é unha característica promedio do liposoma en xeral. Si ben é certo que a colocación dos gemini de espazador 4 e 6 sitúan as súas dúas cargas contra a mesma folla da bicapa, en promedio a metade dos gemini de longura 4 e 6 estarán situados cara o exterior do liposomas e a outra metade cara o interior. No caso da colocación simétrica dos gemini de espazador 12 a 20, cada gemini dará unha das súas cargas a cada folla da bicapa, en xeral, a metade da carga dispoñible estará cara fóra do liposoma e a outra metade cara dentro. Esta imaxe de reparto de carga permítenos argumentar a ausencia de grandes cambios na figura 6.22.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Finalmente, a estabilidade coloidal dunha mostra de liposomas catiónicos de DPPC/gemini de espazador 4 a 100/1 foi estudada ao largo do tempo. A figura 6.23 mostra a ausen-

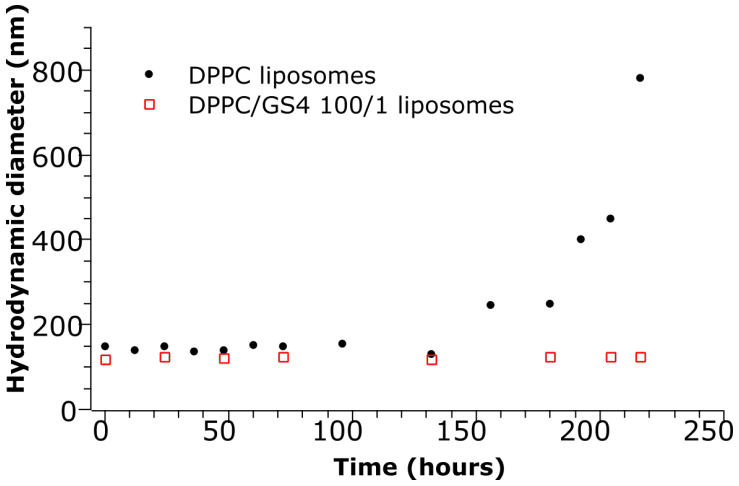

Figura 6.23: Exemplo da estabilidade coloidal dunha dispersión de liposomas DPPC/gemini de espazador 4, á concentración relativa 100/1 durante 225h. A comparativa realízase fronte a datos de estabilidade de liposomas de DPPC.

cia de variacións no tamaño hidrodinámico co tempo, comparando coa agregación que se observa en liposomas de DPPC. A mostra de liposomas DPPC/gemini foi almacenada a 4 °C entre cada medida de DLS. Os liposomas dopados, DPPC/gemini, foron estables mesmo durante meses.

6.3 Bicapas lipídicas e formación de canais porosos

6.3.1 Polietilenimina (PEI). Tráfico intracelular

Hai un profundo debate referente ao destino final da polietilenimina (PEI) dentro das células, logo da transfección de complexos PEI-DNA. Nun primeiro conxunto de resultados referentes a esta sección, preséntanse resultados de microscopía confocal para observar o tráfico intracelular de PEI logo da súa transfección en células humanas, sendo os resultados compatibles tanto coa asunción de que o PEI é o constituínte dos poliplexos que interacciona coas células[198], como que o PEI está xogando un papel crucial mediante actividades endosmolíticas ou formación de poros despois da descomplexación do lipoplexo.

USC DE COMPOSTELA

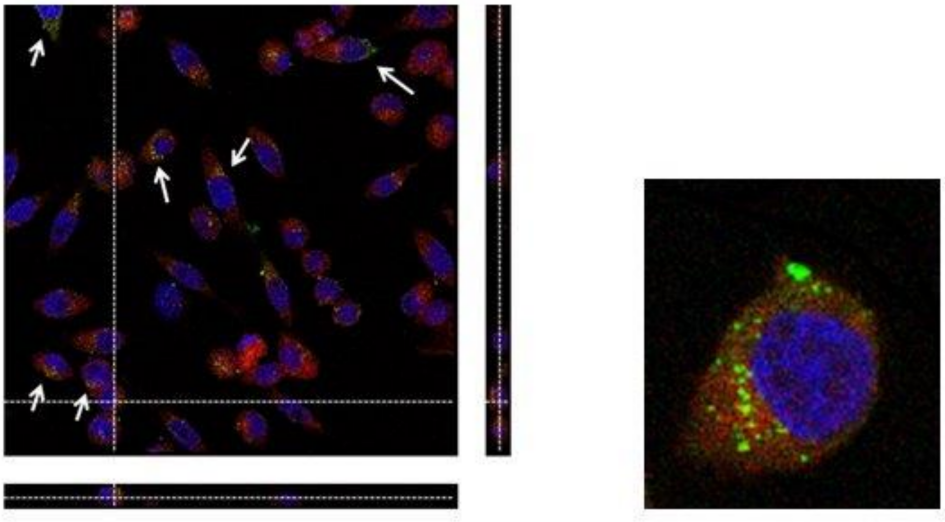

Figura 6.24: Imaxes de microscopía confocal da internalización do PEI en células HeLa despois de 6 horas de incubación. O PEI está resaltado en color verde, o citoplasma en vermello e o núcleo celular en azul. Os eixos de representación vertical e horizontal mostran o relevo en 3D das imaxes. As frechas sinalan as células que presentan unha acumulación notable de PEI na contorna do seu núcleo.

A figura 6.24 mostra imaxes de microscopía confocal despois de 6 horas da transfección de PEI en células HeLa. Esta figura mostra que grandes agregados de PEI tiveron unha distribución preferente ao longo do citoplasma das células, como tamén se observa claramente nos perfiles 3D mostrados nos eixos horizontal e vertical dos bordes da figura. Este feito concorda con resultados previos reportados nos que se observou unha cantidade significativa de proteínas intracelulares interaccionando co PEI[199]. Como se observa nas frechas da figura 6.24, unha progresiva acumulación de PEI na contorna dos núcleos estaría indicando que o PEI non está habilitado para cruzar a membrana nuclear, resultado que concorda con datos reportados nos que se mostra que o PEI non entra no núcleo celular[74, 75]. A acumulación periférica a nivel do núcleo celular, tamén foi reportada mediante centrifugación diferencial e gradientes de densidade[73]. Co fin de analizar, en maior detalle, a interacción do PEI cunha bicapa lipídica, desenrolarase un procedemento de medida baseado no estudo da interacción do PEI con modelos de membrana simplificados, inicialmente con monocapas de DMPC.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.3.2 Monocapas de Lípidos-PEI. Balanza de Langmuir

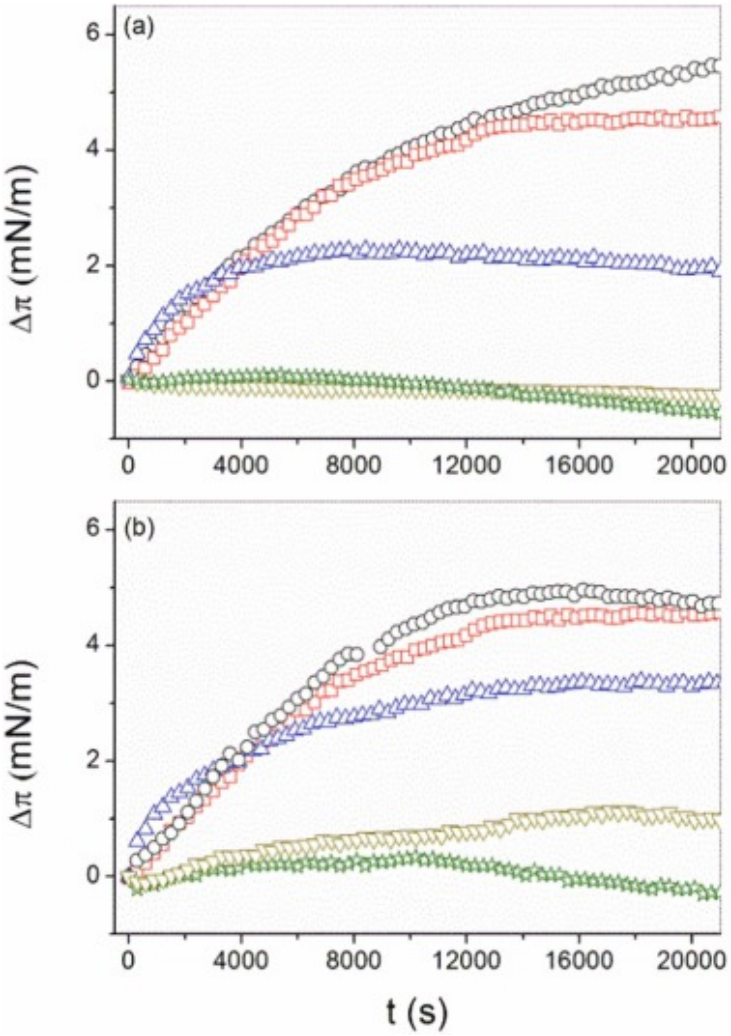

Figura 6.25: Representación dos datos de balanza de Langmuir referente á penetración do PEI en monocapas de DMPC. Móstranse resultados da variación da presión superficial no tempo para concentración de DMPC fixas e concentración variables de PEI. a) PEI/DMPC= 15 (círculo $\circ$ $\pi_0 = 0$ mN·m^{-1}, cadrado $\square$ $\pi_0 = 20$ mN·m^{-1}, triángulo *up* $\triangle$ $\pi_0 = 30$ mN·m^{-1}), triángulo *down* $\triangledown$ $\pi_0 = 35$ mN·m^{-1} e estrela $\star$ $\pi_0 = 40$ mN·m^{-1}). b) para concentración variables a $\pi_0 = 20$ mN·m^{-1} (círculo $\circ$ PEI/DMCP = 15, cadrado $\square$ PEI/DMCP = 1,5, triángulo *up* $\triangle$ PEI/DMCP = 0,15, triángulo *down* $\triangledown$ PEI/DMCP = $1{,}5 \times 10^{-3}$ e estrela $\star$ PEI/DMCP = $1{,}5 \times 10^{-5}$).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Realizáronse experimentos de presión superficial en balanza de Langmuir, para explorar a adsorción do PEI en monocapas lipídicas de DMPC, posicionadas nunha interfase aire-auga. O primeiro conxunto de medidas implicou o estudo da variación da presión

superficial inducida pola adsorción temporal de PEI en monocapas a presión constantes de DMPC. As monocapas de DMPC foron formadas nunha interfase aire-auga mediante o depósito dunha mostra de dispersión de DMPC en cloroformo. As monocapas foron comprimidas ata unha presión determinada. Despois da estabilización da presión, unha solución de PEI é introducida na subfase, e entón foi rexistrada a variación da presión co tempo. Diferentes volumes de solución de PEI foron introducidos na subfase da monocapa de DMPC. Na figura 6.25 observamos a representación de $\Delta\pi = \pi_{PEI} - \pi_0$ en función do tempo. $\Delta\pi$ cuantifica o incremento da presión superficial cando o PEI é engadido á subfase, π_{PEI} é a presión superficial medida logo de introducir o PEI, e π_0 é a presión superficial inicial da monocapa de DMPC. A figura 6.25a mostra os cambios na presión superficial como función do tempo cando un volume determinado de PEI é inxectado na subfase dunha monocapa de DMPC comprimida a diferentes presións superficiais iniciais. A relación molar entre o DMPC e o PEI para todo o sistema, no conxunto de medidas presentados na figura 6.25a, foi de 15. Unha adsorción notable de moléculas de PEI en monocapa de DMPC é rexistrada cando a presión superficial inicial de DMPC é estabilizada a $\pi_0 < 30$ mN·m^{-1}. A estas presións, a monocapa de DMPC atópase nun estado de condensación líquido-expandido, que corresponde cun estado no que existe un acoplamento ou interacción considerable entre as moléculas de DMPC que forman a monocapa. Ao longo do tempo, a presión superficial increméntase, alcanzando valores de equilibrio, aproximadamente, ás 3 horas. A altas presións, $\pi_0 = 35$ mN·m^{-1} e $\pi_0 = 40$ mN·m^{-1}, podemos considerar a $\Delta\pi$ nula, co que a monocapa de DMPC inicialmente comprimida atópase saturada e o DMPC empaquetado, mostrando impermeabilidade á interacción co PEI. Na figura 6.25b observaremos o efecto da variación da presión superficial polo cambio de concentración PEI na subfase. A presión inicial da monocapa de DMPC foi seleccionada a $\pi_0 = 30$ mN·m^{-1}, un valor que está no rango das presións por interacción lateral de bicapas lipídicas de fosfolípidos[200].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Para monocapas de DMPC, cando a relación molar PEI/DMPC está por debaixo de $1{,}5 \times 10^{-3}$, non hai evidencia de interacción entre as moléculas adsorbidas e as sementadas

na monocapa, co cal a variación de presión é nula, indicando que se manteñen os valores de presión iniciais. Pola contra, para altas relacións molares PEI/DMPC, o incremento da presión superficial mostra unha incorporación/interacción das moléculas de PEI na monocapa. Como pode verse na figura 6.25b, na maior relación molar PEI/DMPC, rexistrouse o valor de $\Delta\pi$ máis elevado.

6.3.3 PEI e liposomas como modelo de membrana nuclear

Xa foi mostrada a interacción e acumulación de PEI na membrana nuclear, e determinada tamén a interacción do PEI en monocapas á presión superficial inicial con valores compatibles coa bicapa lipídica. Así, o seguinte paso é estudar a interacción do PEI cun modelo máis compatible coa membrana nuclear: a bicapa lipídica. Para explicar o rol do PEI, mostraranse resultados de liberación de carboxifluoresceína, encapsulada en liposomas de DMPC, inducida pola presencia de PEI. O protocolo para realizar estes experimentos de retención/liberación con liposomas de DMPC, encapsulando carboxifluoresceína en presencia e ausencia de NaCl, foi realizado seguindo a metodoloxía previamente reportada na bibliografía[167], e mostrada na sección 3.1 *Dialysis and Cell assays - Dialysis and Release experiments*.

A figura 6.26a mostra os cambios na intensidade de fluorescencia en función do tempo. A carboxifluoresceína, encapsulada na rexión acuosa dos liposomas, mostra ausencia de emisión por fluorescencia debido a cambios nos estados de enerxía nos orbitais moleculares, motivados pola alta concentración a nivel local, no interior dos liposomas, das moléculas de carboxifluoresceína. Se dalgún xeito, estas moléculas son trasladadas ao exterior do liposoma, a un volume maior de solvente, a emisión por fluorescencia *actívase*, e pode ser rexistrada a través das medidas de fluorescencia cun fluorímetro. Entón, os liposomas previamente *cargados* con carboxifluoresceína foron diluídos en HEPES (pH 7.4) e unha concentración de 150 mM de NaCl, monitorizando a súa fluorescencia durante 10 minutos, e asegurar así que a liberación non é inducida por presións osmóticas ao largo da bicapa lipídica. Diferentes cantidades de PEI foron tituladas na mostra dos liposomas

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

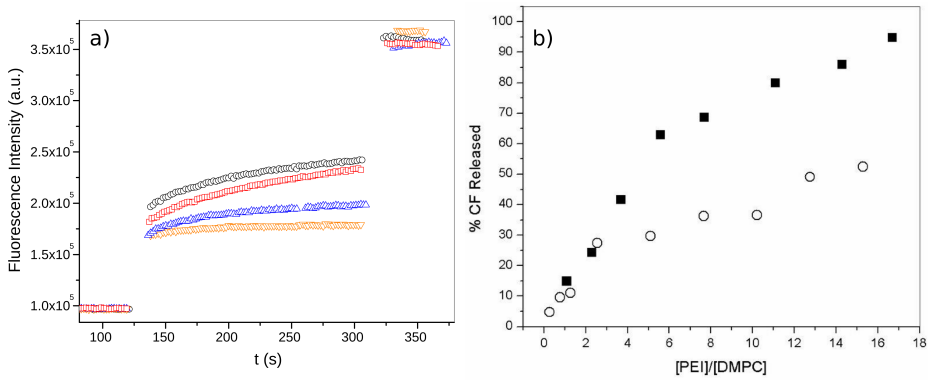

Figura 6.26: a) Intensidade de fluorescencia rexistrada nunha dispersión de liposomas de DMPC encapsulando 50 mM de carboxifluoresceína, en presencia de 150 mM de NaCl e 10 mM de HEPES, para diferentes concentración de PEI: ▽ 0.27 mM, △ 0.54 mM, □ 0.67 mM e ○ 0.81 mM. b) Porcentaxe de carboxifluoresceína liberada dende liposomas de DMPC en función da relación molar PEI/DMPC para experimentos en ausencia de sal (□) e en presencia de 150 NaCl (○).

cargados, e a fluorescencia foi medida durante 5 minutos. Finalmente, unha titulación de Triton X-100 foi engadida para desfacer as bicapas lipídica e liberar toda a carboxifluoresceína que se atopaba nese momento dentro dos liposomas. Como pode apreciarse na figura 6.26a, a medida que aumentaba a concentración da titulación inicial de PEI, unha maior cantidade de carboxifluoresceína era liberada. Débese sinalar aquí que logo da solubilización con Triton X-100, alcanzouse en todos os casos un valor similar para a fluorescencia, e que as medidas foron feitas a unha mesma temperatura de 25 °C. Os resultados mostran a posibilidade de que o PEI xere porosidades na bicapa lipídica que permitan a liberación do interior dos liposomas. A porcentaxe de carboxifluoresceína liberada, como unha función da concentración do PEI, foi calculada empregando a calibración da intensidade de fluorescencia e as concentracións iniciais. Os resultados da liberación que se mostran na figura 6.26b foron feitas con presencia e ausencia de sal, e pode comprobarse como, para unha relación molar PEI/DMPC de 17, a carboxifluoresceína é liberada completamente do interior dos liposomas en ausencia de sal. Resultado que podería ser explicado debido a que en presencia de sal, a migración dos ións, por presións osmóticas, cara ao interior dos liposomas, restrinxiría a saída das moléculas de carboxifluoresceína.

Unha vez que a formación de canais na bicapa lipídica parecen ser inducidos pola

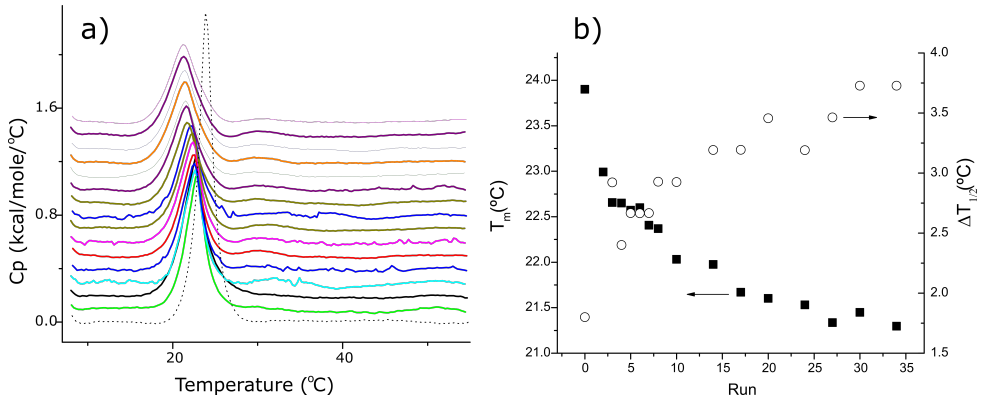

Figura 6.27: Medidas de microcalorimetría diferencial de varrido (DSC) para liposomas de DMPC: a) mostra os entalpogramas para 15 consecutivos DSC de 1 mM de liposomas de DMPC en presencia de 5 mM de PEI e 10 mM de HEPES. Algúns dos entalpogramas foron omitidos para mostrar unha mellor claridade da progresión do desprazamento do sinal (dereita a esquerda). b) Móstrase a temperatura de transición □ fronte o número do DSC, mentres que tamén se representa a variación da anchura da transición ∘ co número de DSC.

presencia do polímero PEI, vaise analizar este feito dende a perspectiva da microcalorimetría. Os resultados de microcalorimetría serán importantes para comprender mellor o efecto do PEI das bicapas lipídicas. Os liposomas puros de DMPC presentan, como os de DPPC, unha transición entre as súas fases conformacionais: *xel* a *cristal-líquido*. A temperatura asociada a estes lípidos é menor que a asociada ao DPPC, por ter unhas cadeas hidrocarbonadas máis cortas; así a $T_{DMPC} = 23{,}5$ °C e $\Delta H = 24{,}7$ kJ·mol^{-1}. O valor da entalpía tamén é menor, posto que a longura das cadeas hidrocarbonadas é menor que o DPPC, a poboación *gauche* necesaria para estar en fase *cristal-líquido* tamén será menor, así a enerxía necesaria será menor. A liña a puntos presentada na figura 6.27a mostra a transición para liposomas de DMPC. As demais liñas, mostran 15 medidas consecutivas de DSC, dunha solución de liposomas de DMPC con PEI nunha relación molar PEI/DMPC de 5, en HEPES con pH=7.4. A principal diferencia destas medidas respecto de resultados reportados na bibliografía[76, 201], é que o PEI foi engadido logo de estar os liposomas formados. Este procedemento permítenos probar a existencia dunha afinidade do PEI pola bicapa lipídica, na que causa un cambio a nivel conformacional, mostrando así unha habilidade do PEI por afectar ao interior da bicapa lipídica.

A figura 6.27b tamén mostra a desviación dos sinais de transición a temperaturas

máis baixas e un ancheamento do sinal da transición. Este fenómeno pode ser explicado seguindo a metodoloxía do modelo de Ising aplicado á interacción das bicapas lipídicas cos surfactante gemini. Deste xeito, o PEI estaría a provocar un debilitamento no acoplamento dos DMPC na bicapa lipídica, e un maior acoplamento coas moléculas de auga, o que podería ser explicado si se forman canais de auga que traspasen a bicapa lipídica.

6.3.4 Formación de poros con PEI na bicapa lipídica. Dinámica molecular

De momento, por diferentes métodos e técnicas experimentais, observouse a posibilidade de formación de poros nas membranas dos liposomas de DMPC inducidos pola presencia de PEI. Esta formación de poros vai ser examinada tamén empregando ferramenta da simulación de dinámica molecular (MD). A interacción entre o PEI e bicapas lipídicas mediante MD xa foi investigada en traballos reportados na bibliografía[77, 202]. Tamén foi reportada a habilidade de complexos PEI/siRNA para cruzar a bicapa lipídica, así como a interacción con fosfatidilcolinas (PC) ou fosfatidilserinas (PS)[203]. Non obstante, a dinámica da formación do poro, a súa estabilidade e a hidratación do PEI na etapa de post-formación do poro son cuestións aínda sometidas a debate. Computáronse simulacións de dinámica molecular a dúas temperaturas diferentes de 15 °C e 25 °C, para cubrir tanto a fase *xel* como a *cristal-líquido*. Para isto, a cela de simulación formouse con 314 lípidos de DMPC e 9 moléculas do PEI empregado nos experimentos anteriores.

A figura 6.28 mostra un *snapshots* da configuración final das simulacións. A presencia do PEI xera unha reorganización dos lípidos de xeito que se forman canles de auga ou poros na bicapa lipídica. Para poñer de manifesto a existencia das fases conformacionais -*xel* ou *cristal-líquido*- computaremos a RDF das cadeas hidrocarbonadas dos lípidos. É preciso sinalar que unicamente se tiveron en conta os lípidos que non estaban involucrados na formación do poro, pois estes non presentan unha conformación lamelar. A figura 6.29 mostra as RDF calculadas empregando os 10 ns últimos de cada simulación. A 15 °C móstrase o acoplamento aos 6 primeiros veciños en orde radial, mentres que a 30 °C este

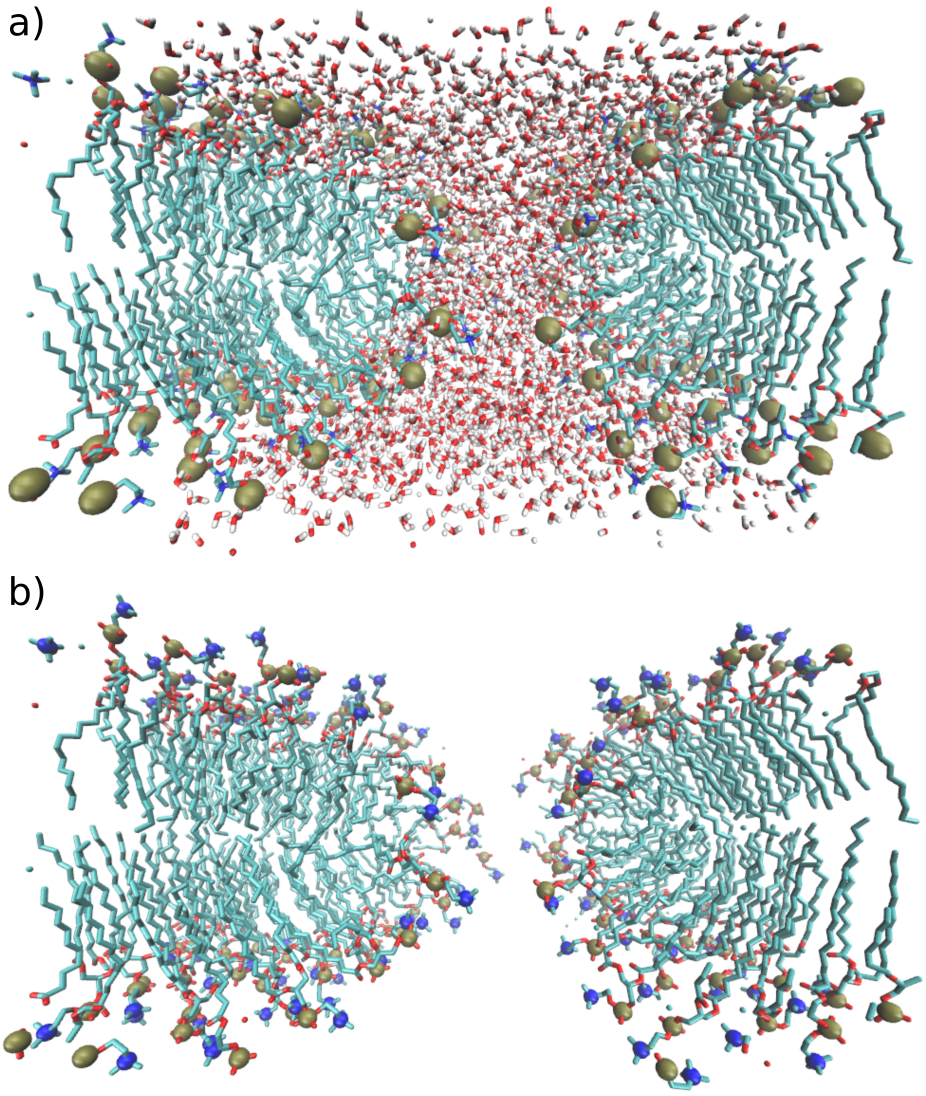

Figura 6.28: Representación despois de 70 ns de simulación da dinámica molecular dunha bicapa lipídica solvatada (a) e cos lípidos illados (b).

acoplamento diminúe aos 4 primeiros. Analogamente ao DPPC, a presencia dos picos a 15 °C manifesta unha fase *xel* ou *esméctica*, mentres que a 30 °C obsérvase unha fase *cristal-líquido* ou *nemática*.

A figura 6.30 móstranos a dinámica da formación do poro. Empregando a variación da formación de pontes de hidróxeno (ver figura 6.30a) entre os PEI e as moléculas de auga, imos apreciando a dinámica da formación do poro mediante o aumento da hidratación

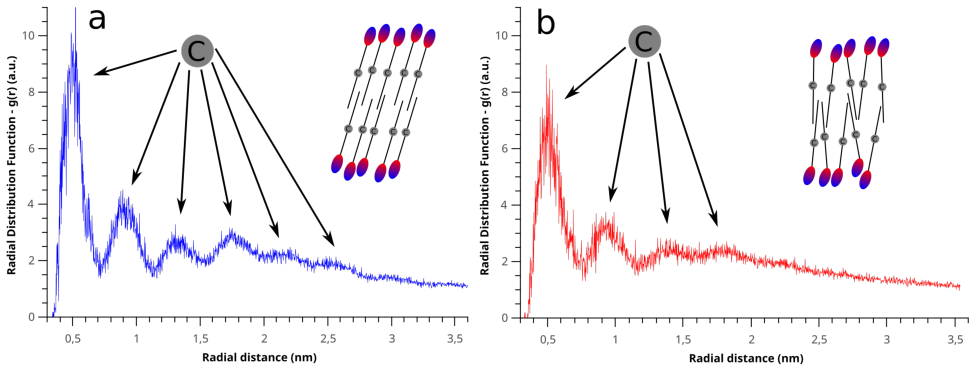

Figura 6.29: Funcións de distribución radial (RDF) entre as cadeas hidrocarbonadas do lípidos, tendo en consideración para o cómputo aqueles que formaban parte da fase lamelar. a) mostra a correlación radial a 15 °C e b) a 30 °C.

do PEI. O número de pontes hidróxeno aumenta ata que unha saturación é alcanzada. Este feito débese a que existe un máximo no número de pontes de hidróxeno que un PEI pode ter coas moléculas da auga. A figura 6.30b mostra as enerxías de interacción entre PEI-DMPC e PEI-moléculas de auga. Como pode apreciarse, existe un comportamento análogo ao que se mostra na variación dos pontes de hidróxeno PEI-moléculas de auga. Débese notar que no equilibrio, os valores da interacción PEI-DMPC e PEI-moléculas de auga son lixeiramente diferentes, o suficiente para mostrar que existe unha maior afinidade polo PEI e as moléculas de auga que polo PEI e o DMPC. Este balance favorece a entrada das moléculas de auga para solvatar o PEI, e polo tanto as partes polares dos DMPC, dirixindo así a nova acomodación dos lípidos para dar forma ao poro na bicapa lipídica. Tamén, o valor da interacción PEI-DMPC no equilibrio é negativo, indicando que unha interacción atractiva entre o PEI e DMPC existe despois da formación do poro, o que estaría en consonancia coas acumulacións perinucleares de PEI mostrados mediante as imaxes de confocal (ver figura 6.24).

A figura 6.31 mostra os perfís de densidade calculados empregando os últimos 20 ns de cada simulación. A densidade dos átomos P dos lípidos e das moléculas de auga, ao longo do eixo transversal á bicapa lipídica, revelan o poro formado e canal de auga establecido. Do mesmo xeito, os perfís de densidade do ións de cloro e o PEI mostran a

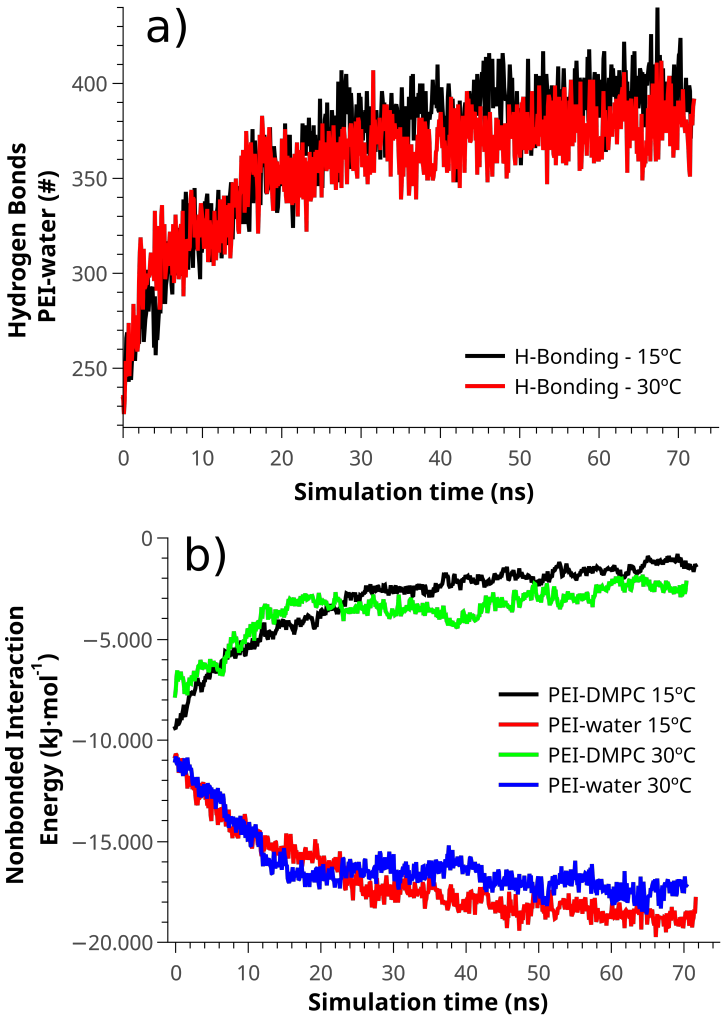

Figura 6.30: a) mostra o número de enlaces por ponte de hidróxeno entre o PEI e as moléculas de auga durante o tempo de simulación. b) mostras as enerxías de interacción entre o PEI e o DMPC, así como a interacción entre o PEI e as moléculas de auga, tanto a 15 °C (negro e vermello) como a 30 °C (verde e azul).

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

estabilidade dos poros xerados. A presencia de densidade de ións de cloro ao longo do eixo transmembrana concorda cos resultados de fluorescencia no que se mostraba a difusión inducida pola poración do PEI.

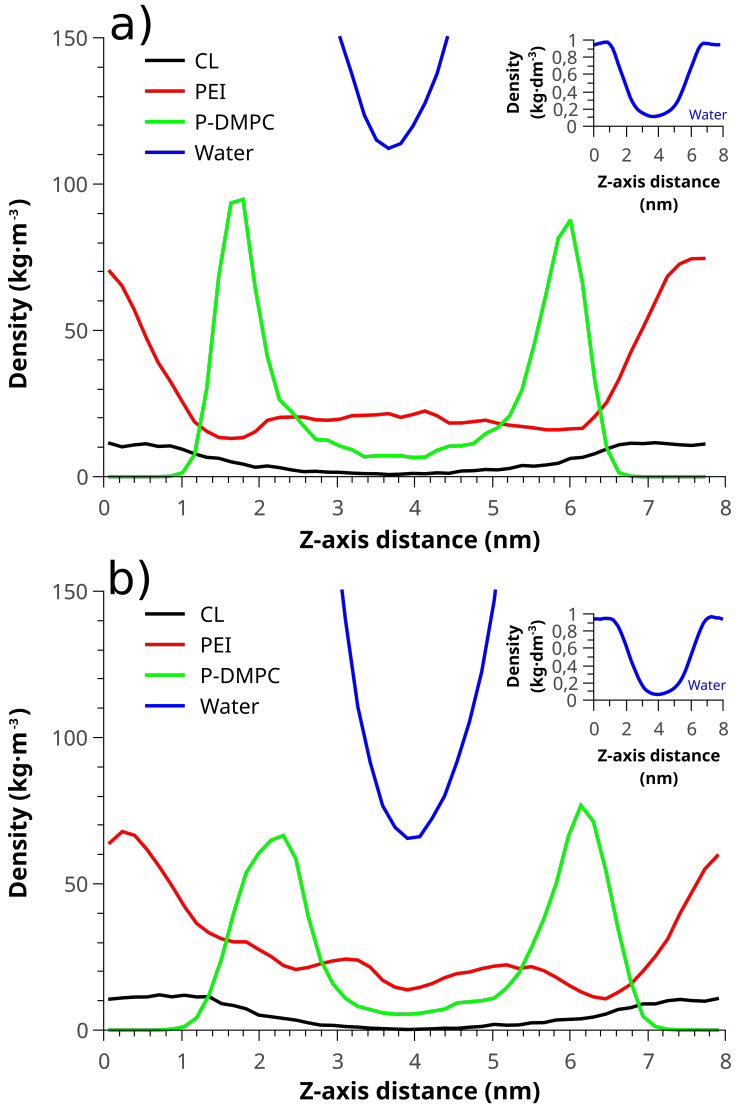

Figura 6.31: Perfís de densidade na dirección transversal á bicapa lipídica para os ións de cloro (Cl) e fósforo (P), tamén PEI e moléculas de auga a 15 °C (a) e 30 °C (b). Os subplots mostran a densidade total da auga para confirmar os valores de equilibrio nas contornas da celda.

6.4 Conclusións

Mostrouse a habilidade dos surfactantes gemini para posicionarse no interior das bicapas lipídicas de DPPC. Empregáronse medidas de DSC para mostrar que as temperaturas da transición *xel* a *cristal-líquido* decrecen a medida que incrementaba a concentración

de surfactante gemini. Tamén se encontrou unha correlación significativa coa variación da lonxitude do espazador.

A transición de fase observada na bicapa lipídica, e a súa interacción cos surfactantes gemini, interpretouse en termos dos parámetros dun modelo de Ising. Os resultados acompañáronse de simulación de dinámica molecular. O ensanchamento dos sinais entálpicos do calorímetro, que reflexaban as transicións, identificáronse como distribucións inhomoxéneas da probabilidade de transición en términos do factor de acoplamento nun modelo de Ising, no que foron os surfactantes gemini os que xogaron ese rol mediante a súa incorporación en bicapas lipídicas de DPPC.

As medidas de DLS mostraron que se pode inducir unha diminución da polidispersibidade e do tamaño mediante a incorporación dunha mínima cantidade de surfactante gemini na formulación dos liposomas. Os datos de DLS mostraron que o carácter catiónico dos liposomas, mediante a medida do potencial ζ. Este carácter catiónico dos liposomas conséguese dende concentracións moi baixas de surfactante.

Os resultados de simulación da dinámica molecular tamén concordaron con estes resultados. A localización e posición dos surfactantes gemini dentro da bicapa lipídica presentáronse moi distintas con respecto á lonxitude do espazador, tendo unha colocación nunha única capa cando o espazador é corto, e adquirindo unha colocación ambivalente (entre as dúas capas da membrana) cando o espazador é largo.

Tamén se empregaron experimentos que caracterizaron a resposta fisicoquímica de monocapas fosfolipídicas e de bicapas lipídicas empregadas como modelos de membrana biolóxica. Presentáronse resultados de tensión superficial, mediante balanza de Langmuir, que permitiron estudar a penetración da polietilenimina (PEI) en monocapas de DMPC. O PEI mostrou habilidade para insertarse en monocapas de DMPC comprimidas a presións superficiais $\leq$30 mN/m. Os experimentos de liberación levados a cabo mediante a técnica de fluorescencia combinada con calorimetría diferencial de varrido (DSC) e simulación de dinámica molecular mostraron que o PEI pode estabilizar poros e crear canais, dun xeito espontáneo, en bicapas lipídicas de DMPC. A formación os poros vese fortalecida pola

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

interacción electrostática entre o PEI e as cargas negativas das membranas lipídicas.

Os datos de calorimetría e os experimentos de tensión superficial mostran que as interaccións entrópicas de carácter hidrofóbico xogan un papel relevante na interacción entre o PEI e as bicapas lipídicas.

As imaxes de microscopía confocal mostraron a internalización do PEI e a súa presenza no citoplasma, con capacidade para alcanzar a membrana nuclear pero sen introducirse no núcleo.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

7 Aplicacións de liposomas catiónicos

A aplicabilidade dos liposomas catiónicos esténdese dende as innovacións na tecnoloxía farmacéutica ata o desenrolo de sistemas diagnósticos, ou o seu uso como modelos de membrana celular. Neste capítulo levarase adante a presentación de dous sistemas nanobiotecnolóxicos onde os liposomas catiónicos ocuparán un rol principal. A primeira parte vai mostrar a habilidade dos liposomas catiónicos como modelos de vesículas extracelulares. Como punto de partida vanse construír plataformas miméticas de base polimérica como matriz extracelular mediante a técnica *Layer-by-Layer*. Sobre esas plataformas estudiarase a adsorción de liposomas a través da microbalanza de cristal de cuarzo (QCM-D). Tamén se determinará a eficiencia de encapsulación de fármacos de baixa solubilidade acuosa en liposomas que estarán adsorbidos na plataforma. Do mesmo xeito a interacción destes substratos complexados con células tumorais MDA-MB-231 será estudada con experimentos de microscopía confocal. Os resultados obtidos permitirannos configurar diferentes hipóteses no rol das vesículas extracelulares en interacción con células e a matriz extracelular. Nunha segunda parte, os liposomas catiónicos serán cargados con Dexametasona (DEX) e incorporados á superficie porosa de hidroxeis de ácido hialurónico. A eficiencia de liberación, e retención, dos liposomas catiónicos foi mostrada con experimentos de diálise; tanto en dispersión libre como adsorbidos nos hidroxeis. Por último, diferentes ensaios con células mesenquimais permitiron analizar a viabilidade celular dos liposomas catiónicos empregados, e a súa capacidade na promoción da diferenciación das MSC en osteoblastos, inducida pola DEX.

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

7.1 Contextualización

Nas seccións anteriores presentáronse resultados que determinan a *folla de ruta* para obter un sistema liposómico catiónico. Tal sistema está baseado na introdución na formulación liposómica dun determinado tipo de surfactantes gemini, formados a partires de ións de amonio cuaternario. Nun primeiro momento, a actividade superficial e a micelización destes surfactantes foi explorada, para despois analizar as características que inducían sobre unha bicapa lipídica de DPPC. Fundamentalmente as conclusións máis inmediatas foron que o surfactante gemini provoca unha diminución do tamaño e da polidispersividade, incluso a relacións molares menores do 1 % de surfactante gemini a DPPC. Dun xeito relevante, para estas baixas concentracións de dopado, tamén se mostrou unha estabilidade coloidal dos liposomas moi importante, propiciada polo potencial ζ positivo, fronte aos liposomas de DPPC. Por outra banda, tamén se obtiveron resultados nos que os liposomas foron asumidos como modelos de membrana nuclear; e neste caso, a presenza dun polímero baseado en aminas (PEI) mostrou a habilidade de formar canais estables na bicapa lipídica. Esta capacidade, xunto con outros resultados, serviron para facer hipótese coas que entender mellor os mecanismos de transfección celular nos que o PEI actúa como adxuvante.

Co fin de expor unha posible utilización práctica de todos os resultados mostrados nas seccións anteriores, vanse presentar dúas aplicacións dos liposomas catiónicos. Na primeira, empregaranse os liposomas catiónicos como modelo de membranas biolóxicas; nesta ocasión, faremos referencia ás vesículas extracelulares. O sistema modelo empregado vai permitir adoptar conclusións que axudan a completar o coñecemento da utilidade biolóxica das vesículas extracelulares, e máis concretamente o seu rol no intercambio de información entre células e a matriz extracelular. A segunda parte vai presentar un sistema de aplicación no que os liposomas catiónicos van ser usados como sistemas de transporte, incorporación e liberación controlada dun fármaco que actúa como factor de diferenciación celular en células mesenquimais (MSC).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

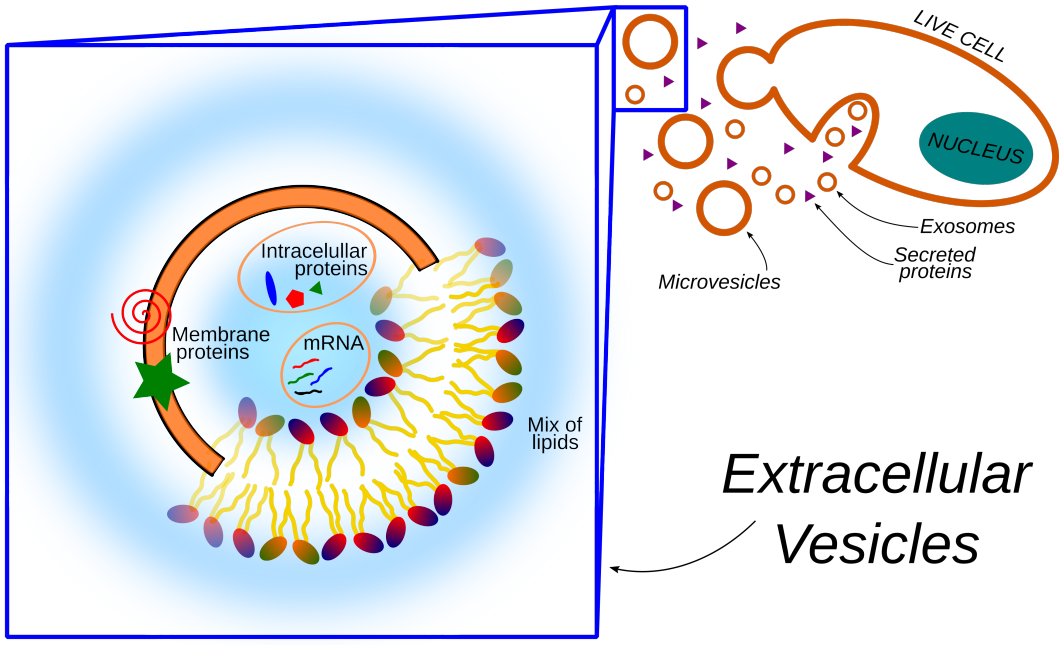

Figura 7.1: Representación da composición e formación xeral das vesículas extracelulares (EVs). Obsérvase a súa formación como separación dunha protuberancia na membrana plamática ou como liberación de contido de sistemas multivesiculares do interior do citosol, pola fusión destes coa membrana celular. Na membrana lipídica das EVs atopamos proteínas específicas das células que as xeraron. No interior das EVs atopamos secuencias de nucleótidos de ARN *micro* e *mensaxeiro*.

Como se comentou, a fase liotrópica lamelar, no autoensamblaxe de lípidos, constitúe un elemento fundamental nos sistemas biolóxicos. Dende a membrana plasmática ata a membrana nuclear, pasando por unha elevada cantidade de sistemas vesiculares que se atopan no interior do citosol. Un sistema biolóxico que representa na actualidade un foco de traballo intensivo, e amplo interese, é o constituído polas vesículas extracelulares (EVs). Diferentes experimentos, baseados en ultracentrifugación de varias mostras celulares, mostraron a existencia de sistemas de carácter lipídico. Considerados como sistemas cuxa función era baleirar o *lixo* das células, co paso dos anos mostrouse que se trataba de vesículas formadas por unha membrana lipídica, que ademais portaban unha cantidade relevante de proteínas celulares e ARN *micro* e *mensaxeiro* (ver figura 7.1). A caracterización destes sistemas extracelulares, referida á súa formación, tamaños e composicións, tórnase moi complexa, e resulta unha tarefa que vai evolucionando favorablemente a medi-

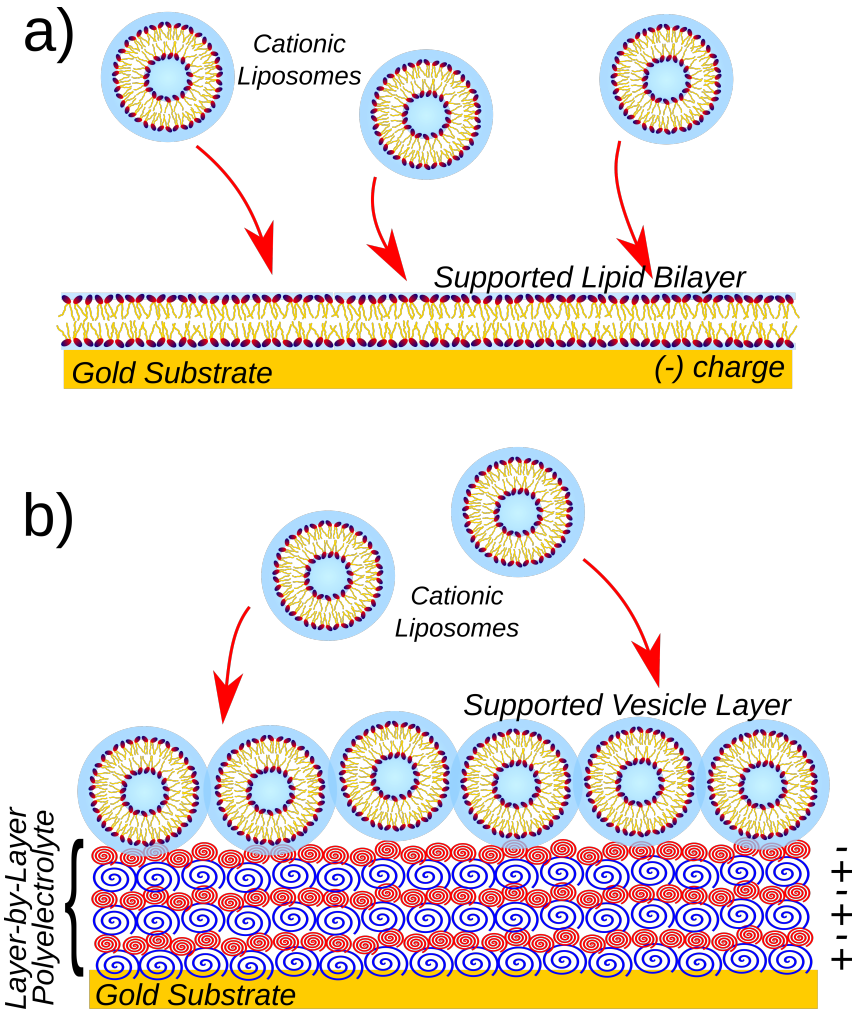

Figura 7.2: Representación das estratexias de adsorción dos liposomas catiónicos. a) A adsorción sobre un substrato de ouro implica unha interacción electrostática tan forte cos liposomas que se xera unha bicapa lipídica soportada no ouro, deste xeito o núcleo acuoso dos liposomas é liberado ao medio. b) A cobertura do substrato de ouro con especies poliméricas mediante o crecemento *Layer-by-Layer* configura un sistema o suficientemente mol para a adsorción intacta dos liposomas catiónicos.

da que se coñece máis sobre estes sistemas. En particular, son admitidos como potenciais instrumentos que marcarán un punto de inflexión na nanobiotecnoloxía, dende a evolución de plataformas diagnósticas ata a optimización de sistemas terapéuticos. Os compoñentes proteicos das vesículas extracelulares representan posibles marcadores de diferentes patoloxías, e os compoñentes do ácido nucleico, atopados no interior, abre a porta ao uso das EVs como axentes terapéuticos, ou vacinas para procurar determinadas respostas de

inmunidade.

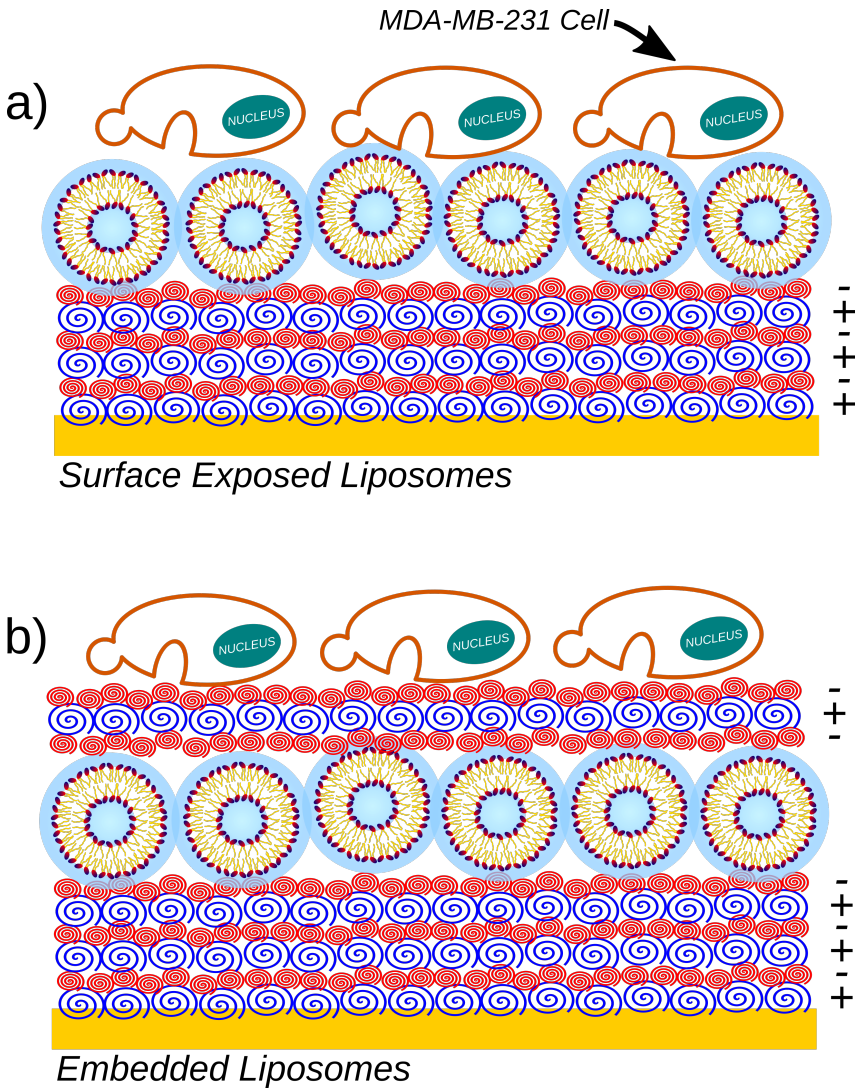

Figura 7.3: Representación dos dous sistemas miméticos da interacción das EVs coa ECM. a) Liposomas catiónicos adsorbidos de xeito intacto sobre unha superficie de polielectrolitos LbL. b) Liposomas catiónicos soterrados nun crecemento polielectrolítico en LbL.

Moitas son as incógnitas, e problemáticas, circundantes ao emerxente campo das EVs. Dende a necesidade de evolucionar sistemas e protocolos de illamento eficiente, ata desentrañar efectivamente os seus mecanismos de acción a nivel orgánico. Neste sentido, presentaremos unha xeira de resultados que procurarán avanzar no coñecemento deses mecanismos de acción. Con este fin, asumiremos un sistema modelo de EVs baseado en

liposomas catiónicos que portarán unha determinada especie molecular, a modo de *carga*. Asumimos que no momento en que as EVs xorden das células, pasan a interaccionar coa rexión extracelular, composta fundamentalmente pola matriz extracelular (ECM). Así deseñaremos unha plataforma modelo da ECM, baseada en crementos *Layer-by-Layer* de especies polielectrolíticas, tales como o ácido hialúronico -un glicosaminoglicano que forma parte esencial da ECM- e a polilisina.

O proceso de inmobilización intacta dos liposomas cargados, o seu recubrimento e as súas capacidades para reter, e liberar, substancias moleculares foron analizados con diferentes técnicas e protocolos instrumentais; así como a súa incorporación ao substrato como bicapa lipíca soportada (ver figura 7.2). Co fin de extraer información sobre as posibles diferentes rutas de internalización de EVs, en función da súa interacción coa ECM, leváronse adiante experiencias de incubación sobre diferentes substratos con células de cancro de mama MDA-MB-231, tal e como se mostra na figura 7.3.

Unha segunda parte da sección de aplicacións vai empregar aos liposomas catiónicos como sistemas de transporte e inmobilización de fármacos. Tal inmobilización vai acontecer sobre substratos poliméricos, pero nesta ocasión serán extensos nas tres dimensión, formando sistemas de materia branda coñecidos como hidroxeis.

Unha cuestión fundamental, a resolver cando se traballa con sistemas de complexación e macroconfiguración molecular, é a referente aos *soportes* que se empregarán para dar *forma* aos deseños finais. Neste sentido, un sistema de andamiaxe (*scaffolds*) que está a ser estudado de maneira intensiva é o centrado no uso dos hidroxeis. Os hidroxeis son estruturas tridimensionais de natureza polimérica, que se caracterizan fundamentalmente pola súa integridade estrutural e propiedades mecánicas, xunto coa gran capacidade de acumular auga. A súa aplicabilidade cubre moitos campos, e a súas aplicacións presentan potenciais solucións a grandes retos da actualidade, dende o deseño de plataformas eficientes para a estruturación de solos e liberación controlada de auga, ata o desenrolo de moi variadas ferramentas terapéuticas ou, sistemas de punto de partida en enxeñaría de tecidos e *bio-impresión 3D*.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Unha das grandes vantaxes, da aplicación dos hidroxeis á biotecnoloxía, é a versatilidade para configuralos partindo de especies *biopoliméricas*. A síntese dos hidroxeis estúdase dende a física de polímeros, e dende a química, e o seu crecemento implica a necesidade de reaccións poliméricas causadas por gradientes de temperatura, concentración de catalizadores ou fotoexcitación, entre outros. Os factores que determinarán a aplicabilidade concreta dun hidroxel van a variar dependendo das súas propiedades mecánicas e estruturais e da súa biocompatibilidade e versatilidade de síntese. Neste sentido, os hidroxeis baseados en ácido hialurónico son uns candidatos relativamente ideais para unha boa cantidade de aplicacións na biotecnoloxía. Un equilibrio entre as propiedades mecánicas que se poden alcanzar, mediante diferentes modificacións químicas do ácido hialurónico, e as características estruturais do hidroxel final, xunto coa natureza biopolimérica do seu constituínte, fai deste tipo de hidroxeis candidatos moi reportados en enxeñería de tecidos para rexeneración ósea.

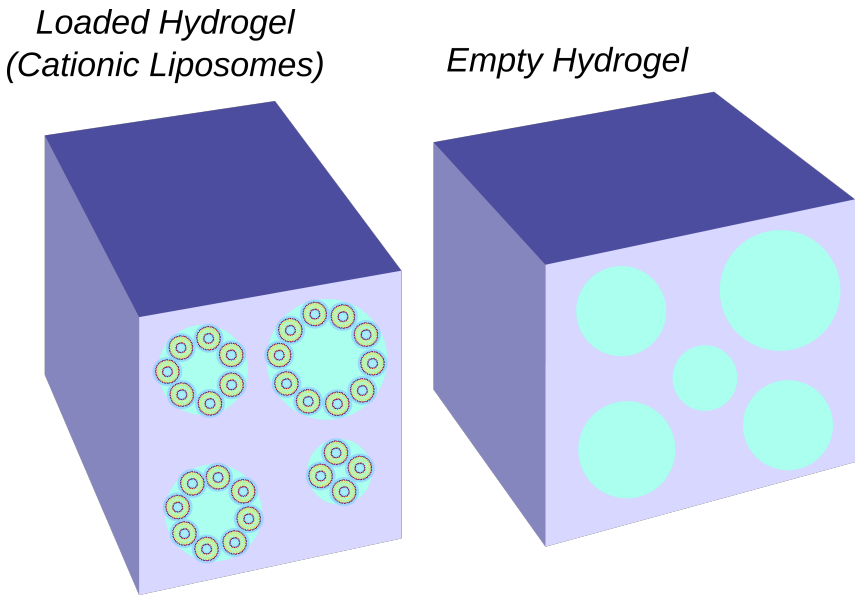

Figura 7.4: Esquema que mostra a estratexia a seguir, baseada na inmobilización dos liposomas catiónicos nas cavidades que ten o hidroxel.

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Conectando cos resultados anteriores, nos que foi revelada a adsorción intacta de liposomas catiónicos sobre substratos polielectrolíticos con ácido hialurónico, tomaremos o resultado como punto de partida para deseñar unha estratexia na que funcionalizaremos as

superficies porosas de hidroxeis de ácido hialurónico cos liposomas catiónicos (ver esquema da figura 7.4). Este procedemento está centrado na idea de que existen diferentes especies moleculares que provocan a diferenciación celular de certas células multipotenciais, tales como as células mesenquimais (MSC). A dexametasona (DEX) é un glucocorticoide que mostrou a capacidade de propiciar a diferenciación das MSC en osteoblastos, condrocitos e adipocitos. A concentración de DEX é un valor determinante para conseguir a diferenciación, e incluso se mostra a predilección na diferenciación nunha determinada liña dependendo das cantidades dispoñibles do fármaco.

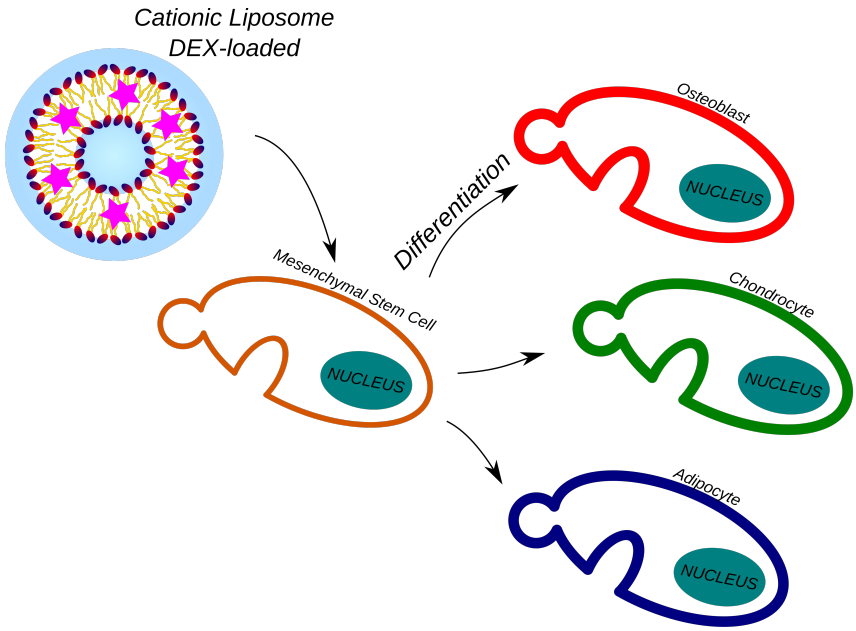

Figura 7.5: Esquema simplificado das experiencias de diferenciación. Os liposomas catiónicos cargados coa DEX serán analizados para cuantificar a súa capacidade para inducir a diferenciación nas MSC dun xeito eficiente.

Diferentes procedementos experimentais permitiron comprobar a adsorción dos liposomas catiónicos nas superficies que describen os poros de hidroxeis de ácido hialurónico. Deste xeito, pasarase a presentar os datos de citotoxicidade dos liposomas catiónicos empregados, así como a realización de ensaios de diferenciación en osteoblastos de MSC (ver figura 7.5). Este resultado final colocará un alfinete nos resultados expostos nesta sección, que servirá como punto de partida para o desenrolo de plataformas máis específicas e

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

optimizadas.

7.2 Liposomas catiónicos en complexos *Layer-by-Layer*

7.2.1 Liposomas catiónicos cargados con Nile Red

Co fin de caracterizar unha plataforma bidimensional, baseada nun substrato polimérico, con capacidade para adsorber liposomas de xeito intacto, presentaremos unha formulación de liposomas catiónicos de DPPC e surfactante gemini de espazador 14. Tamén se inclúe na formulación unha especie molecular con espectro de emisión por fluorescencia en solventes non polares: o Nile Red. A incorporación dos liposomas catiónicos, cargados con Nile Red, é dirixida mediante interacción electrostática, de tal xeito que será preciso que a última capa exposta do substrato teña unha configuración de carga con signo negativo.

A síntese dos liposomas que empregaremos está baseada no procedemento descrito na sección da metodoloxía. No entanto, preséntase aquí un resumo do proceso no que se describe a formulación empregada nos liposomas que se usarán de seguido. DPPC, gemini de espazador 14 e Nile Red (200/4/1, respectivamente) foron disoltos en cloroformo. A continuación, a fase orgánica foi eliminada co rotavapor, para despois hidratar a película homoxénea cunha solución a 150 mM NaCl baixo sonicación. A dispersión de liposomas foi extruída a través dunha membrana de policarbonato de 100 nm de poro. Tanto a fase de rotoevaporación como a de extrusión leváronse a cabo a temperaturas por enriba da Tm (temperatura de transición) dos liposomas de DPPC (60°C)

Determinouse o potencial ζ dos liposomas catiónicos, primeiro sen a presenza de Nile Red, resultando un valor de +34(3) mV. A presenza do Nile Red modifica lixeiramente este valor, medíndose un potencial ζ de +38(4) mV. A selección do Nile Red, como modelo de carga liposómica, debeuse a varios factores: a súa baixa solubilidade en auga, o seu peso molecular sub-kDa e o seu particular comportamento de emisión por fluorescencia. En auga o espectro de emisión do Nile Red desaparece, ademais presenta un comportamento batocrómico a medida que aumenta a polaridade relativa do solvente, dende unha

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

lonxitude de onda de emisión no laranxa para solventes de polaridade moi baixa, ata lonxitudes de onda de emisión no vermello para solventes con polaridade alta; excepto para a auga, no que, como se comentou, está extinguida a emisión. É preciso recordar aquí que o interior dunha bicapa lipídica pode ser considerado un solvente apolar, posto que hai ausencia de moléculas de auga e está constituído de cadeas hidrocarbonadas. De tal xeito, o efecto de cargar os liposomas catiónicos con Nile Red vai constituír unha plataforma primitiva, pero versátil, para simular vesículas extracelulares portando substancias e interaccionando con substratos.

As lixeiras variacións inducidas nas características electrostáticas, dos liposomas catiónicos, pola presencia do Nile Red, mostran que tal incorporación non afectará á boa estabilidade coloidal dos liposomas catiónicos empregados. Do mesmo xeito, o tamaño dos liposomas non mudou de xeito considerable pola presencia do Nile Red. Na figura 7.6a móstrase a variación da intensidade de DLS fronte ó tamaño hidrodinámico, tanto para liposomas catiónicos con carga de Nile Red, ou sen ela. En ámbolos casos, móstrase unha poboación relativamente monodispersa de liposomas: un diámetro hidrodinámico (D_H) de 91.3 nm e un PDI de 0.161 para liposomas catiónicos con Nile Red, e D_H =111.3 nm e PDI de 0.167 para liposomas catiónicos sen Nile Red.

Os datos referidos a características estruturais dos liposomas, medidos con DLS, mostran lixeiras variacións entre os liposomas con e sen Nile Red. No entanto, estas diferencias non terminan por mostrar dun xeito determinante que a presencia das moléculas de Nile Red están localizadas no interior da bicapa lipídica. Para mostrar máis evidencias disto último, imos efectuar dous tipos de experiencias, (1) experimental, realizando medidas de calorimetría diferencial de varrido (DSC) e (2) simulacións, utilizando a dinámica molecular. Na figura 7.6b móstranse os sinais de DSC para os liposomas catiónicos con Nile Red e para liposomas de DPPC. Como pode apreciarse, un cambio substancial entre as sinais está a indicar que a presenza das moléculas de Nile Red implica cambios a nivel conformacional na bicapa lipídica, alternando as necesidades enerxéticas de cambios nas isomerías das cadeas hidrocarbonadas dos lípidos. De tal xeito, comparando tamén cos

USC
UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

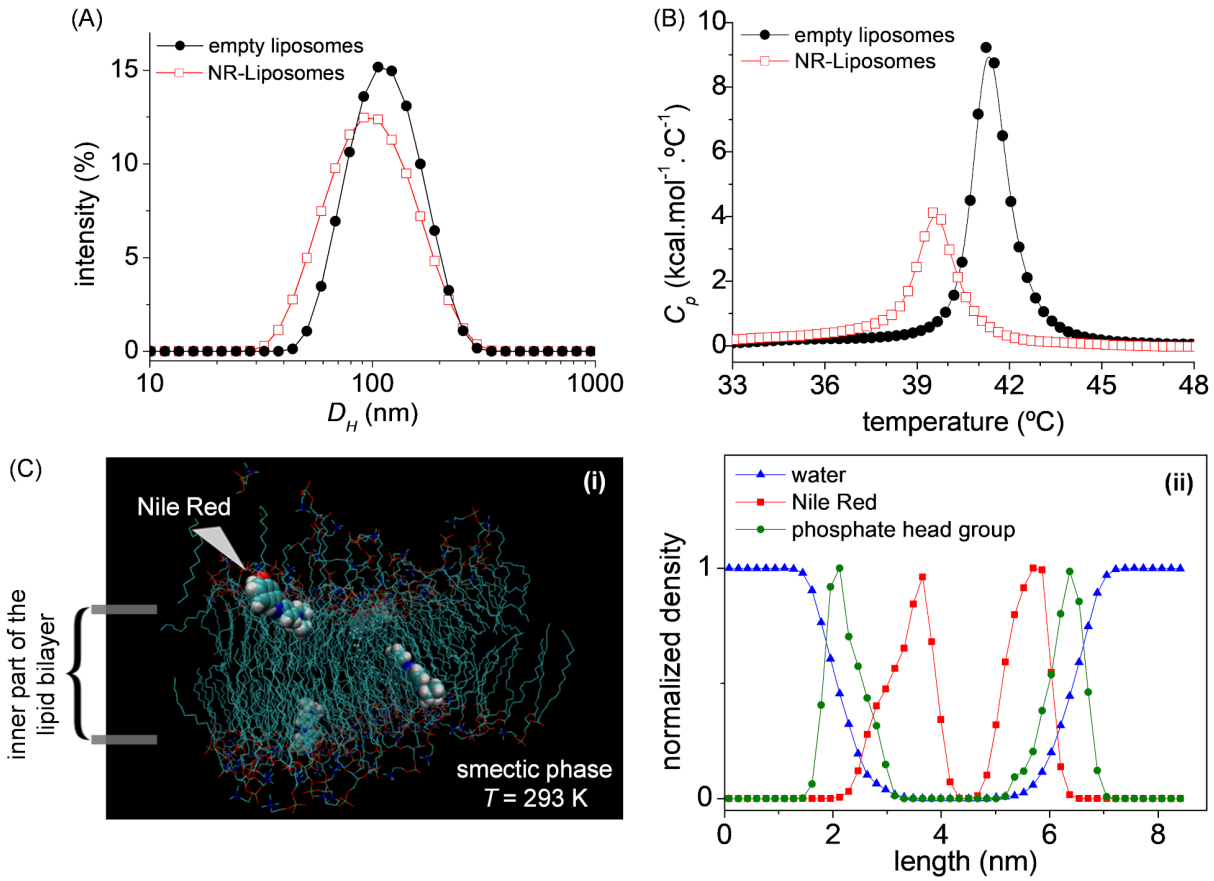

Figura 7.6: a) Perfís de intensidade de DLS para liposomas catiónicos con e sen Nile Red, en ámbalas medidas o medio dispersivo foi unha solución de 150 mM de NaCl a 25 °C. b) Móstranse os entalpogramas para a transición *xel* a *cristal-líquido* para liposomas catiónicos con Nile Red e para liposomas de DPPC. c) *Snapshot* de simulación de dinámica molecular da bicapa lipídica dos liposomas catiónicos empregados, observando a localización interna do Nile Red. d) Perfís da densidade, en dirección transversal á bicapa lipídica, para as moléculas de auga (azul), os átomos P do DPPC (verde) e os centros de masas das moléculas de Nile Red (vermello).

datos de DSC da figura 6.7d, aparecen diferencias notables debidas á presenza das moléculas de Nile Red. A temperatura da transición dos liposomas catiónicos, cargados con Nile Red, localízase na contorna dos 39.5 °C. Estes resultados calorimétricos estarían a avalar a localización do Nile Red no interior da bicapa lipídica.

Como se comentou, empregáronse simulacións de dinámica molecular para constatar a estabilidade da localización das moléculas de Nile Red no interior da bicapa lipídica dos liposomas catiónicos. A limitada solubilidade do Nile Red en auga[204] xa suxería unha

localización do Nile Red no interior da bicapa lipídica, os resultados de DLS mostraron lixeiros cambios respecto dos liposomas sen Nile Red, e os datos de DSC mostraron a interacción do Nile Red a nivel interno da bicapa lipídica. Na figura 7.6c represéntase un *snapshot* da fase de equilibrio dunha simulación da bicapa lipídica coa presenza de moléculas de Nile Red, mantendo a relación molar empregada na formulación. Obsérvase a localización, no equilibrio, das moléculas de Nile Red no interior da bicapa lipídica. Do mesmo xeito, a figura 7.6d mostra os perfís de densidade, transversal á bicapa lipídica, para a auga, para os átomos P dos lípidos DPPC e para os centros de masas das moléculas de Nile Red. A localización das moléculas de Nile Red está restrinxida ao interior da bicapa lipídica.

7.2.2 Complexos biomiméticos *Layer-by-Layer* e liposomas inmobilizados

A primeira fase da estratexia baseada no uso de liposomas catiónicos, cargados con Nile Red, como modelo de vesículas extracelulares, pasou por monitorizar a interacción dos liposomas con substratos bidimensionais. Na figura 7.7 móstranse resultados de microbalanza de cristal de cuarzo con medida da disipación. Unha mostra de liposomas catiónicos é titulada sobre un substrato de ouro acoplado a un sensor de cuarzo. Durante, aproximadamente, os primeiros 400 segundos, unha mostra do dispersante dos liposomas (0.15 mM NaCl a pH 7.4) é empregado para obter os valores da liña base, como se pode observar sen interacción apreciable co substrato de ouro. Logo de ese tempo de estabilización, comezamos a pasar a mostra dos liposomas catiónicos. Obsérvase unha primeira diminución da variación da frecuencia -neste caso no 3° *overtone* ou múltiplo da frecuencia fundamental do cuarzo-. A diminución da frecuencia é compatible co aumento da masa depositada, e acoplada fisicamente, sobre a superficie (véxase a ecuación 1.12), de xeito que a frecuencia fundamental varía. Obsérvase do mesmo xeito un mínimo nesa variación da frecuencia, e un lixeiro aumento ata que se alcanza un estado de equilibrio cun valor da frecuencia menor que a liña base inicial. Aquel mínimo, e o conseguinte aumento da

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

variación da frecuencia, resulta compatible cunha liberación da masa acoplada previamente á superficie. Pensando na estrutura los liposomas, esta *liberación* ou desacoplo de masa, unha vez que foron incorporados á superficie, podería ser atribuído á ruptura dos liposomas e o desacoplo do substrato coa auga interior dos liposomas. Esta fenomenoloxía xa foi reportada previamente[205], establecéndose así unha metodoloxía para a formación de bicapas lipídicas soportadas en superficies (suxírese observar a figura 5.4 da *Contextualización* desta sección). A forte interacción electrostática entre as membranas lipídicas dos liposomas e o ouro deforman, en primeira instancia os liposomas; e chegado un punto acaban por liberar a auga do interior e revestir a superficie coa bicapa lipídica, mantendo a súa conformación. O aumento da disipación observado na figura 7.7 tamén é compatible cun aumento inicial das propiedades viscoelásticas do medio adsorbido, con unha posterior diminución froito da perda de auga, e da conseguinte diminución do espesor da capa adsorbida.

O seguinte paso foi modificar as propiedades electrostáticas e mecánicas da superficie de ouro. O procedemento está baseado na formación de revestimentos poliméricos interaccionando por inversión de carga. No noso caso usáronse os polímeros polilisina e ácido hialurónico. O método seguido é esencialmente: unha capa de polilisina -signo de carga positivo- é adsorbida no ouro; posteriormente procédese analogamente cunha capa de ácido hialurónico -signo de carga negativo- ata alcanzar o equilibrio, e así sucesivamente ata xerar un substrato que consideremos o suficientemente *mol* ou brando. Esta metodoloxía é o punto de partida das tecnoloxías baseadas na funcionalización de substratos mediante *layer-by-layer* (LbL). A figura 7.8 mostra os datos de QCM-D para a formación dos substratos LbL con polilisina e ácido hialurónico, así como a adsorción de liposomas catiónicos cargados con Nile Red. Na figura 7.8a obsérvase que durante os, aproximadamente, primeiros 170 minutos, unha cadea de consecutivas titulacións de polilisina e ácido hialurónico determinan unhas diminucións concatenadas da variación da frecuencia, e un aumento da disipación. Cada unha das adsorcións de polielectrolito é seguida dun intervalo de tempo no que se titula o dispersante, de tal xeito que a estabilidade da capa

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

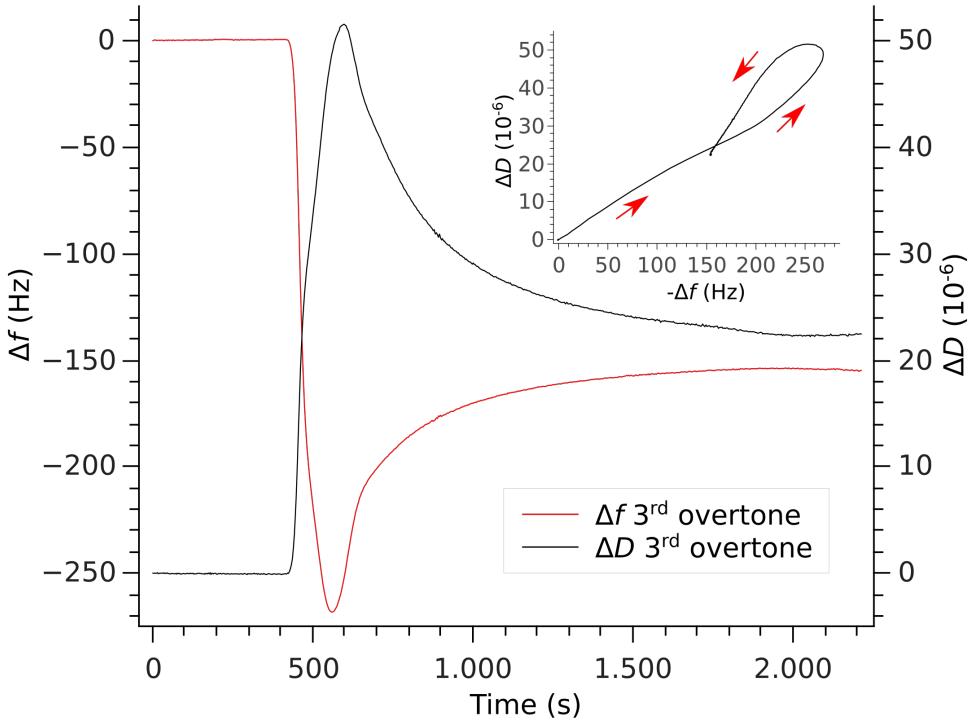

Figura 7.7: Resultados dos experimentos de QCM-D realizados onde se representa Δf e ΔD. Pódese observar a formación de bicapas lipídicas soportadas sobre os substratos de ouro. O mínimo na frecuencia Δf -e o máximo na disipación (ΔD)- mostran a liberación da auga interior dos liposomas, froito da forte interacción electrostática entre as bicapas lipídicas e o substrato de ouro.

previamente adsorbida queda garantida.

Logo da formación do substrato mol conformado pola configuración *layer-by-layer* dos polielectrolitos seleccionados (ver rexión I na figura 7.8a), procédese coa titulación dos liposomas catiónicos cargados con Nile Red. Na rexión II na figura 7.8a observamos un comportamento diferente ao dos datos da figura 7.7. Agora, a frecuencia diminúe, e a disipación aumenta, ata alcanzar un valor de equilibrio, sen describir ningunha inflexión que mostre perda de masa acoplada ao substrato. Este resultado indica que as propiedades viscoelásticas atribuidas agora á superficie, pola adsorción dos polielectrolitos, provocan unha incorporación dos liposomas debido ás propiedades electrostáticas tanto dos polímeros como dos propios liposomas. Ao mesmo tempo, favorecen unha reacomodación no substrato que permite aos liposomas manterse intactos, debido a que o substrato *layer-*

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

by-layer é mol.

Co fin de establecer un escenario de mímese, entre a matriz extracelular (ECM) e os substratos complexados, procédese a avaliar a capacidade de incrustación dos liposomas catiónicos, titulando polielectrolito por riba da capa de liposomas adsorbidos. A rexión III na figura 7.8a presenta os datos correspondentes a esa evolución, cuns resultados que mostran o soterramento dos liposomas baixo HA/PLL/HA. Esta habilidade dos liposomas, de incrustarse en complexos con presenza de glicosaminoglicanos (HA), estaría aludindo á posibilidade da interacción dos liposomas catiónicos coa ECM.

A figura 7.8c representa a viscosidade (η) e o módulo elástico (μ) estimados logo das sucesivas adsorcións de capas polielectrolíticas. O incremento xeral dos valores implica un comportamento viscoelástico dos substratos conformados. Do mesmo xeito, a representación dos valores do cociente das variables introducidas (η e μ)aporta información do sistema. A relación entre a viscosidade e o módulo elástico determina un cambio no seu comportamento antes e despois da adsorción da capa de liposomas. Este fenómeno está en consonancia con resultados reportados na bibliografía[206], nos que se mostra que o crecemento de substratos PLL/HA está determinado pola gradual presenza de moléculas de auga na complexación. Os datos obtidos mediante QCM-D mostran a complexación alternante das especies polielectrolíticas empregadas, así podemos observar a adsorción intacta dos liposomas catiónicos empregados, e a súa incrustación por recubrimento de polielectrolitos.

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

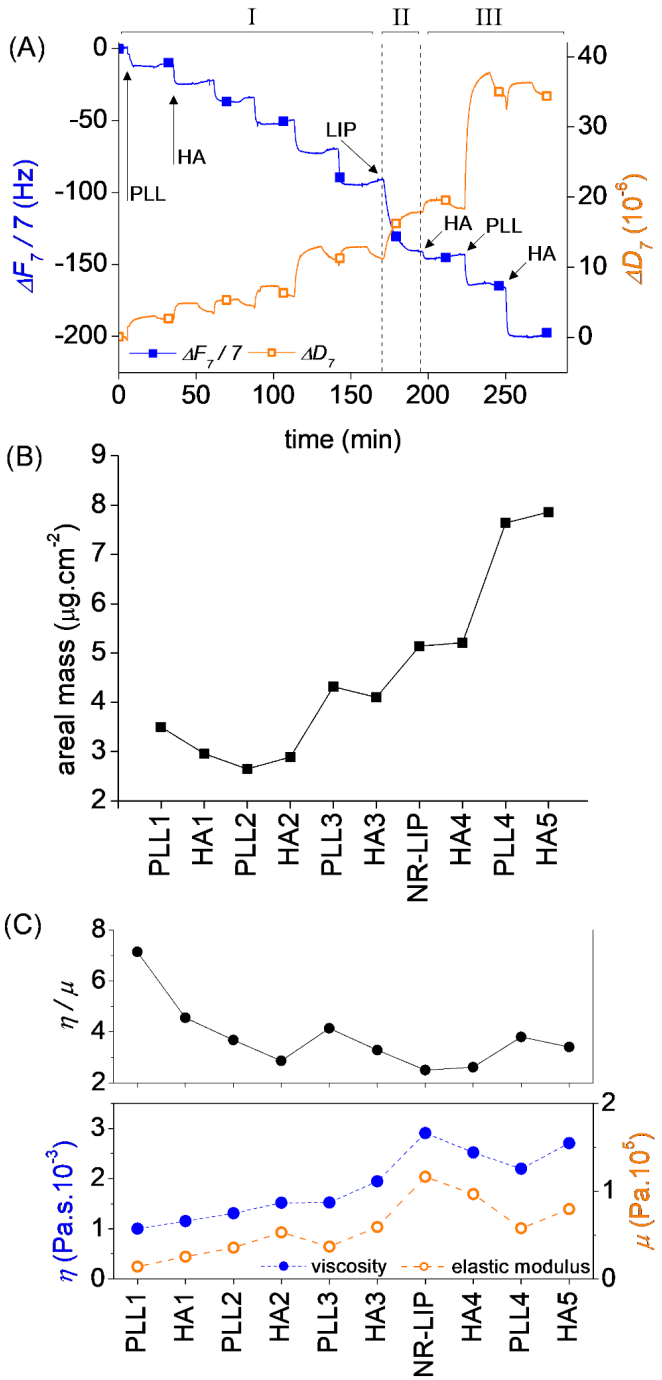

Figura 7.8: a) Representación dos datos QCM-D para a variación da frecuencia e da disipación ó longo da configuración dun substrato mol $(PLL/HA)_3$ -rexión I-, adsorción dos liposomas catiónicos con Nile Red -rexión II- e unha cobertura ulterior de HA/PLL/HA -rexión III- . b) Masa acumulada depositada segundo o modelo de aplicación aos datos da QCM-D. c) Viscosidade (η) e módulo elástico (μ) acumulados estimados. O modelo de viscoelasticidade de Voight foi o empregado para o cálculo da masa, viscosidade e módulo elástico.

7.2.3 Retención de Nile Red en liposomas catiónicos: adsorbidos ou incrustados

A encapsulación do Nile Red na bicapa lipídica está condicionada pola súa limitada solubilidade en auga. Deste xeito, a capacidade de retención de Nile Red, por parte dos liposomas, pode ser cuantificada mediante experimentos baseados en implicar unha presión osmótica que *elimine* o Nile Red dos liposomas: a diálise. Polo tanto, leváronse adiante experiencias para determinar a capacidade de retención dos liposomas cargados, tanto incorporados mediante adsorción a substratos poliméricos, como soterrados nos mesmos mediante ulteriores capas de polielectrolito. A liberación do Nile Red foi estudada a temperatura constante de 37 °C e en condicións salinas, na diálise, de 150 mM de NaCl. Estas magnitudes foron fixadas co fin de establecer un escenario de mímese biolóxica. A figura 7.9 mostra os perfís de liberación de Nile Red, tanto nos liposomas unicamente adsorbidos como nos soterrados. Pode observarse con claridade como a liberación do Nile Red dende os liposomas adsorbidos, na superficie dos complexos LbL, é máis rápida que a liberación dos liposomas soterrados. Este resultado pon en evidencia que as capas polielectrolíticas, depositada sobre a capa de liposomas catiónicos, estaría a desempeñar o rol de barreira difusiva para o Nile Red. Os liposomas adsorbidos de xeito exposto, liberaron, aproximadamente, un 65 % do Nile Red cargado inicialmente, logo de, aproximadamente, 23 minutos. No entanto, os liposomas soterrados liberaron no mesmo intervalo temporal, aproximadamente, un 41 %. Este comportamento reflexa a capacidade das capas ulteriores, de polielectrolito, para retardar a difusión do Nile Red dende os liposomas.

Para determinar mellor a elección do *inset* da figura 7.9, móstranse na figura 7.10 os resultados de axustar os datos dos perfís de liberación a diferentes modelos de liberación. Obsérvase que os datos de liberación corresponderían dun xeito máis xusto a unha aproximación ao modelo de Higuchi ou de cinéticas de primeiro orde. Estes modelos son empregados para describir a liberación de fármacos dispersos en matrices, ou retículas de material. Nos sistemas que plantexamos, as capas polielectrolíticas (HA/PLL/HA) sobre

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

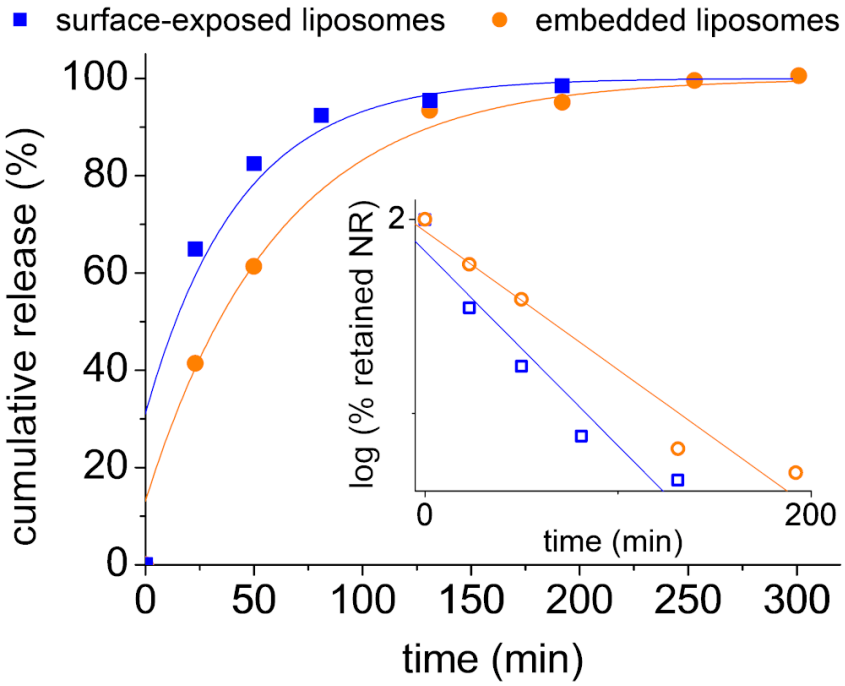

Figura 7.9: Representación dos perfís de liberación acumulada de Nile Red, dende liposomas adsorbidos e expostos, e dende liposomas soterrados en substratos poliméricos. A liña azul mostra o perfil de liberación do Nile Red no sistema formados polos liposomas adsorbidos e expostos. A liña laranxa mostra o perfil de liberación do sistema formados polos lipomas incrustados. A subfigura (*inset*) mostra a representación das liberación en representación logarítmica da porcentaxe de liberación acumulada fronte o tempo.

a capa de liposomas, considérase unha matriz polimérica con enlazamento con covalente, e complexada por LbL.

Os perfís de liberación do Nile Red foron axustados a diferentes modelos de liberación para determinar cal era o máis adecuado a este sistema. No recadro *inset* mostrado na figura 7.9 mostra a liberación tanto de liposomas expostos á superficie como de liposomas incrustados seguindo unha cinética de primeira orde. Os axustes ao restos dos modelos aparecen na figura 7.10. Obsérvase que os datos de liberación se axustan mellor a unha aproximación ao modelo de Higuchi ou de cinéticas de primeiro orde. Estes modelos analizados son xeralmente empregados para describir a liberación de fármacos dispersos en matrices ou retículas de material. Nos sistemas que plantexamos, as capas polielectrolíticas (HA/PLL/HA) sobre a capa de liposomas, considéranse unha matriz polimérica con enlazamento covalente e complexada por LbL.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

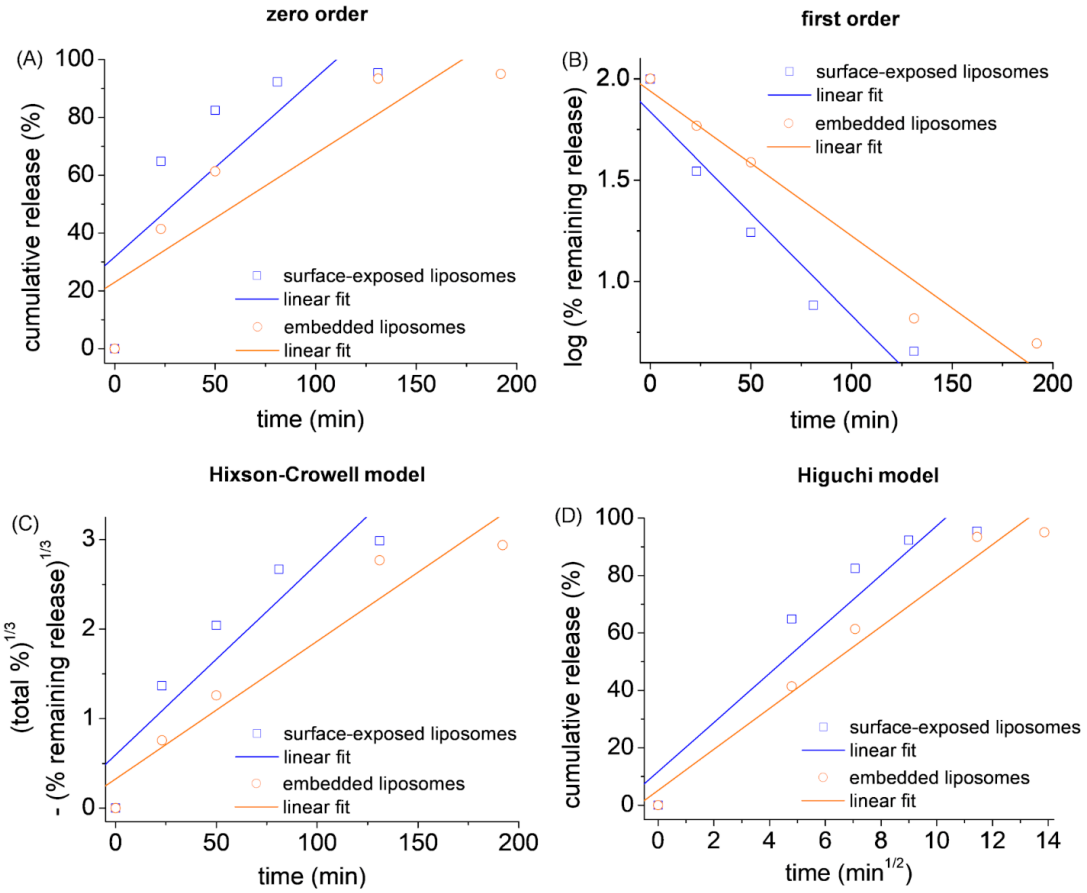

Figura 7.10: Representación dos perfís de liberación axustados a diferentes modelos: a) orde cero, b) primeiro orde, c) Hixson-Crowell e d) Higuchi. En modelos de liberación de orde cero, a liberación acumulada varía linealmente co tempo. En modelos de primeiro orde, o logaritmo da cantidade de material non liberado varía linealmente co tempo. No modelo de Hixson-Crowell, a raíz cúbica da cantidade de material non liberado é restada á raíz cúbica da cantidade total de material a liberal, e o resultado represéntase en función do tempo. No modelo difusivo de Higuchi a liberación acumulada represéntase como función da raíz cadrada do tempo.

O proceso de liberación farmacolóxica é un fenómeno controlado por difusión. Facendo analoxía á ecuación 5.10, coñecida como ecuación de Ward-Tordai, un problema de difusión é un problema de contorno gobernado por unha ecuación de calor con determinadas condicións no seu sistema. Estas condicións poden ser moi complexas, tales como diferentes medios en contacto, que describan barreiras difusivas concatenadas, ou xeometrías moi complexas. O modelo máis simple para a liberación dun fármaco é o modelo de orde cero:

$$\frac{\mathrm{d}M}{\mathrm{d}t} \propto C \tag{7.1}$$

onde M é a masa de fármaco liberada, t o tempo e C a concentración de soluto no medio no que se libera. Un modelo máis completo da liberación, é o que ten en conta a cinética de liberación, mediante a relación entre a concentración liberada e variación temporal desta concentración. Así non é necesario establecer na relación de liberación a condición de masa liberada, é a liberación é produto do balance de concentración cara ao equilibrio:

$$\frac{\mathrm{d}C}{\mathrm{d}t} = -\kappa C \tag{7.2}$$

onde C é a concentración de soluto, ou fármaco, liberada. t é o tempo e κ é unha constante de liberación.

O modelo matemático de Higuchi, para a liberación farmacolóxica, describe a difusión dun fármaco dende unha matriz a un medio determinado. Usando un modelo de difusión determinado por unha matriz plana, que desempeña o papel de barreira difusiva homoxénea:

$$Q(t) = \sqrt{D(2C - C_s)C_s t} \tag{7.3}$$

onde Q é a cantidade de fármaco liberado co tempo (t). C é a concentración inicial de fármaco, C_s é a solubilidade do axente activo na matriz e D é o coeficiente de difusión do fármaco na matriz.

O último dos modelos aplicados é o de Hixson-Crowell, que xurde da relación proporcional entre unha área regular determinada por partículas adsorbidas e a raíz cúbica do volume ocupado por elas:

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

$$\sqrt[3]{W_0} = \sqrt[3]{W_i} + \kappa_{HC} t \tag{7.4}$$

onde W_0 é a cantidade inicial de fármaco no sistema, W_i é a cantidade que vai quedando no sistema cando a liberación transcorre, e κ_{HC} é a constante de incorporación de Hixson-Crowell, que relaciona a superficie ocupada co volume necesario.

7.2.4 Internalización en células de cancro de mama MDA-MB-231

Ata o de agora, os resultados mostraron a encapsulación eficiente dun modelo de fármaco, Nile Red, en liposomas catiónicos; tamén se confirmou a súa incorporación de forma intacta en substratos poliméricos con datos de QCM-D. Esta capa, incorporada de maneira estable, foi tamén sometida a un soterramento en capas de polielectrolitos. Co fin de establecer unha analoxía formal entre os liposomas catiónicos cargados con Nile Red e as vesículas extracelulares, procédese con experimentos de internalización destes liposomas nunha determinada liña celular cancerígena.

Posto que as vesículas extracelulares (EVs) están implicadas na tumorxénese e na metástase, empregamos a liña celular de cancro de mama MDA-MB-231, e monitorizamos a internalización dos liposomas catiónicos cargados con Nile Red dende os diferentes tipos de substratos poliméricos complexados. A metodoloxía baseouse en experiencias de incubación a 1, 3 e 7 horas de exposición de células MDA-MB-231 con liposomas catiónicos cargados con Nile Red en dispersión, adsorbidos na superficie $(PLL/HA)_3$ e soterrados en HA/PLL/HA. Tendo presente que a internalización celular de sistemas como a EVs é, predominantemente, un proceso mediado por endocitose non específica[207, 208], durante o cal as células consumen vesículas engulíndoas coa membrana celular, xerando endosomas. A figura 7.11 mostra imaxes de microscopía confocal de cultivos de células MDA-MB-231. A fluorescencia do Nile Red é observada en vermello, mentres que o verde resalta o *glicocálix* e o azul o núcleo celular. Obsérvase a internalización dos liposomas catiónicos cargados con Nile Red incluso na primeira hora de incubación (ver figura 7.11D).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Con eses cultivos celulares, monitorizados no tempo, preténdese estudar tanto a internalización dos liposomas catiónicos cargados co Nile Red, como o espallamento das

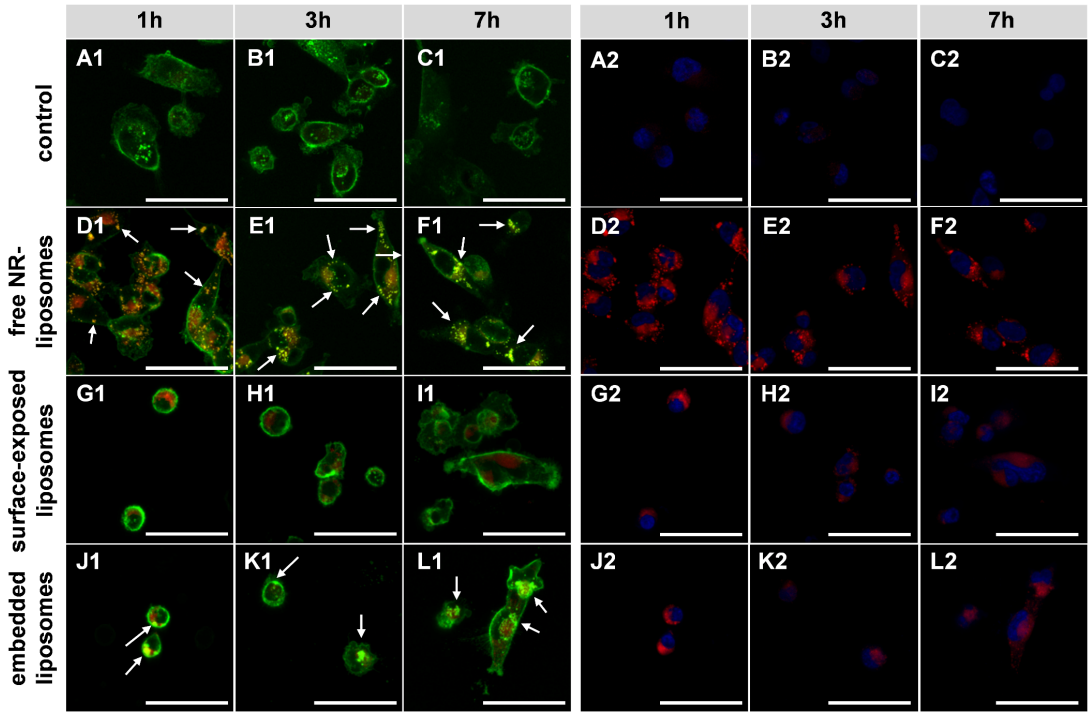

Figura 7.11: Imaxes de microscopía confocal de internalización por incubación, a diferentes horas, de liposomas catiónicos cargados con Nile Red. A-C) imaxes da incubación de MDA-MB-231 para o control. D-F) células en contacto cunha dispersión de liposomas catiónicos cargados con Nile Red. G-I) células depositadas en substratos poliméricos $(PLL/HA)_3$ cunha capa de liposomas catiónicos cargados con Nile Red. J-L) células depositadas sobre un substrato HA/PLL/HA que soterra ao sistema anterior. As coloracións das imaxes son referidas aos máximos de emisión de fluorescencia do Nile Red (vermello en A1-L2), WGA (verde en A1-L1) de DAPI (azul en A2-L2). As frechas indican a localización do Nile Red e do WGA. A escala empregada foi de 50 μm.

células nos diferentes substratos. A tempos de cultivo curtos (1 a 3 horas), observáronse poucas células sobre os substratos, e as que se observan mostran unha forma redondeada, o que corresponde cos primeiros pasos da adhesión celular sobre substratos moles (ver figura 7.11G,H,J,K). A longos períodos de incubación (7 horas, ver figura 7.11I,L), a morfoloxía foi similar aos experimentos de control para tempos curtos (ver figura 7.11A,D); nesta situación as células alcanzan a ser máis alongadas e forman protusións que incrementan a superficie de adhesión. Estas diferenzas morfolóxicas son debidas a unha maior rixidez das placas de cultivo que os substratos LbL[209]. A internalización dos liposomas libres e dos inmobilizados tamén foi diferente: apreciablemente máis rápida e alta nos

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

liposomas en suspensión, fronte aos inmobilizados ou soterrados. Este é un resultado con relevancia particular, pois demostra que a inmobilización dos liposomas modula dun xeito espazo-temporal a internalización en células.

A interacción entre EVs e células pode ser específica (mediante a interacción ligando-receptor) ou non específica (mediante endocitose ou fusión de membrana)[207]. Na situación dos liposomas soterrados obsérvase que o Nile Red rodea o glicocálix (identificado co WGA), o que é consistente coa endocitose (ver figura 7.11J-L). Obsérvase que a internalización dos liposomas catiónicos cargados con Nile Red, e soterrados no substrato LbL, migran dende rexións próximas á membrana celular aos arredores do núcleo, a medida que o tempo de incubación aumenta. Este fenómeno tamén é vinculable a un modo de internalización por endocitose. Por outra banda, os experimentos de incubación en substratos onde os liposomas quedaron expostos, sen soterrar, sobre $(PLL/HA)_3$, presentaron un tinxido con Nile Red a través do citoplasma, pero sen chegar a estar engulido no glicocálix (ver figura 7.11G-I). Os perfís de intensidade de fluorescencia por confocal da figura 7.12 mostran unha distribución de Nile Red acorde e máis homoxénea. Estas observacións contrastan coa fluorescencia punteada que se observa nos sistemas de liposomas soterrados, o que suxire que o Nile Red podería estar a internalizar por difusión, dende os liposomas expostos nos complexos LbL ata as células. De feito, a rápida liberación do Nile Red dende os sistemas conformados por substratos cos liposomas expostos, sen soterrar, resultou ser máis rápida que nos soterrados (ver figura 7.9).

A difusión do Nile Red dende os liposomas ata as células pode ser entendida en termos de migración das moléculas a través de barreiras difusivas, por acción de gradientes térmicos, interacción electrostáticas ou multipolares ou gradientes osmóticos. Tamén, os surfactante gemini foron empregados como adxuvantes en fusión de membrana celular[43], proceso no que se desestabiliza a bicapa lipídica dos liposomas e a substancia cargada é liberada no interior da célula. Tamén notamos que no sistema no que os liposomas se atopan soterrados, unha das capas ulteriores é de HA. A maior parte dos tumores degradan HA mediante actividades de acción encimática. Así, os complexos LbL poderían ser

USC DE COMPOSTELA

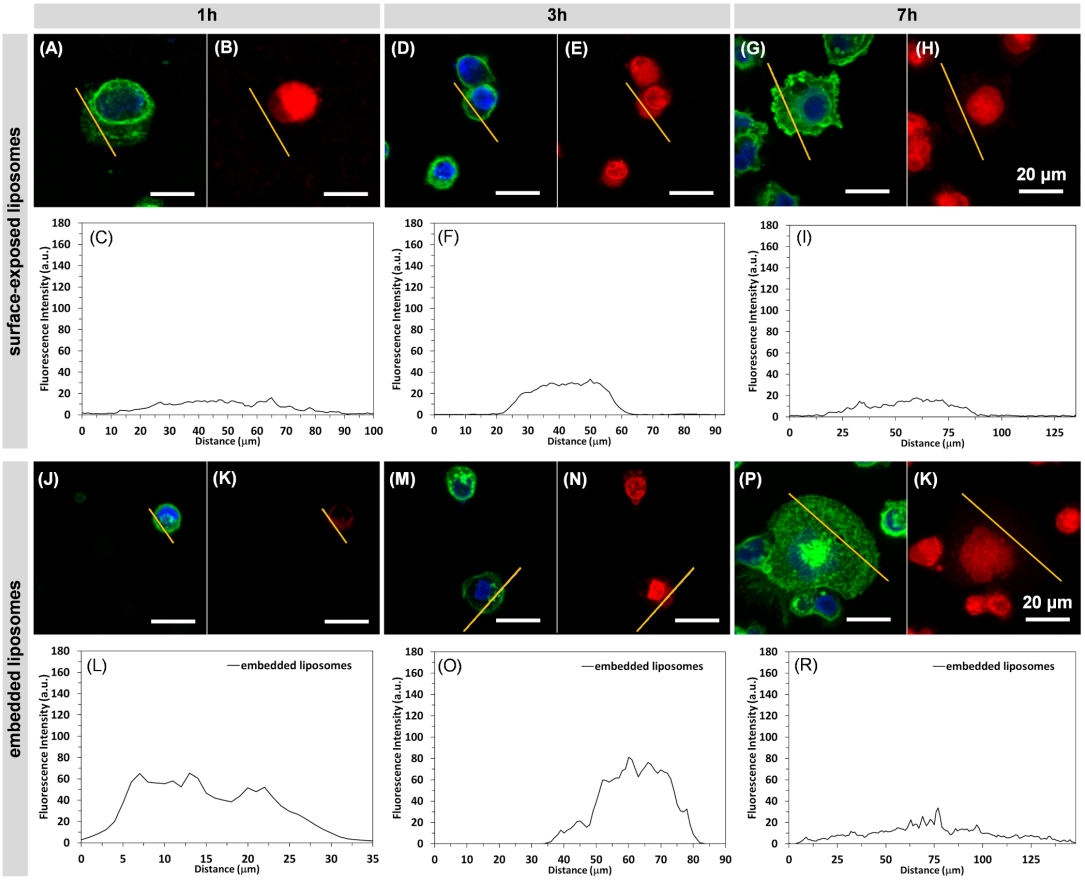

Figura 7.12: Perfís da distribución por intensidade de fluorescencia do Nile Red en células depositadas sobre superficies con liposomas expostos (A-I) e soterrados (J-R). As liñas amarelas representan os perfís para a cuantificación da intensidade vermella. A distribución de Nile Red é *suave*, sen picos abruptos, en células depositadas sobre substratos con liposomas expostos (C,F e I), o que indica que o Nile Red podería estar a difundir dende os liposomas ata as células. Os perfís de intensidade vermella das células depositadas sobre substratos con liposomas soterrados (L, O e R) mostran picos abruptos, suxerindo a endocitose dos liposomas como fenómeno de internalización. A escala empregada foi de 20 μm.

degradados con hialuronidasas e controlar deste xeito a liberación do fármaco. Estes resultados previos indican que as células de MDA-MB-231 actuarían como deconstructoras das capas, e liberadoras do liposomas catiónicos dende o substrato. Os endosomas observados indican que os complexos LbL, que constitúen un sistema mimético da ECM, estarían a mellorar a estabilidade dos liposomas adsorbidos. Deste xeito, queda validada a hipótese exposta, ao establecer como modelo de interacción entre EVs e ECM aos sistemas LbL e liposomas catiónicos.

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

7.3 Liposomas catiónicos en hidroxeis

7.3.1 Liposomas catiónicos cargados con Dexametasona

Seguindo unha liña experimental similar á empregada na caracterización dos liposomas catiónicos cargados con Nile Red, presentaranse de seguido os resultados da caracterización de liposomas catiónicos cargados con Dexametasona (DEX). A síntese dos liposomas que empregaremos está baseada no procedemento descrito na sección da metodoloxía. No entanto, preséntase aquí un resumo do proceso no que se describe a formulación empregada nos liposomas que se usarán nesta nova aplicación (liposomas catiónicos combinados con xeis). DPPC, gemini de espazador 4 e DEX (200/4/100, respectivamente) foron disoltos en cloroformo. De seguido, a fase orgánica foi eliminada co rotavapor, para despois hidratar a película homoxénea cunha solución PBS a pH 7.4, baixo sonicación. A dispersión de liposomas catiónicos con DEX non foi extruída, pois os datos de DLS confirmaron un tamaño hidrodinámico na contorna dos 100 nm e unha polidispersividade (PDI) moi reducida.

A distribución de tamaños (radios hidrodinámicos) para os liposomas catiónicos cargados con DEX móstranse na figura 7.13. O perfil da intensidade foi medido por DLS a temperatura ambiente. Dun xeito similar ao observado para os liposomas catiónicos cargados con Nile Red, non se aprecian diferencias substanciais entre os liposomas catiónicos con e sen DEX (ver figuras 6.20, 6.21 e 7.6a), tanto no tamaño hidrodinámico como no PDI. Os resultados para o potencial ζ tamén foron medidos, de tal xeito que o carácter catiónico dos liposomas pódese apreciar observando a figura 7.13b.

A baixa solubilidade da DEX en auga, así como as pequenas diferencias observadas por DLS entre os liposomas catiónicos con e sen DEX, estaría a indicar que zona de colocación preferencial da DEX, incluída na formulación de liposomas, sería o interior da bicapa lipídica. Neste sentido realizáronse medidas de calorimetría diferencial de varrido (DSC). Na figura 10.9 móstrase o entalpograma para os liposomas catiónicos cargados

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

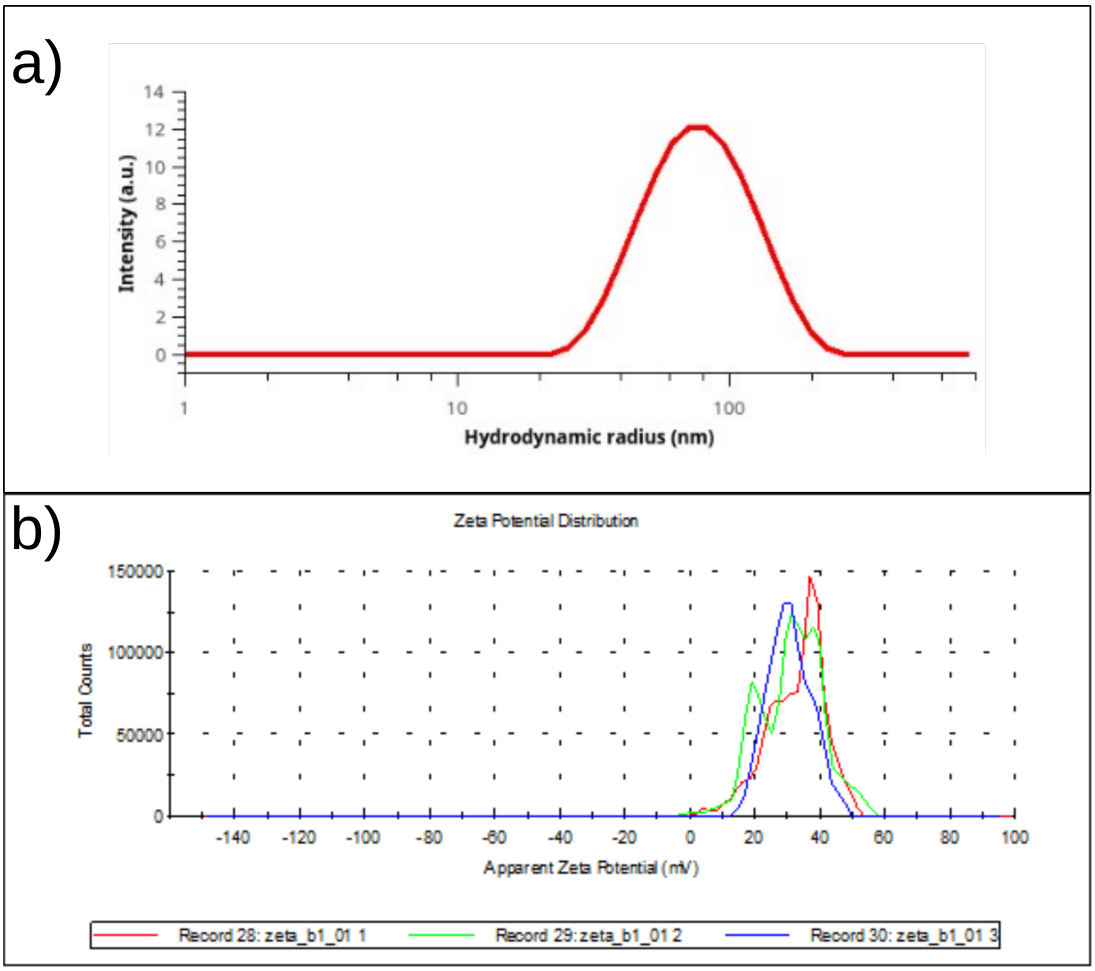

Figura 7.13: a) Representación da intensidade de DLS para unha mostra de liposomas catiónicos cargados con DEX. A relación molar empregada foi 200/4/100 (DPPC/gemini/DEX). b) Representación do potencial ζ para os liposomas anteriores.

con DEX. Obsérvase que o sinal correspondente coa transición da fase *xel* a *cristal-líquido* para os liposomas catiónicos con DEX sofre unha variación significativa, respecto do sinal para os liposomas catiónicos sen DEX (baleiros), algo que xa acontecía cos liposomas catiónicos cargados con Nile Red (ver figura 7.6b). A presenza da DEX estaría a aumentar as probabilidades de cambios de isomerías nas cadeas hidrocarbonadas dos lípidos, o que estaría a provocar unha diminución da temperatura de transición. Estes resultados, en conxunción cos reportados por DLS, estarían a confirmar a encapsulación da DEX no interior da bicapa lipídica dos liposomas catiónicos.

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

7.3.2 Incorporando liposomas catiónicos con DEX en hidroxeis

Continuando coa evolución e complexación de sistemas a cada paso máis completos, empregaranse os liposomas catiónicos cargados con DEX para incorporalos en hidroxeis formados por ácido hialurónico. A habilidade dos liposomas catiónicos cos que estamos a traballar, baseados en DPPC e dopados cunha pequena cantidade de surfactante gemini, para incorporarse de xeito intacto en substratos poliméricos, con capas de ácido hialurónico, foi confirmada nas experiencias da sección anterior. En elas, usáronse os liposomas catiónicos como sistemas miméticos de algunhas propiedades das vesículas extracelulares; a súa incorporación intacta foi mostrada mediante resultados de QCM-D, e as habilidades de retención farmacolóxica foron avaliadas con experiencias de diálise.

Neste punto, imos empregar a idea de adsorción intacta de vesículas en substratos poliméricos de ácido hialurónico, para así incorporar os liposomas catiónicos, esta vez cargados con DEX, a medios porosos tridimensionais de ácido hialurónico: os hidroxeis. A preparación dos hidroxeis de ácido hialurónico *metacrilado* foi presentada na sección de metodoloxía. A incorporación dos liposomas catiónicos, cargados con DEX, realizouse antes da reticulación dos hidroxeis con luz ultravioleta; así, cando se incorpora o PBS a pH 7.4 tamén se engade á dispersión dos liposomas catiónicos cargados con DEX. Para ter indicios experimentais da incorporación dos liposomas catiónicos na superficie dos poros dos hidroxeis, realízanse experimentos de DSC a mostras de liposomas catiónicos con DEX e a hidroxeis cargados con estes liposomas. Nas medidas de DSC dos liposomas catiónicos cargados con DEX, a referencia é o medio no que están dispersos, é dicir, buffer de PBS a pH 7.4. Nas medidas de DSC do hidroxel con liposomas catiónicos cargados con DEX, a referencia é un hidroxel das mesmas características que o empregado para incorporar os liposomas. Deste xeito, calquera fluxo de calor que se estableza entre a cela referencia e a cela mostra será debido á transición de fase *xel* a *cristal-líquido*, na bicapa lipídica.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

O tamaño dos poros nos hidroxeis teñen unha escala de decenas de μm, é dicir, centos de veces máis grandes que as dimensións hidrodinámicas dos liposomas. Deste xeito, si os

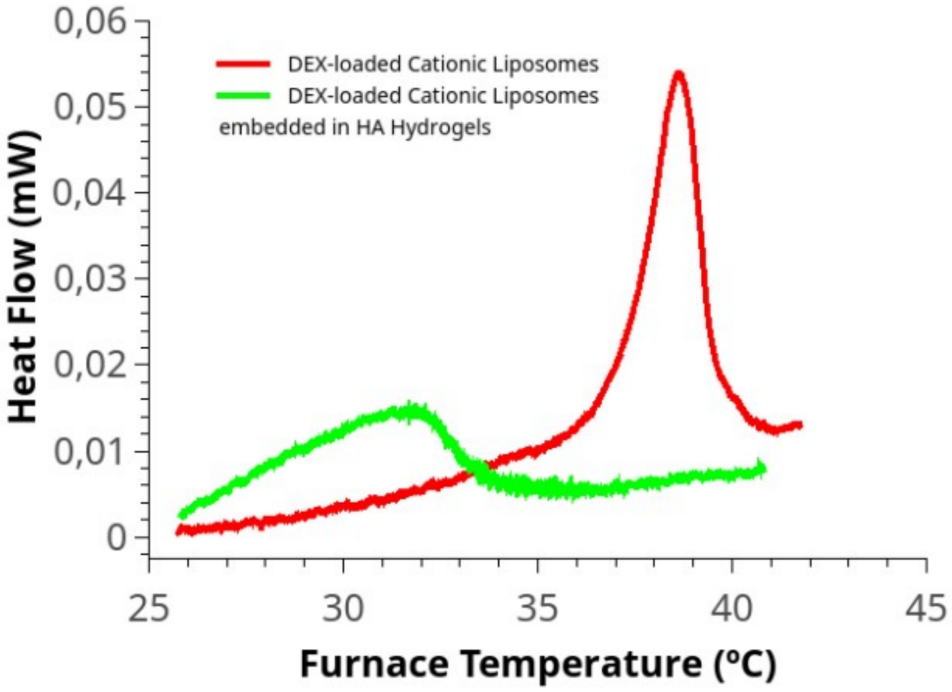

Figura 7.14: Representación dos entalpogramas de DSC para os liposomas catiónicos cargados con DEX en dispersión libre en PBS (curva vermella) e adsorbidos nas superficies porosas dos hidroxeis de HA (curva verde). É preciso notar que na medida dos liposomas libres a referencia foi *buffer* PBS, mentres que na medida dos liposomas adheridos ó hidroxel a referencia foi un hidroxel *baleiro* das mesmas características que o *cargado* cos liposomas.

liposomas están dispersos no interior dos poros do hidroxel, as diferencias calorimétricas observadas entre unha mostra de liposomas libres ou incorporados no hidroxel deberían ser nulas. A figura 7.14 representa os entalpogramas para a transición conformacional da bicapa lipídica en liposomas catiónicos cargados con DEX, e para estes mesmos liposomas incorporados a un hidroxel. A diferencia, tanto na temperatura de transición como na entalpía, é clara; e reflexa unha propiedade do sistema que estamos procurando. Si os liposomas son incorporados ao hidroxel, adsorbidos na superficie dos seus poros, a transmisión da enerxía involucrada nos cambios de isomería (ver figura 6.5), no interior da bicapa lipídica, será consecuencia tamén do hidroxel, ademais das moléculas de auga. Deste xeito, é asumible pensar que existirá unha variación tanto na temperatura como na enerxía, cando os liposomas se encontren adsorbidos nas superficies dos poros do hidroxel.

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

Tamén a variación observada na anchura dos sinais da figura 7.14 estaría a indicar que hai un solapamento de consecutivas transicións de fase a diferentes temperaturas, froito das diferentes ubicacións dos liposomas ao largo da superficie do hidroxel (ver a figura 6.10).

Posto que a reticulación dos hidroxeis cargados cos liposomas é realizada en presencia dos mesmos, vai ser preciso garantir que as propiedades estruturais dos hidroxeis, a nivel da súa xeometría, non se ven notablemente alterados. Aínda que as medidas de DSC son claras mostrando a conservación da fase lamelar nos liposomas incluídos nos hidroxeis, necesitamos mostrar dalgún xeito que a presencia dos liposomas cargados se localiza nas cavidades porosas do hidroxel. Así, empregáronse os liposomas catiónicos, pero cargados, de novo, coa molécula fluorescente Nile Red. Unha vez que o hidroxel foi reticulado en presencia dos liposomas catiónicos cargados con Nile Red, realizáronse medidas de microscopía confocal con medida de emisión por fluorescencia.

A figura 7.15 mostra as imaxes de microscopía confocal de seccións de hidroxeis cargados con liposomas catiónicos con Nile Red. Así pódese observar que a coloración vermella, referida ao Nile Red, está localizada nas cavidades porosas do hidroxel. Como está comentado na sección de métodos, a versatilidade do Nile Red tamén reside na súa capacidade de extinción de fluorescencia si se atopa solvatado de auga; así, o feito de observar a coloración vermella implica que temos Nile Red, e que se atopa incluído nunha contorna non polar, a bicapa lipídica. As imaxes de microscopía confocal tamén permiten observar a integridade do hidroxel e a formación dos poros, aínda en presencia dos liposomas catiónicos na súa reticulación.

7.3.3 Liberación *in vitro* de DEX dende liposomas catiónicos

A capacidade de retención de DEX nos liposomas catiónicos foi determinada mediantes experimentos de liberación, empregando metodoloxías de diálise. A pesar de que o método de diálise empregado xa foi introducido na sección adecuada, comentarase brevemente as condicións na que se levaron adiante as diferentes medidas nesta sección.

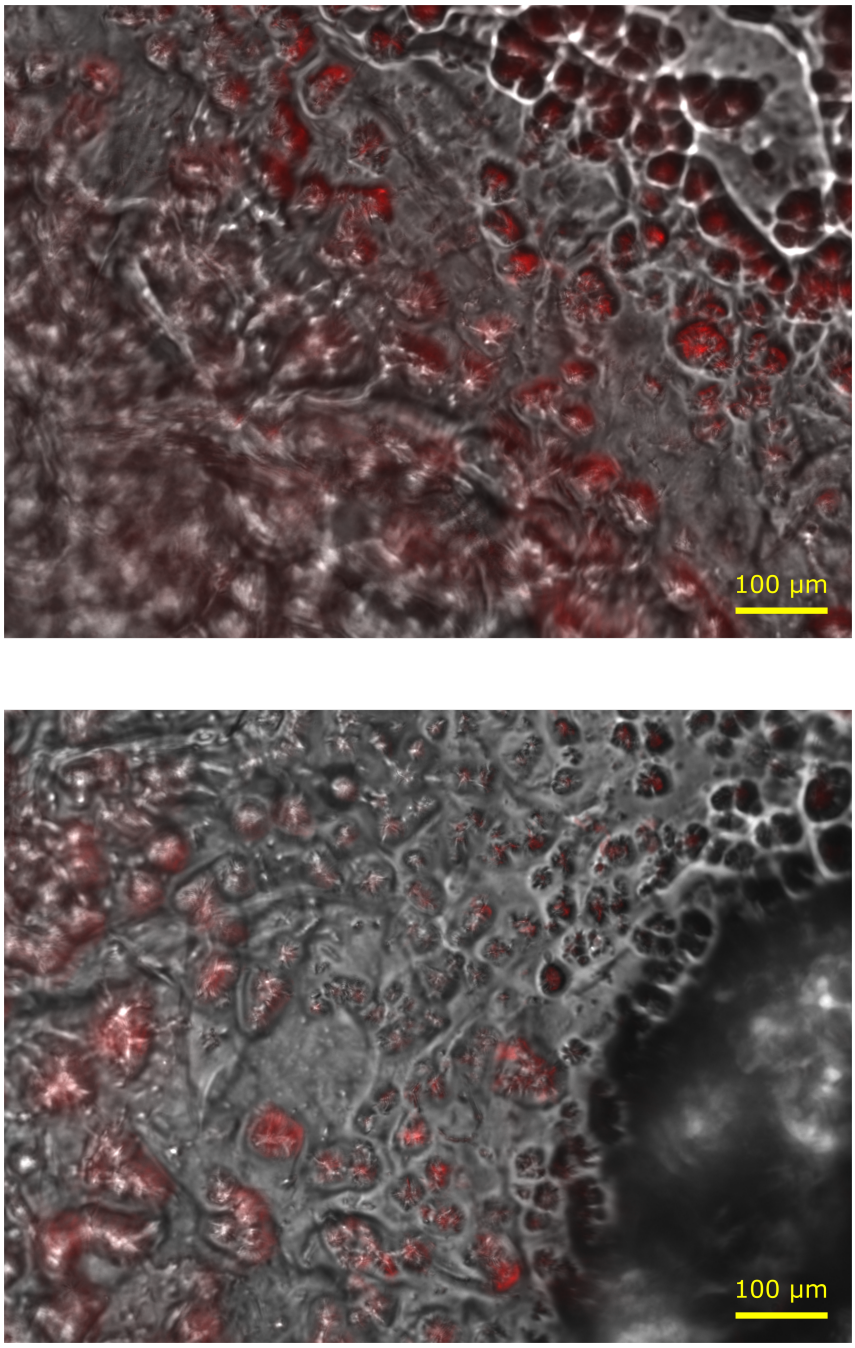

Figura 7.15: Imaxes de microscopía confocal de dúas seccións de hidroxeis *cargados* con liposomas catiónicos con Nile Red. A escala mostra a orde de magnitude dos poros do hidroxel nas características que empregamos, e a cor vermella nos ocos corresponde coa presenza do Nile Red. É preciso comentar que o feito de apreciar a fluorescencia do Nile Red indica que debe estar encapsulado nunha contorna lipídica ou apolar.

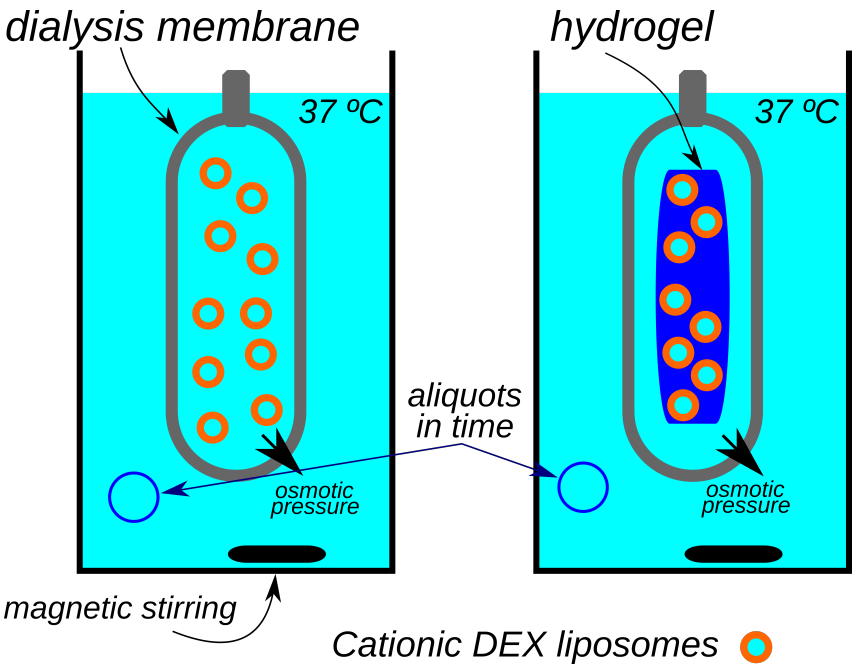

Figura 7.16: Representación esquemática dos experimentos de liberación con liposomas catiónicos cargados con DEX en dispersión libre, e adsorbidos nos hidroxeis. Os experimentos de diálise foron feitos a 37 °C e en condicións de axitación. As mostras que determinan o perfil foron tomadas no tempo correspondente do exterior da bolsa de diálise.

Realizáronse dous experimentos diferentes; no primeiro, o interior da bolsa de diálise encheuse cunha mostra de liposomas catiónicos cargados con DEX e no segundo, no interior da bolsa de diálise introduciuse un hidroxel, que incorporou na súa reticulación unha dispersión de liposomas catiónicos cargados con DEX. A figura 7.16 mostra un esquema de ámbolos dous procedementos realizados. Posto que a porosidade do hidroxel é moito maior que as dimensións espaciais que ocupa unha molécula de DEX, si os liposomas non estiveran a interaccionar coas superficies dos poros do hidroxel, os perfís de liberación entre o sistema de liposomas dispersos ou incluídos do hidroxel debería ser semellante. Ao largo do tempo dos experimentos de diálise, mostras do exterior da bolsa foron reservadas, tomando nota do instante no que se extrae a alícuota. Posteriormente, a cantidade de DEX nas mostras, tomadas na diálise, foi cuantificada mediante experimentos de HPLC acoplado cun espectrofotómetro. As curvas de calibración presentadas na sección da metodoloxía de HPLC permiten establecer a relación entre a intensidade de absorbancia no

espectrofotómetro e a cantidade de DEX na mostra examinada. De seguido, estímase a cantidade de DEX liberada tendo en conta a relación entre volumes, tal e como se presenta na metodoloxía da diálise, e constrúense os perfís de liberación acumulativa.

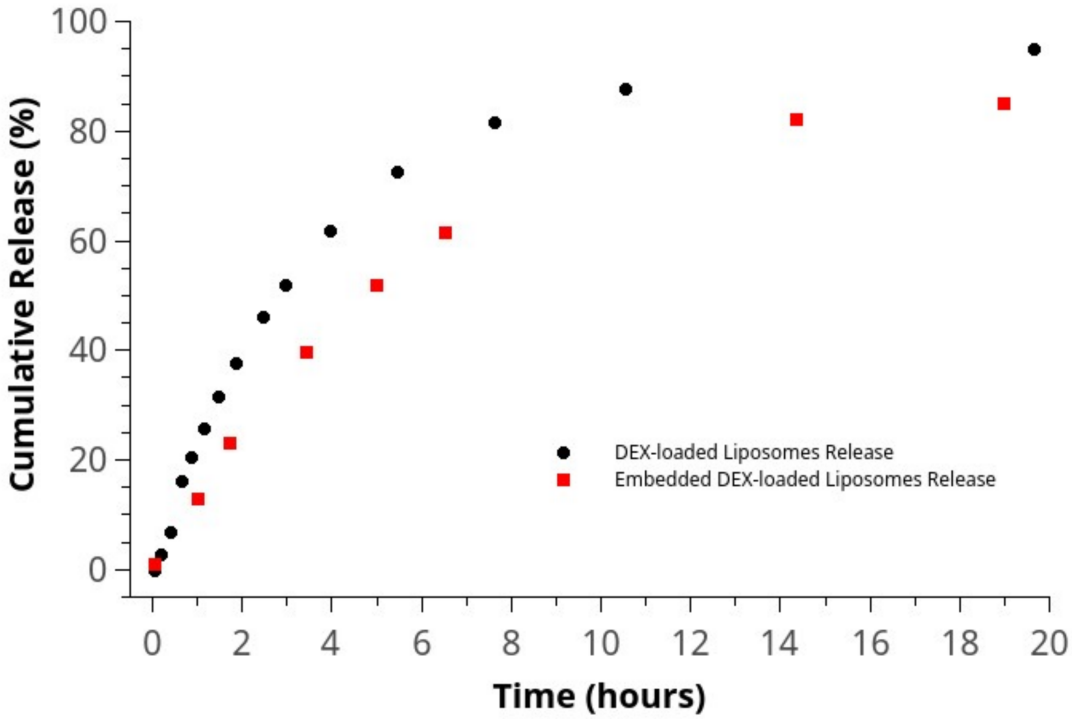

Figura 7.17: Representación dos perfís de liberación acumulativa correspondente aos experimentos de diálise do esquema da figura 10.11.

A figura 7.17 mostra os perfís de liberación para os dous sistemas de diálise plantexados no esquema da figura 7.16. Obsérvase que logo de 3 horas de diálise, aproximadamente o 50 % da DEX cargada foi liberada dende os liposomas catiónicos dispersos libremente dentro da bolsa de diálise. Mentres, para alcanzar a mesma cantidade de DEX liberada no caso da diálise do hidroxel cos liposomas incluídos, foron necesarias, aproximadamente, 5 horas. Estas experiencias de liberación permiten mostrar, xunto cos resultados das seccións anteriores, que os liposomas catiónicos cargados con DEX están interaccionando coas superficies dos poros que conforman os hidroxeis. Deste xeito, a funcionalización das superficies dos poros dos hidroxeis é posible empregando os liposomas catiónicos que

estamos a tratar. Esta fenomenoloxía permite establecer un punto de partida para desenrolar unha plataforma de diferenciación de células mesenquimais (MSC), controlando determinadas características do *andamio* -hidroxel- e do fármaco cargado nos liposomas. No caso particular da DEX, e como se introduciu previamente, preséntase a capacidade de diferenciar as MSC en osteoblastos, condrocitos ou adipocitos; dependendo, entre outros factores, das concentracións de DEX utilizadas. Neste sentido, presentaranse datos de citotoxicidade dos sistemas liposómicos empregados e, tamén, das súas capacidades para promover a diferenciación de MSC en osteoblastos.

7.3.4 Avaliando a citotoxicidade dos liposomas catiónicos

Para avaliar a citotoxidade, dos liposomas catiónicos empregados, leváronse adiante ensaios de incubación de MSC en presenza de liposomas de DPPC e liposomas catiónicos cargados con DEX. A evolución da supervivencia celular foi cuantificada a 24, 48 e 72 horas. Os cultivos e as cuantificacións da supervivencia foron especificados na sección do método correspondente aos ensaios con MSC. En canto á formulación dos sistemas estudados, as dúas formulacións empregadas foron liposomas de DPPC e liposomas catiónicos con DEX, cuxa síntese foi previamente introducida. É preciso sinalar que en ámbalas dúas sínteses a concentración de DPPC foi 1.8 mM, e en función do DPPC incorporouse a cantidade precisa de gemini e DEX para acordar a relación molar 200/4/100 (DPPC/gemini/DEX). En cada oco na placa de cultivo depositanse 10 μL de mostra de liposomas, engadindo 90 μL de medio de cultivo celular (DMEM).

A figura 7.18 mostra o diagrama de barras en % da viabilidade celular de MSC, comparando entre dous sistemas: liposomas de DPPC e liposomas catiónicos cargados con DEX. Como pode observarse, a viabilidade celular das MSC foi superior ao 80 % en todos os casos. Sendo esperable que a viabilidade celular dos liposomas de DPPC fose adecuada, os resultados mostran que a lixeira incorporación do surfactante gemini, e as cantidades de DEX empregadas, non inflúen negativamente, diminuíndo ou alterando excesivamente a viabilidade celular das MSC.

USC
DE COMPOSTELA

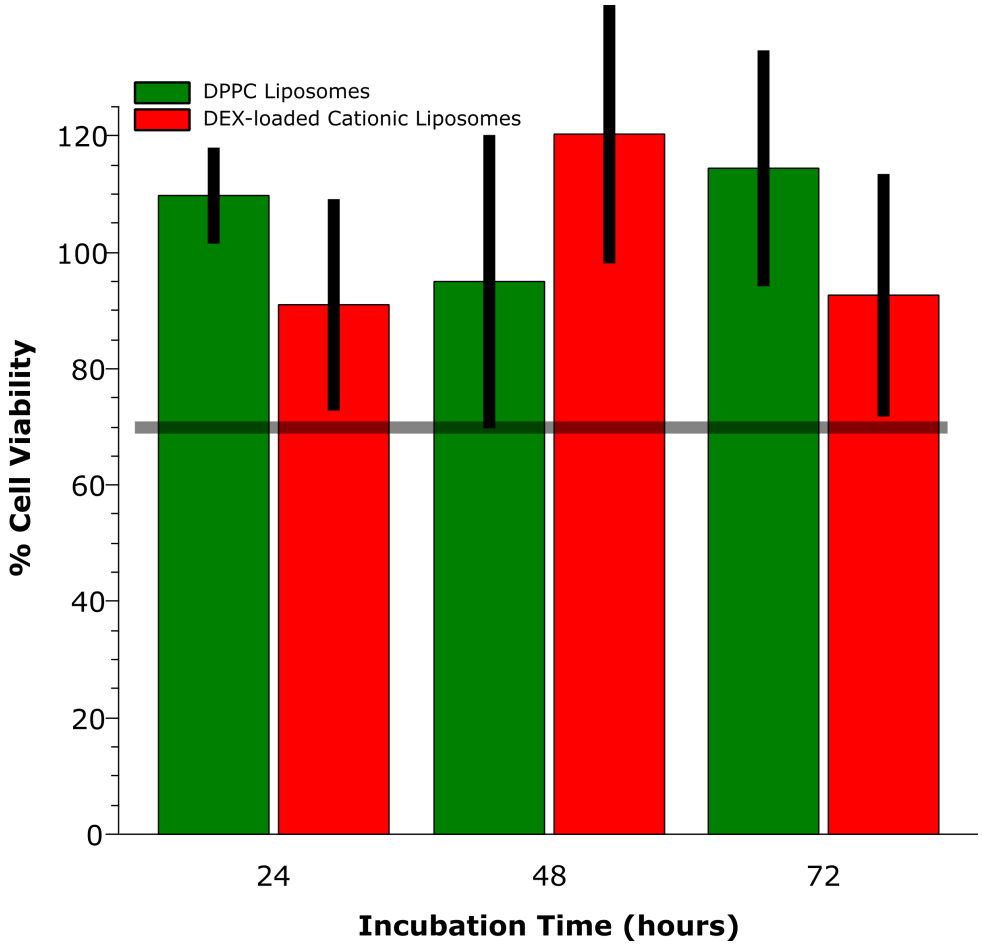

Figura 7.18: Resultados da citotoxicidade dos liposomas catiónicos empregados en cultivos de MSC. Os ensaios foron realizados con incubacións a 24, 48 e 72. Comparouse a citotoxicidade dos liposomas catiónicos cos liposomas *baleiros* de DPPC. As porcentaxes están referidas a un control (véxase metodoloxía de citotoxicidade).

7.3.5 Diferenciación inducida de MSC en osteoblastos

Co fin de avaliar o rol dos liposomas catiónicos cargados con DEX na diferenciación de MSC en osteoblastos, leváronse adiante medidas de cuantificación da actividade da encima fosfatasa (ALP), en cultivos celulares de MSC a diferentes tempos de incubación. A actividade da ALP é considerada un indicador da presenza de osteoblastos[210] e a formación de tecido óseo. O protocolo empregado para a cuantificación da actividade da ALP foi descrito na sección de métodos, e baseouse en metodoloxías reportadas na bibliografía[168].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

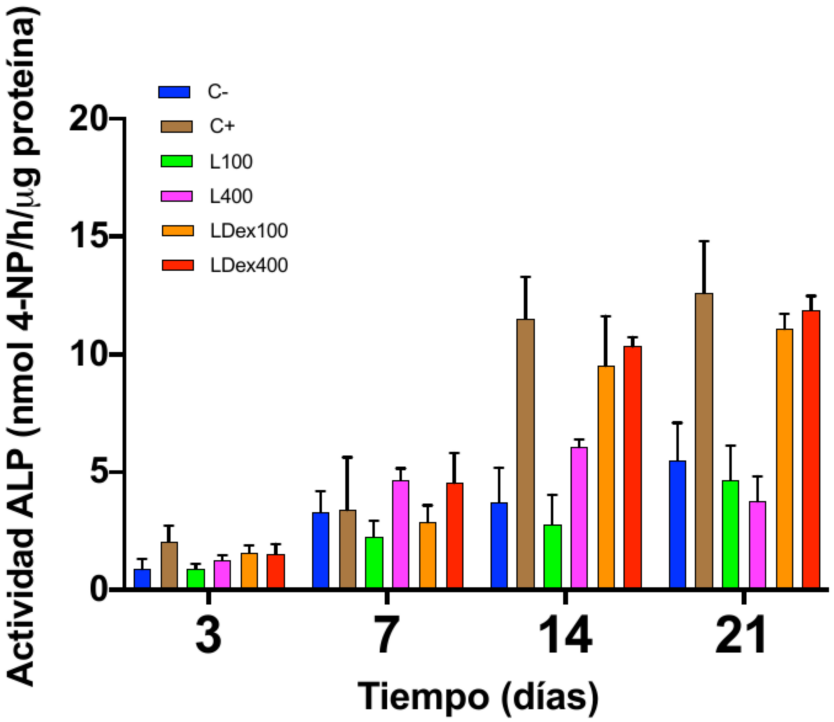

Figura 7.19: Representación dos datos da diferenciación en osteoblastos das MSC. Móstrase a actividade da ALP nun control negativo C^- (incubación de MSC), nun control positivo C^+ (incubación de MSC con 100 nM de DEX), nunha exposición a liposomas catiónicos baleiros L100 e L400, e nunha exposición a liposomas catiónicos cargados con DEX LD100 e LD400 (con 100 e 400 ng/mL de DEX, respectivamente).

A actividade da ALP foi empregada como índice de diferenciación osteoxénica inducida en MSC, tanto pola presenza de liposomas catiónicos *baleiros*, como cargados con DEX. Na figura 7.19 móstrase a produción de ALP, normalizada á concentración de proteínas celulares, durante os tempos de 3, 7, 14 e 21 días de incubación. Empregáronse dúas concentracións de DEX, 100 e 400 ng/mL; deste xeito a notación correspondente a LD100 e LD400, na figura 7.19, fai referencia á titulación de 100 e 400 ng/mL de DEX a partir dunha formulación de liposomas catiónicos con DEX con relación molar 200/4/100 (DPPC/gemini/DEX). A notación L100 e L400 fai referencia á titulación da mesma cantidade de DPPC e gemini que nos respectivos casos anteriores, pero sen DEX. O control negativo C^- asúmese como a diferenciación basal, e non estimulada, de MSC en cultivo durante os tempos empregados. O control positivo C^+ é a incubación das MSC con

mostras de DEX de 100 nM.

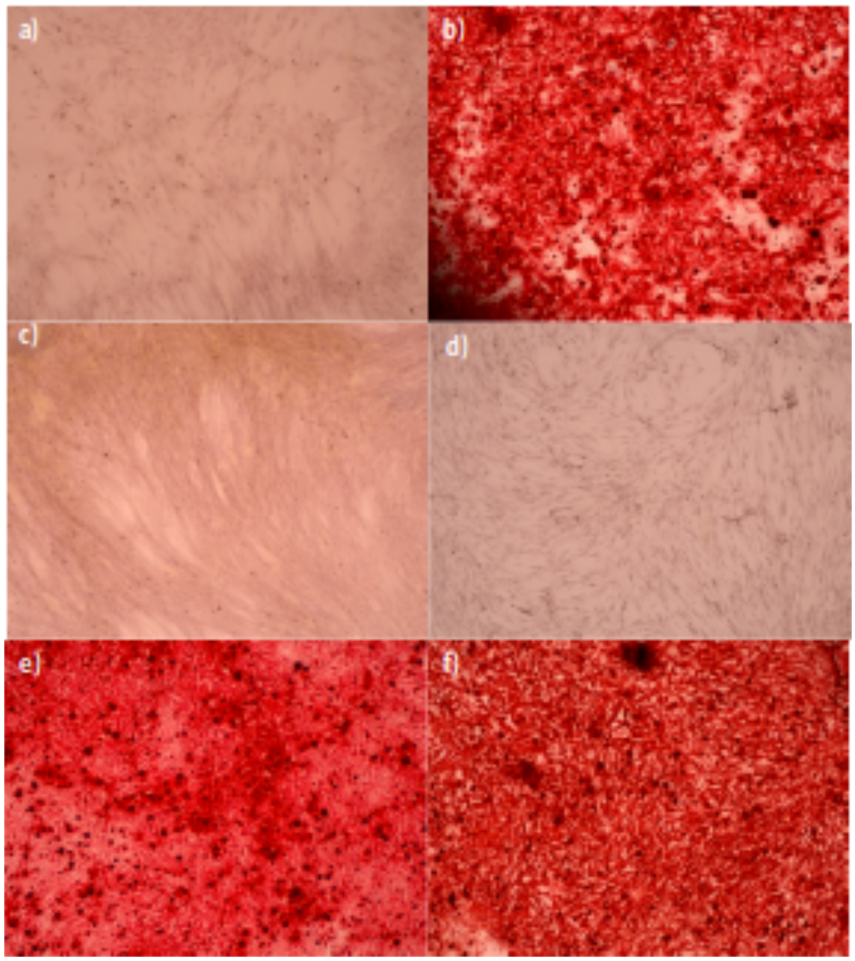

Figura 7.20: Imaxes correspondentes ás incubacións a 28 días para os experimentos de diferenciación da figura 10.14. O color vermello débese ó tinxido con vermello alizarina, e mostra o calcio presente, vinculado ca presencia de osteoblastos. a) C^-, b) C^+, c) L100, d) L400, e) LD100 e f) LD400 (ver figura 10.14).

Na figura 7.19 obsérvase que os valores da actividade encimática nos días 3 e 7 de incubación cos liposomas catiónicos, cargados coa DEX, son similares aos valores obtidos cos liposomas catiónicos *baleiros*, e tamén aos valores de actividade mostrados para o C^+, coa DEX libre. No entanto, a actividade máxima da encima alcánzase nos días 14 e 21 de incubación, nos que se aprecia que os valores de diferenciación inducida polos liposomas catiónicos cargados coa DEX son similares aos dos C^+, e moito maiores que os referidos as mostras con liposomas catiónicos *baleiros*.

USC
DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tamén se realizou a análise do contido de calcio nas células diferenciadas a osteoblastos, seguindo o protocolo que se introduciu na sección dos métodos. Esta cuantificación levouse adiante no día 28 de incubación, e permitiu contrastar os datos obtidos na análise da actividade da ALP. Na figura 7.20 representamos as imaxes do tinxido con vermello alizarina, que permite observar a presenza de depósitos de calcio, relacionados coa diferenciación osteoblástica das MSC. É notable a diferencia entre as incubacións con liposomas catiónicos sen DEX (7.20c,d), e o C^- (7.20a), fronte as incubacións con liposomas catiónicos cargados con DEX (7.20e,f). Tamén se pode intuír unha similitude na actividade diferenciadora entre o C^+ (7.20b) e os liposomas catiónicos con DEX (7.20e,f).

7.4 Conclusións

Como conclusión, desenrolamos e caracterizamos un modelo simplificado que fai mímese das interaccións entre as EVs, células e a ECM. A técnica de LbL permitiunos xerar complexos que formaron un substrato o suficientemente mol para soportar unha adsorción intacta de vesículas (SVL).

Mostrouse que a estrutura e a interacción coas células é unha cuestión intrínseca das EVs. Os compoñentes da ECM simplificada mostraron unha mellora da estabilidade estrutural dos liposomas e implicaron unha internalización celular mediante endocitose. Suxerimos que se alcanzou un maior control sobre a funcionalización a través de explorar cada vez un maior grado de incrustación dos liposomas nos substratos poliméricos.

Os resultados xerais acadados mostraron ser de utilidade como proba de concepto para estudar a afinidade entre as células cancerígenas e o ácido hialurónico. Así mesmo, a versatilidade da técnica LbL permitiu modular a complexación macromolecular dos filmes para incrementar a súa afinidade por un determinado tipo de liñas celulares. Ademais, os modelos propostos mostran unha versatilidade que pode permitir unha maior comprensión da natureza do transporte das EVs na comunicación intercelular, non só na implicación sobre as enfermidades, senón tamén nas súas posibilidades terapéuticas e diagnósticas.

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Partindo da incorporación intacta dos liposomas en sistemas LbL con ácido hialurónico, presentáronse datos da caracterización de sistemas de hidroxeis, baseados en áido hialurónico, nos que se incorporaron liposomas catiónicos. Mostrouse a incorporación dos liposomas catiónicos nos poros do hidroxel, así como a capacidade para transportar principios activos de baixo peso molecular no interior da bicapa lipídica. O fármaco empregado foi a dexametasona, cuxa habilidade para inducir a diferenciación de células mesenquimais en osteoblastos foi empregada para deseñar unha plataforma de potencial aplicación na enxeñaría de tecidos óseos.

Examinouse a citotoxicidade e a eficiencia de diferenciación inducida dos liposomas catiónicos cargados con dexametasona. Atopouse así unha baixa citoxicidade ao longo de 72 horas, e unha boa indución de diferenciación de células mesenquimais en osteoblastos ao longo de 21 días. Deste xeito, preséntase un sistema de potencial aplicación no desenrolo de plataformas de rexeneración de tecidos, con posibilidades de aplicación terapéutica.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

8 Conclusions

To conclude the results of Chapter 1 of Part II, previously reported procedures were followed with slight modifications two new (α,ω-bis(S-alkyl dimethylammonium) alkane bromide gemini surfactants with different spacer lengths were obtained. Their surface activity and micellization thermodynamics were studied using dynamic surface tension and isothermal titration calorimetry measurements.

The equilibrium and kinetic behaviours of the cationic gemini surfactants at the air/water interface was analyzed using the pendant drop technique. The derived experimental data were explained in a new model based on the Frumkin adsorption isotherm and the Ward-Tordai diffusion, which allowed us to describe the surfactant surface-active behaviour at the initial stages of the dynamic adsorption process at the air-water interface in terms of a cooperative adsorption process. In addition, positive values of lateral interactions indicate the high stability of the surfactant monolayer formed at the interface.

ITC demicellization data at different temperatures revealed the coexistence of endothermic and exothermic peaks upon each titration in the micelle breakup regime. A new intuitive method was also developed to analyze the two energetic components of the obtained titration peaks in this regime and determine the extremely low CMC values of these kinds of surfactants, which also showed a strong temperature dependence. This new methodology allows the decoupling of hydration and micelle breakup contributions considering the former as a binding process, which is an improvement over previously developed analysis ITC.

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

In Chapter 2, the interaction of gemini surfactants and a polymeric cationic species

with a lipid bilayer system has been addressed. The ability of gemini surfactants to locate in the lipid bilayer of DPPC has been evaluated.

DSC measurements show that the transition temperature decreases as the gemini content increases, and also that the surfactants with spacer lengths of 12, 14 and 20 reduce more significantly the transition temperature. At the particular 100/1 ratio, the transition temperature decreases gradually for GS4 and GS6 but increases for GS12 to GS20.

The observed phase transition was interpreted in terms of Ising model parameters and explained by molecular dynamics simulations. The increase in width at half heigh points to an inhomogeneous distribution of coupling terms of the Ising model when the gemini surfactants are incorporated into DPPC liposomes.

DPPC/gemini liposomes show a decrease in PDI and size spontaneously, prior to liposome extrusion; which was detected by DLS measurements. More interestingly, Zeta potential data show the cationic character of liposomes upon the addition of the positively charged gemini surfactants.

Molecular dynamics simulations show the localization of gemini within the lipid bilayer, confirming previous conclusions. The localization and position within the lipid bilayer depend on the spacer group length - GS4 and GD6 6 are positioned in a single face of the bilayer, whilst GS12, GS14 and GS20 allocate each one of their polar heads to opposite layers of the membrane.

Increased colloidal stability of DPPC liposomes doped with gemini cationic surfactants was shown; the size of the doped liposomes remained constant over a long period of time.

We combined physicochemical experiments using phospholipidic monolayers and liposomes as cell membrane models with biological experiments observing the transfection of labelled PEI on human cells by confocal microscopy.

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Surface tension experiments studying the penetration of PEI into DMPC monolayer show the ability of PEI polymer to insert into the phospholipid film compressed at a

surface pressure of ≤ 30 mN·m^{-1}, corresponding to the lateral pressure in a phospholipid bilayer.

Fluorescence dye leakage assay combined with differential scanning calorimetry and molecular dynamics simulation suggest that PEI alone can stabilize spontaneous holes or defects and create stable channels in DMPC membranes. These stabilized defects may serve as channels where the DNA is introduced in the interior of the cell nucleus when PEI is used in transfection experiments.

The formation of pores is enhanced as the electrostatic interaction between the cationic PEI and the negatively charged lipidic membranes become stronger. Calorimetry data and surface tension experiments reveal that, besides the electrostatic interaction, hydrophobic forces play an essential role in the interaction of PEI with the membrane. Confocal microscopy photographs confirm that PEI enters the cytoplasm reaches the nuclear membrane but does not enter the nucleus.

By using only DMPC in the mono/bi-layer to mimic nuclear membrane and low molecular weight PEI (1.8 kDa), we have used a simplified model of the interaction to allow us to interpret the applied biophysical techniques at the molecular level in search of the basic mechanism that plays a role in the transfection. In resume, our results support a framework in which PEI can provide channels for DNA to enter the nucleus.

These channels are stabilized by PEI molecules attached to spontaneously formed holes or defects in the nuclear membrane. PEI's tendency to bind to these channels in the nuclear membrane can cause decomplexation of polyplexes that release DNA into the nucleus and prevent PEI from altering host DNA. We hypothesize that this mechanism may play a relevant role with more sophisticated non-viral vectors.

Chapter 3 of Part II showed results to develop and characterize a simplistic model to mimic the interactions between EVs, cells, and the ECM. The LbL technique allowed the assembly of a precursor soft film to support an intact SVL that mimics ECM.

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

We demonstrated that the structure and the interaction with cells are reminiscent of native EVs: the presentation of ECM components enhances the structural stability of

liposomes and drives cellular uptake by endocytosis. We forecast that better control of the internalization rate can be reached over more extended periods by exploring different levels of embedment and liposome surface functionalization.

The proof-of-concept was shown for cancer cells due to their affinity towards HA. However, the versatility of LbL allows modulation of macromolecular building blocks to increase the affinity to cells from different lineages. Therefore, our model opens the door to reach a better understanding of EVs transport phenomena in cell-to-cell communications, not only in the deleterious effects of disease propagation but also in the exploitation of such phenomena for treatment and diagnosis.

Also, the efficient adsorption of the dexamethasone-loaded cationic liposomes on the surface of pores in hyaluronic acid hydrogels was shown. The differences in the retention efficiency were observed by the cumulative release profiles, comparing dialysis results of free loaded cationic liposomes or embedded ones on the hydrogels. The cell viability of the dexamethasone-loaded cationic liposomes was compared with the DPPC liposomes by analysing the results of the cytotoxic experiment with a mesenchymal stem cell line. Finally, the availability of the dexamethasone, loaded on cationic liposomes, to promote the osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells was shown by experiments of incubation during 21 days, compared with the dexamethasone free dispersed.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

9 Final Remarks and Outlook

As presented, under the umbrella of soft matter physics, there are many problems with which nanobiotechnology needs to fight nowadays. We try here prudently to show some relevant results that may assist in promoting solutions to significant challenges.

The dynamic surface tension data of gemini surfactants, and their modelization, allow us to know more detail about the nature of its adsorption in air/water interfaces. Furthermore, the micellization behaviour of those gemini surfactants was characterized by isothermal titration calorimetry, a basic standard in experimental thermodynamic determination.

The adsorption of the gemini surfactants in lipid bilayer systems was probed. More than the embedment of the gemini surfactants in the lipid bilayer, the capability of the polymer polyethylenimine to generate stable channels was shown, as well as its formation dynamics.

Cationic liposomes formulated with a minimal presence of gemini surfactants were used to develop some interesting systems in nanobiotechnology scenarios, among which, these cationic liposomes were used as an extracellular vesicle model. The embedment of the liposomes hypothesized some differences in their role in cell communication in an extracellular matrix model based on hyaluronic acid. Also, the intact incorporation of the liposomes to the polymeric substrates was shown and their ability to load and release molecular cargos.

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Finally, the strategy of the intact immobilization of cationic liposomes on hyaluronic acid polymeric substrates was used to develop a system based on hyaluronic acid hydrogels,

which are used as scaffolds in bone tissue engineering. The cationic liposomes were loaded with dexamethasone, and the low cytotoxicity and cellular differentiation ability were shown with mesenchymal stem cells incubation experiments.

With the final remarks, more than closing a circle, the results presented in this thesis are reasonably directed to reach solutions in soft matter physics, trying to develop efficient nano biosystems. The outlooks/perspectives of the author are aimed, on the one hand, at exploring the nature of molecular interactions, the phenomenology and nature of entropic interactions of hydrophobicity, and on the other, at exploring the possible applications and efficacy of the nanosystems analyzed in this thesis. A possible, more concretes perspective will involve the exploration of the uses and improvements of cationic liposomes, the development of platforms based on extracellular vesicles or the investigation of the integration of bioactive components in basic scaffolds as a strategy in tissue engineering (*i.e.* bone tissue).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

10 Agradecementos

O meu agradecemento especial vai para a *física*, sen ela non entendo a realidade, e con ela todo é dunha cor máis agradable, a ela gustaríame agradecerllo cunhas palabras que recordan a súa posición orixinal en min,

"Yo te he nombrado reina.
Hay más altas que tú, más altas.
Hay más puras que tú, más puras.
Hay más bellas que tú, hay más bellas.
Pero tú eres la reina."

— La Reina - Los versos del capitán -
Pablo Neruda

Foi un camiño moi longo o que me conduce a este momento, complicado ás veces, algo imposible en ocasións, pero demasiado reconfortante. Significa o éxito do esforzo de moitas persoas que me teñen acompañado ao longo de toda esta traxectoria, esforzos aos que quero referir as miñas palabras de agradecemento máis profundo e íntimo.

Non foi doado, non foi sinxelo, pero sempre atopei persoas que me foron entregando un pouco -ou moito- delas, para solventar todas as problemáticas que me foron xurdindo.

Comezo por ter un grato recordo de todas as persoas que me acompañaron durante os meus anos de carreira, a todos os meus compañeiros na Residencia Universitaria do Monte da Condesa e doutros lugares, en especial a Celso, Dani, Aarón, Íñigo, Guillermo, Rubén, Cecilia, Jennifer, Paco, Miguel, Richi, Juan, Edu, Faílde, Héctor, Cousido... e tantos

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

outros moitos máis, a todos, que sabedes quen sodes, confíovos parte da responsabilidade de ter alcanzado esta meta.

Dun xeito moi especial, tanto pola axuda brindada como pola comprensión que tiveron comigo, teño que recordar a todas aquelas persoas que me acompañaron na Facultada de Física, en especial aos meus compañeiros de carreira, cos que tamén compartín Residencia en moitos casos. O meu agradecemento para Conchi, Isa e Pablo, que me esperaron tantas veces para poñerme un *cafeíño*. Aos meus compañeiros do laboratorio da profesora Silvia Barbosa, tantos e tan magníficos, Brenda, Valeria, Lilia, Javi, Álex, Óscar, Alejandro, Alba, Adriana, Xanier, Baltasar, Alberto, Eva...

Tamén aos meus compañeiros no i3Bs, durante os meses das miñas estancias, en especial a Rui, Iva, Ricardo, Rita, Ana, Praveen... que tanto me axudaron e acompañaron, que aínda o siguen facendo...

Agradezo dun xeito moi especial todo o apoio e confianza que diferentes profesores depositaron en min, e nos que nunca faltou unha axuda, explicación, material de investigación ou, incluso, compañía: Alfredo Amigo, Pablo Taboada, Luis García, María del Puerto Morales, Margarida Bastos...

A todas as persoas que forman o grupo de Biofísica, que me acolleron dende o traballo de fin de grao ata agora, en especial ao profesor que me abreu as portas deste laboratorio: Félix Sarmiento. E dun xeito moi especial a un investigador co que teño a sorte de traballar, e que tanto soporte e axuda me brinda: Juan Sabín.

Aínda logo de tanta xente que me prestou axuda, hai persoas que además decidiron compartir gran parte do seu tempo comigo, aprendendo ao meu carón, compartindo amizade e traducindo estos últimos anos en tese doutoral, a Daniel Faílde, ao que tanto teño que agradecer e agradezo.

Toda ruta precisa dunha boa sinalización, e neste camiño da miña tese, tiven a sorte de ter como guía ao profesor Xerardo Prieto, sinxelamente, sin a súa perseverancia, insistencia, compañía, debate, apoio e consello, nada de esto estaría acontecendo. Non podo máis que agradecer todo o que fixestes por min, e o moito que aguantastes de min, por

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

tanto que nos queda por facer, grazas.

Pero todo ten un comezo, e o que son, o que me trouxo a este lugar, é causa, e responsabilidade primixénia, das persoas que decidiron cambiar a súa vida por traerme a este mundo. A vós, meus pais, Vicente e Ramona, que me mostrástedes que ante a adversidade máis dura, non existe outra opción que avanzar, o meu agradecemento eterno.

Á miña irmá, Andrea, que me acompaña na vida dándome o mellor dela, a súa compañía e axuda.

E a ti, que che podo dicir?, a miña compañeira, o meu apoio, sabes ben cal foi o camiño, porque o camiñastes sempre ao meu carón, pasiño a paso, comigo. Tanto que agradecerche, Noelia... Cando dubidei e caín no meu camiño, foi ela quen me levantou.

Por último, aínda non é consciente de nada de esto, pero xa leva un par de anos apoiándome, e facendo posible a miña vida, o meu agradecemento á sempre pequena Nadia.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

11 Lista de figuras

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Índice de figuras

1 Molecular structure of the gemini surfactant from the family 1,α-Bis(tetradecyl trimethyl ammonium) with $\alpha = 4$, which indicates the length of spacer. Basically, two nitrogen ions are linked to four carbons (quaternary ammonium ion). There are two tails and one spacer, both hydrocarbon chains. The counterions (Br^-) are free solvated in water. xxvi

2 Schematic representation of the closed lipidic bilayer forming a section of a liposome. The insert represent a local configuration of the lipids in bilayer configuration. xxix

3 Molecular structure of DPPC, the lipid used to configure the initial lipid bilayer to embed the gemini surfactants. As it can be observed, the N^+ and the O^- form a neutral group which describes a electric dipole: zwitterionic group. xxxii

1.1 Schematic representation of measurement device of dynamic surfacte tension. The real system had implemented a set of gear to align the camera, the source light and the drop. 3

1.2 Geometrical parametrization of a drop profile (s), and the math parameters to propuse the differential equation system (1.1). In the right hand, it can be orbserved an example of image of a typical bubble profile from the software. 4

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3 Schematic representation of the fundamentals of ITC. A typical binding phenomenom is represented by a 1:1 reaction, ligand B in substrate A in equilibrium with a complexed system AB. 7

1.4 Mock representation of a raw data of a ITC experiment titrating B in a sample cell filled with A. Both regimes, reaction and dilution are showed. The right hand of the panel, show the integration of the raw data to represent energy versus ratio [B]/[A]. This way to procedure gives us data to fit and obtain enthalpies of the binding, reaction constants or stoichiometries. 7

1.5 Scheme of DSC apparatus presenting the two typical configuration of Heat-Flux and Power Differential. 9

1.6 Mock enthalpogram of DSC measurement of a example phase transition in a soft matter system. The temperature ramp in scan rate mode and the variation of the heat flux were included, identifying the temperature intervals: T_1 to T_2 is a phase X, T_3 to T_4 is a phase Y and T_2 to T_3 is a transition regime. 10

1.7 Scheme of a typical set of DSC ramps to determine specific heat capacities. Green line describes the heat flow between reference and sample cells. Orange line describes the temperature scan ramps. Each step-like curves in green line determine an area by integration (*i.e.* striped area in third step-like peak). 11

1.8 Scheme of a step-like peaks in a c_P measurement for empty-empty (red line), empty-reference (blue line) and empty-sample (green line). T_j and $T_{i,i+1}$ are labelled according to Eq. 1.5. 13

1.9 Scheme of a dynamic light scattering process to determine the size and polydispersity of a nanoparticle dispersion. 14

1.10 Mock time correlation functions of a small (fast) and big (slow) dispersion of nanoparticles. 14

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.11 Scheme of the simplify routine in a molecular dynamics simulation. $\vec{F}_i$ is the force on the ith atom, and j are the neighbours. The orange lines represent a example of bonds. 17

1.12 Scheme of measurement operation in a Langmuir balance based system. . . 19

1.13 Scheme of measurement fundamentals in a confocal laser scanning microscope. 20

1.14 Scheme of measurement fundamentals in a typical configuration of a spectrofluorometry measurement. 23

1.15 a) Emission spectra at different concentrations of Nile Red in DMSO. b) calibration line of Nile Red in DMSO with data of fluorescence intensity at 620 nm. 24

1.16 Outline of a fundamentals of a quartz crystal microbalance measurement. f_0 is the fundamental frequency of quartz for a thickness h. When a layer of thikness Δh is added a shift in fundamental frequency appears (f_0'). . . 26

2.1 Scheme of rotary evaporator system used to remove the organic phase to generate a thin film of lipid in a glass bulb. The bulb is submerged in a thermal bath at controlled temperature (T). 30

2.2 Scheme of extruder identifying the main parts involved in the extrusion process. 31

2.3 NMR spectra for the differents used gemini surfactants. a) GS4 and b) GS6 34

2.4 NMR spectra for the differents used gemini surfactants. c) GS12, d) GS14 and e) GS20 35

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.1 Esquema das implicacións estruturais na coordinación de moléculas de auga pola presenza de moléculas non polares. a) Representa o posicionamento ordenado de moléculas de auga na contorna dunha molécula non polar, neste caso unha cadea hidrocarbonada. b) Representación do seno de fluído acuoso, constituído unicamente por moléculas de auga, cunha coordinación por pontes de hidróxeno dependente da súa temperatura. 52

5.2 Representamos o esquema dos diferentes estadíos nos que se pode atopar a adsorción de surfactantes nunha superficie de auga. Como se pode apreciar nos tres esquemas, a escala de lonxitude que ocupan os surfactantes é sempre a mesma. a) Represéntase a adsorción de surfactantes nunha superficie acuosa, a baixa densidade de ocupación permite despreciar a interacción entre eles, compórtanse na superficie como un gas ideal. b) Aumenta o número de surfactantes na superfice, e con elo a densidade e a interacción entre as moléculas adsorbidas: temos un estado líquido en superficie. c) Representación da saturación da superficie, xa non é posible adsorber máis material. 53

5.3 Representación de diferentes estruturas de autoensamblaxe de moléculas anfifílicas con grandes cadeas hidrocarbonadas. a) Esquema da forma primixenia de agregación, ou fase liotrópica primitiva: a micela. b) Esquema dunha estrutura complexa, a fase liotrópica lamelar. c) Esquema do autoensamblaxe por emulsión asistida por surfactantes, de fase oleosa e acuosa. 55

5.4 Estrutura molecular dos surfactantes gemini catiónicos empregados. a) Gemini cunha lonxitude de espazador de 4 carbonos e b) de 6 carbonos. En ámbolos dous casos a lonxitude das colas é de 14 carbonos. 57

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.5 Identificación de diferentes partes en datos de titulación isotérmica da micelización a dúas temperaturas diferentes. O rango de dilución de micelas está composto exclusivamente por compoñentes endotérmicas no réxime post-CMC. No réxime anterior aparecen dúas compoñentes nunha das temperaturas. As compoñentes endotérmicas neste réxime son entendidas como a enerxía de ruptura das micelas -*micelle-breakup*- e as compoñentes exotérmicas asócianse á clusterización da auga na contorna das cadeas hidrocarbonadas dos gemini -*dress-water formation*-. Estes dous experimentos de ITC correspóndense a temperaturas de 5 e 25 °C. 58

5.6 Datos determinados coa integración das compoñentes exotérmicas das titulacións do réxime pre-CMC a 25 °C para o gemini 14-4-14 (triángulos) e 14-6-14 (círculos). No eixo X represéntase o ratio de concentracións de gemini [GS] e de *caixas* [DW]. As curvas de axuste resultan de aplicar un modelo de ocupación de ocos indistinguibles. Os datos de entalpía e parámetros de axuste para as restantes temperaturas son mostrados na táboa 5.1 61

5.7 Representación das variacións de entalpía, entropía e enerxía libre no proceso de micelización. ΔH_{mic} foi estimada mediante o promedio da integración dos cinco primeiros picos nos que apareceron compoñentes endotérmicas e exotérmicas. 65

5.8 Representación das áreas por titulación empregadas para o cálculo das compoñentes enerxéticas da figura 5.7. 66

5.9 Compensación entalpía-entropía a diferentes temperaturas. O axuste lineal foi realizado empregando a Ec. 5.7. 67

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.10 Representación esquemática do sistema no que se vai expoñer a difusión e adsorción. Obsérvanse as tres zonas relevantes na parametrización do modelo: o *Bulk*, a *SubSurface* e a *Adsorption Surface*. A adsorción dende a subsuperficie asúmese instantánea. O círculos vermellos representan os nitróxenos dos gemini, mentres que os círculos verdes representan os contraións de bromo. 70

5.11 Representación dos datos experimentais e o axuste ao modelo implemntado para diferentes concentracións pre-micelares do gemini 14-4-14. No cadro insertado (*inset*) pódese apreciar o axuste aos valores da tensión supercial de equilibrio, cos resultados seguintes: $\gamma_{eq} = 20{,}19 - 25{,}20 \log(c_b)$ (unidades do sistema internacional). 74

5.12 Representación dos datos experimentais e o axuste ao modelo implementado para diferentes concentracións pre-micelares do gemini 14-6-14. No cadro insertado (*inset*) pódese apreciar o axuste aos valores da tensión superficial de equilibrio, cos resultados seguintes: $\gamma_{eq} = 24{,}06 - 22{,}46 \log(c_b)$ (unidades do sistema internacional). 75

5.13 Representación de catro curvas de tensión superficial dinámica 0.030 e 0.050 mM para 14-4-14 (círculos) e 14-6-14 (triángulos). No inset apréciase a inflexión inicial froito dunha resposta non ideal da isoterma de adsorción. . 77

5.14 Representación da variación da concentración na subsuperficie a medida que acontece a adsorción na interfase, para diferentes concentracións de surfactante gemini no *bulk*. 78

6.1 Representación esquemática dunha célula, e as súas partes principais. Apréciase tamén a configuración lamelar da membrana celular. 83

6.2 Esquema de diferentes formulacións de fases lamelares. Bicapa lipídica homoxénea e con mestura de lípidos. Conformación lamelar de surfactantes non iónicos: *niosoma* e sistemas de bicapa lipídica dopados con surfactantes catiónicos: *transferosomas*. 84

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.3 Esquema da evolución do estudo da interacción dos surfactantes catiónicos gemini que se están a empregar. Analizouse, na sección anterior, a variación da tensión superficial dinámica por tensiometría de gota pendente, e a súa micelización por calorimetría de titulación isotérmica. Neste capítulo a finalidade é analizar a súa interacción en bicapas lipídicas. 86

6.4 Esquema que presenta a estrutura molecular do PEI e a formación do poro nunha membrana lipídica. 87

6.5 Representación esquemática dos isómeros do butano observando os diferentes diedros formados na súa cadea. Establécese a relación coas fases xel e cristal-líquido nunha bicapa lipídica 88

6.6 Representación da estrutura molecular do DPPC, identificando os átomos de carbono segundo serán empregados para a análise de traxectorias de dinámica molecular: rexión a* identifica os diedros do interior das colas do DPPC, a rexión b* os diedros dos extremos das colas. Tamén se presentan as estructuras moleculares dos surfactantes gemini empregados: b) GS4, c) GS6, d) GS12, e) GS14 e f) GS20. Representación da estrutura xeral dun surctante gemini: *tail* (colas) e *spacer* (espazador). 90

6.7 Entalpogramas de DSC para os liposomas de DPPC/gemini a diferentes concentracións de surfactante e con diferentes longuras de espazador. Cada color corresponde a un ratio DPPC/gemini diferente, dende 1000/1 a 30/1. O diferentes conxuntos mostrados son para os diferentes sistemas estudados: a) DPPC/gemini 4 (14-4-14), b) DPPC/gemini 6 (14-6-14), c) DPPC/gemini 12 (14-12-14), d) DPPC/gemini 14 (14-14-14) e e) DPPC/gemini 20 (14-20-14). 92

6.8 Representación das temperaturas de transición *xel* a *cristal-líquido* para os sistemas liposómicos baseados en DPPC dopados con surfactante gemini. Represéntanse os valores dos máximos dos sinais de transición das figuras 6.7 93

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.9 Representación das anchuras a metade de pico das transicións *xel* a *cristal-líquido* para os sistemas liposómicos baseados en DPPC dopados con surfactante gemini. Represéntanse os valores de amplitude dos sinais de transición das figuras 6.7 94

6.10 a) Esquema da representación dunha transición debida a un sistema homoxéneo gobernado cun factor único de acoplamento J. b) Esquema da convolución de diferentes transicións nun sistema con heteroxeneidades, gobernada a súa transición por diferentes valores de J_1, J_2, J_3, ... 95

6.11 Variación da entalpía das transicións para os sistemas DPPC/gemini fronte á concentración relativa de surfactante en relación á cantidade de DPPC, para as diferentes longuras de espazador. A figura insertada mostra os valores medios e a desviación estándar dos valores da entalpía para canda unha das longuras de espaciador. 96

6.12 a) Representacións dos cambios na temperatura de transición para os sistemas DPPC/gemini con ratio 100/1 para as diferentes longuras de espazador. Tamén se representa a enerxía de interacción Coulomb e Lennard-Jones determinada con simulación de dinámica molecular para b) DPPC-DPPC e c) DPPC-moléculas de auga. 97

6.13 Representación de *snapshots* de simulación de dinámica molecular a 20 °C para os sistemas DPPC e DPPC/gemini con diferentes longuras de espazador, para un ratio 128/1. As imaxes da dereita en cada unha das representacións mostra a conformación das cadeas hidrocarbonadas do DPPC, e as imaxes da esquerda mostran a parte interna da bicapa lipídica, resaltando a representación polar dos lípidos e cada un dos surfactantes gemini, co fin de apreciar a súa colocación específica. a) DPPC, b) DPPC/gemini 4, c) DPPC/gemini 6, d) DPPC/gemini 12, e) DPPC/gemini 14 e f) DPPC/gemini 20. 98

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.14 Representación do potencial transmembrana (liñas negras), dos perfís de densidade dos N^+ dos DPPC (liñas azuis) e dos N^+ dos surfactantes gemini (liñas laranxa). As representacións coloradas mostran un esquema simplificado da bicapa lipídica ao largo do eixo Z, as N negras mostran a colocación dos surfactantes de espazador longo. Tanto os potenciais eléctricos como os perfís de densidade foron construídos co promedio nos últimos 50 ns das traxectorias de simulación. 100

6.15 Representacións das funcións de distribución radial (RDF) e o potencial de parellas de campo medio para o carbono C29 do DPPC (véxase a figura 6.6). As RDF foron computadas empregando os datos dos últimos 50 ns das traxectorias de simulación de dinámica molecular. As enerxías potenciais calcúlanse relacionando o potencial de parellas ($w^{(2)}$) e a RDF ($g(r)$): $w^{(2)}(r) = -k_B T \log g(r)$ 101

6.16 Diagrama vectorial representando a os ángulos de inclinación promedio das cadeas hidrocarbonadas dos lípidos en cada unha das follas da bicapa. O ángulo entre o vector superior e o inferior está calculado promediando os valore dos últimos 50 ns das traxectorias das simulacións. O eixo vertical non corresponde á compoñente normal á bicapa, os vectores foron rotados para mostrar unha representación menos sesgada pola dirección, pero mantendo o ángulo entre eles. 102

6.17 Representación vectorial dos valores medios dos ángulos formados polas cadeas hidrocarbonadas dos DPPC coa dirección normal á bicapa. 103

6.18 Representación esquemática do criterio empregado para identificar isómeros *trans*, *gauche*, *eclipsed* ou *cys* cando se computaron os valores dos diedros nas simulacións de dinámica molecular. 105

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.19 Valores promedios dos ángulos do vector P-N con referencia á normal á bicapa lipídica. Os cálculos foron computados empregando os 50 ns últimos das traxectorias de simulación para todos os DPPC de cada cela. A temperatura seleccionada para o cálculo foi a de 20 °C, debido a que as medidas DLS foron tomadas a temperaturas próximas a esta. 108

6.20 Perfís da intensidade colectada por DLS en función dos tamaños hidrodinámicos para os sistemas DPPC/gemini. Nótese que, con carácter importante, estes resultados están tomados en mostras a 100/1 e antes de calquera proceso de extrusión. 110

6.21 Perfís da intensidade colectada por DLS en función dos tamaños hidrodinámicos para os sistemas DPPC/gemini. Nótese que, con carácter importante, estes resultados están tomados en mostras a 100/1 e despois do proceso de extrusión. Suxírese unha comparación visual coa figura 6.20. 111

6.22 Valores para o potencial ζ dos sistemas DPPC/gemini para concentracións 100/1. No eixo X: 1-DPPC, 2-DPPC/GS4, 3-DPPC/GS6, 4-DPPC/GS12, 5-DPPC/GS14 e 6-DPPC/GS20 112

6.23 Exemplo da estabilidade coloidal dunha dispersión de liposomas DPPC/gemini de espazador 4, á concentración relativa 100/1 durante 225h. A comparativa realízase fronte a datos de estabilidade de liposomas de DPPC. 113

6.24 Imaxes de microscopía confocal da internalización do PEI en células HeLa despois de 6 horas de incubación. O PEI está resaltado en color verde, o citoplasma en vermello e o núcleo celular en azul. Os eixos de representación vertical e horizontal mostran o relevo en 3D das imaxes. As frechas sinalan as células que presentan unha acumulación notable de PEI na contorna do seu núcleo. 114

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.25 Representación dos datos de balanza de Langmuir referente á penetración do PEI en monocapas de DMPC. Móstranse resultados da variación da presión superficial no tempo para concentración de DMPC fixas e concentración variables de PEI. a) PEI/DMPC= 15 (círculo ∘ $\pi_0 = 0$ mN·m^{-1}, cadrado □ $\pi_0 = 20$ mN·m^{-1}, triángulo *up* △ $\pi_0 = 30$ mN·m^{-1}), triángulo *down* ▽ $\pi_0 = 35$ mN·m^{-1} e estrela ⋆ $\pi_0 = 40$ mN·m^{-1}). b) para concentración variables a $\pi_0 = 20$ mN·m^{-1} (círculo ∘ PEI/DMCP = 15, cadrado □ PEI/DMCP = 1,5, triángulo *up* △ PEI/DMCP = 0,15, triángulo *down* ▽ PEI/DMCP = $1{,}5 \times 10^{-3}$ e estrela ⋆ PEI/DMCP = $1{,}5 \times 10^{-5}$). 115

6.26 a) Intensidade de fluorescencia rexistrada nunha dispersión de liposomas de DMPC encapsulando 50 mM de carboxifluoresceína, en presencia de 150 mM de NaCl e 10 mM de HEPES, para diferentes concentración de PEI: ▽ 0.27 mM, △ 0.54 mM, □ 0.67 mM e ∘ 0.81 mM. b) Porcentaxe de carboxifluoresceína liberada dende liposomas de DMPC en función da relación molar PEI/DMPC para experimentos en ausencia de sal (□) e en presencia de 150 NaCl (∘). 118

6.27 Medidas de microcalorimetría diferencial de varrido (DSC) para liposomas de DMPC: a) mostra os entalpogramas para 15 consecutivos DSC de 1 mM de liposomas de DMPC en presencia de 5 mM de PEI e 10 mM de HEPES. Algúns dos entalpogramas foron omitidos para mostrar unha mellor claridade da progresión do desprazamento do sinal (dereita a esquerda). b) Móstrase a temperatura de transición □ fronte o número do DSC, mentres que tamén se representa a variación da anchura da transición ∘ co número de DSC. 119

6.28 Representación despois de 70 ns de simulación da dinámica molecular dunha bicapa lipídica solvatada (a) e cos lípidos illados (b). 121

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.29 Funcións de distribución radial (RDF) entre as cadeas hidrocarbonadas do lípidos, tendo en consideración para o cómputo aqueles que formaban parte da fase lamelar. a) mostra a correlación radial a 15 °C e b) a 30 °C. 122

6.30 a) mostra o número de enlaces por ponte de hidróxeno entre o PEI e as moléculas de auga durante o tempo de simulación. b) mostras as enerxías de interacción entre o PEI e o DMPC, así como a interacción entre o PEI e as moléculas de auga, tanto a 15 °C (negro e vermello) como a 30 °C (verde e azul). 123

6.31 Perfís de densidade na dirección transversal á bicapa lipídica para os ións de cloro (Cl) e fósforo (P), tamén PEI e moléculas de auga a 15 °C (a) e 30 °C (b). Os subplots mostran a densidade total da auga para confirmar os valores de equilibrio nas contornas da celda. 124

7.1 Representación da composición e formación xeral das vesículas extracelulares (EVs). Obsérvase a súa formación como separación dunha protuberancia na membrana plamática ou como liberación de contido de sistemas multivesiculares do interior do citosol, pola fusión destes coa membrana celular. Na membrana lipídica das EVs atopamos proteínas específicas das células que as xeraron. No interior das EVs atopamos secuencias de nucleótidos de ARN *micro* e *mensaxeiro*. 130

7.2 Representación das estratexias de adsorción dos liposomas catiónicos. a) A adsorción sobre un substrato de ouro implica unha interacción electrostática tan forte cos liposomas que se xera unha bicapa lipídica soportada no ouro, deste xeito o núcleo acuoso dos liposomas é liberado ao medio. b) A cobertura do substrato de ouro con especies poliméricas mediante o crecemento *Layer-by-Layer* configura un sistema o suficientemente mol para a adsorción intacta dos liposomas catiónicos. 131

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7.3 Representación dos dous sistemas miméticos da interacción das EVs coa ECM. a) Liposomas catiónicos adsorbidos de xeito intacto sobre unha superficie de polielectrolitos LbL. b) Liposomas catiónicos soterrados nun crecemento polielectrolítico en LbL. 132

7.4 Esquema que mostra a estratexia a seguir, baseada na inmobilización dos liposomas catiónicos nas cavidades que ten o hidroxel. 134

7.5 Esquema simplificado das experiencias de diferenciación. Os liposomas catiónicos cargados coa DEX serán analizados para cuantificar a súa capacidade para inducir a diferenciación nas MSC dun xeito eficiente. 135

7.6 a) Perfís de intensidade de DLS para liposomas catiónicos con e sen Nile Red, en ámbalas medidas o medio dispersivo foi unha solución de 150 mM de NaCl a 25 °C. b) Móstranse os entalpogramas para a transición *xel* a *cristal-líquido* para liposomas catiónicos con Nile Red e para liposomas de DPPC. c) *Snapshot* de simulación de dinámica molecular da bicapa lipídica dos liposomas catiónicos empregados, observando a localización interna do Nile Red. d) Perfís da densidade, en dirección transversal á bicapa lipídica, para as moléculas de auga (azul), os átomos P do DPPC (verde) e os centros de masas das moléculas de Nile Red (vermello). 138

7.7 Resultados dos experimentos de QCM-D realizados onde se representa Δf e ΔD. Pódese observar a formación de bicapas lipídicas soportadas sobre os substratos de ouro. O mínimo na frecuencia Δf -e o máximo na disipación (ΔD)- mostran a liberación da auga interior dos liposomas, froito da forte interacción electrostática entre as bicapas lipídicas e o substrato de ouro. . 141

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7.8 a) Representación dos datos QCM-D para a variación da frecuencia e da disipación ó longo da configuración dun substrato mol $(PLL/HA)_3$ -rexión I-, adsorción dos liposomas catiónicos con Nile Red -rexión II- e unha cobertura ulterior de HA/PLL/HA -rexión III-. b) Masa acumulada depositada segundo o modelo de aplicación aos datos da QCM-D. c) Viscosidade (η) e módulo elástico (μ) acumulados estimados. O modelo de viscoelasticidade de Voight foi o empregado para o cálculo da masa, viscosidade e módulo elástico. 143

7.9 Representación dos perfís de liberación acumulada de Nile Red, dende liposomas adsorbidos e expostos, e dende liposomas soterrados en substratos poliméricos. A liña azul mostra o perfil de liberación do Nile Red no sistema formados polos liposomas adsorbidos e expostos. A liña laranxa mostra o perfil de liberación do sistema formados polos lipomas incrustados. A subfigura (*inset*) mostra a representación das liberación en representación logarítmica da porcentaxe de liberación acumulada fronte o tempo. 145

7.10 Representación dos perfís de liberación axustados a diferentes modelos: a) orde cero, b) primeiro orde, c) Hixson-Crowell e d) Higuchi. En modelos de liberación de orde cero, a liberación acumulada varía linealmente co tempo. En modelos de primeiro orde, o logaritmo da cantidade de material non liberado varía linealmente co tempo. No modelo de Hixson-Crowell, a raíz cúbica da cantidade de material non liberado é restada á raíz cúbica da cantidade total de material a liberal, e o resultado represéntase en función do tempo. No modelo difusivo de Higuchi a liberación acumulada represéntase como función da raíz cadrada do tempo. 147

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7.11 Imaxes de microscopía confocal de internalización por incubación, a diferentes horas, de liposomas catiónicos cargados con Nile Red. A-C) imaxes da incubación de MDA-MB-231 para o control. D-F) células en contacto cunha dispersión de liposomas catiónicos cargados con Nile Red. G-I) células depositadas en substratos poliméricos $(PLL/HA)_3$ cunha capa de liposomas catiónicos cargados con Nile Red. J-L) células depositadas sobre un substrato HA/PLL/HA que soterra ao sistema anterior. As coloracións das imaxes son referidas aos máximos de emisión de fluorescencia do Nile Red (vermello en A1-L2), WGA (verde en A1-L1) de DAPI (azul en A2-L2). As frechas indican a localización do Nile Red e do WGA. A escala empregada foi de 50 μm. 149

7.12 Perfís da distribución por intensidade de fluorescencia do Nile Red en células depositadas sobre superficies con liposomas expostos (A-I) e soterrados (J-R). As liñas amarelas representan os perfís para a cuantificación da intensidade vermella. A distribución de Nile Red é *suave*, sen picos abruptos, en células depositadas sobre substratos con liposomas expostos (C,F e I), o que indica que o Nile Red podería estar a difundir dende os liposomas ata as células. Os perfís de intensidade vermella das células depositadas sobre substratos con liposomas soterrados (L, O e R) mostran picos abruptos, suxerindo a endocitose dos liposomas como fenómeno de internalización. A escala empregada foi de 20 μm. 151

7.13 a) Representación da intensidade de DLS para unha mostra de liposomas catiónicos cargados con DEX. A relación molar empregada foi 200/4/100 (DPPC/gemini/DEX). b) Representación do potencial ζ para os liposomas anteriores. 153

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7.14 Representación dos entalpogramas de DSC para os liposomas catiónicos cargados con DEX en dispersión libre en PBS (curva vermella) e adsorbidos nas superficies porosas dos hidroxeis de HA (curva verde). É preciso notar que na medida dos liposomas libres a referencia foi *buffer* PBS, mentres que na medida dos liposomas adheridos ó hidroxel a referencia foi un hidroxel *baleiro* das mesmas características que o *cargado* cos liposomas. 155

7.15 Imaxes de microscopía confocal de dúas seccións de hidroxeis *cargados* con liposomas catiónicos con Nile Red. A escala mostra a orde de magnitude dos poros do hidroxel nas características que empregamos, e a cor vermella nos ocos corresponde coa presenza do Nile Red. É preciso comentar que o feito de apreciar a fluorescencia do Nile Red indica que debe estar encapsulado nunha contorna lipídica ou apolar. 157

7.16 Representación esquemática dos experimentos de liberación con liposomas catiónicos cargados con DEX en dispersión libre, e adsorbidos nos hidroxeis. Os experimentos de diálise foron feitos a 37 °C e en condicións de axitación. As mostras que determinan o perfil foron tomadas no tempo correspondente do exterior da bolsa de diálise. 158

7.17 Representación dos perfís de liberación acumulativa correspondente aos experimentos de diálise do esquema da figura 10.11. 160

7.18 Resultados da citotoxicidade dos liposomas catiónicos empregados en cultivos de MSC. Os ensaios foron realizados con incubacións a 24, 48 e 72. Comparouse a citotoxicidade dos liposomas catiónicos cos liposomas *baleiros* de DPPC. As porcentaxes están referidas a un control (véxase metodoloxía de citotoxicidade). 161

USC DE COMPOSTELA

7.19 Representación dos datos da diferenciación en osteoblastos das MSC. Móstrase a actividade da ALP nun control negativo C^- (incubación de MSC), nun control positivo C^+ (incubación de MSC con 100 nM de DEX), nunha exposición a liposomas catiónicos baleiros L100 e L400, e nunha exposición a liposomas catiónicos cargados con DEX LD100 e LD400 (con 100 e 400 ng/mL de DEX, respectivamente). 163

7.20 Imaxes correspondentes ás incubacións a 28 días para os experimentos de diferenciación da figura 10.14. O color vermello débese ó tinxido con vermello alizarina, e mostra o calcio presente, vinculado ca presencia de osteoblastos. a) C^-, b) C^+, c) L100, d) L400, e) LD100 e f) LD400 (ver figura 10.14). 164

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

12 Índice alfabético

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Índice alfabético

ácido hialurónico, 140

actividade da ALP, 162
autoensamblaxe, 54
axisymmetric drop shape analysis (ADSA), 5

balanza de Langmuir, 115
bicapa lipídica, 88
binding affinity, 6

células mesenquimais, 135
carboxifluoresceína, 118
citotoxicidade, 84
compostos DPPC/gemini, 94
concentración micelar crítica, 56
curation, 33
cytotoxicity, 39

Dexametasona, 152
diedros, 89, 103
diferenciación osteoxénica, 162
differential scanning calorimetry (DSC), 9
Dynamic light scattering (DLS), 13

enthalpy changes, 6
extrusion, 31

factor de diferenciación, 129
fase lamelar, 81
fluorescence, 22
Frumkin, 76

grado de acoplamento, 95

Henry's function, 16
hidroxeis, 134, 154, 156
High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), 25
Hill-Langmuir, 62, 72

interacción hidrofóbica, 50
isomerización, 89
isothermal titration calorimetry (ITC), 6

Jasco FP 8500, 24

Langmuir balance, 18
layer-by-layer, 141
liberación controlada, 129

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

liposoma, 82
liposomas catiónicos, 137, 142, 154

matriz extracelular, 142
MDA-MB-231, 148
membrana nuclear, 114
methacryloylation, 32
micela, 55
Micro DSC-III, 10
microbalanza de cristal de cuarzo, 139
Microcal VP-DSC, 10
Microcal VP-ITC, 8
microscopy confocal fluorescence, 19
modelo de Ising, 90
moléculas anfifílicas, 51
molecular dynamics computation, 17
molecular interactions, 6
monocapas lipídicas, 115
monolayer, 18

Nile Red, 22, 136, 144
NIMA 601 (Coventry), 19
niosomas, 85

pendant drop, 3
phase transition, 10
polietilenimina, 85, 113
polilisina, 140
polydispersity, 15
post-CMC, 58
potencial eléctrico transmembrana, 99
pre-CMC, 59

quartz crystal microbalance, 25
quenching, 24

Sauerbrey equation, 25
Smoluchowski's model, 15
sonication, 29
Stokes-Einstein equation, 15

TCS-SP8 (Leica Microsystems), 20
transferosomas, 85

vesículas extracelulares, 129, 148

Ward-Tordai, 71

Zetasizer Nano ZS, 15

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

13 List of Publications and Permissions

In this appendix I include a detailed description of the articles I have authored. All the Journals in which they have been published allow the authors to reproduce their content in dissertations. Moreover, all the coauthors have given their consent to used the articles in this thesis.

Micellization Thermodynamic Behaviour of Gemini Cationic Surfactants. Modeling its adsorption at air/water interface, *Journal of Molecular Liquids* **308** 113100 (2020)

Authors
Vicente Domínguez-Arca[*a], Juan Sabín[a], Pablo Taboada[b], Luís García-Río[c] and Gerardo Prieto[*a]

[a] Grupo de Biofísica e Interfases, Departamento de Física Aplicada, Facultade de Física, Universidade de Santiago de Compostela, E-15782 Campus Sur s/n, Santiago de Compostela, Spain.
[b] Grupo Física de Coloides y Polímeros, Departamento de Física de Partículas, Facultade de Física, Universidade de Santiago de Compostela, E-15782 Campus Sur s/n, Santiago de Compostela, Spain.
[c] Centro Singular de Investigación en Química Biolóxica e Materiais Moleculares (CiQUS), Departamento de Química Física, Universidade de Santiago de Compostela, E-15782 Campus Sur s/n, Santiago de Compostela, Spain.

PhD student contribution: First and corresponding author. Conceptualization, Investigation, Methodology, Formal Analysis, Writing Original Draft, Writing, Review and Editing.

Journal information
Journal Name: Journal of Molecular Liquids **Publisher:** Elsevier
ISSN: 0167-7322 **DOI:** https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113100
Impact factor in 2020-2021: 6.165 **Quartile in Atomic and Molecular Physics and Optics:** Q1
Reproduced in this thesis with standard author permissions from Elsevier **Part:** 2, **Chapter:** 1

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Liposomes embedded in layer by layer constructs as simplistic extracellular vesicles transfer model, *Materials Science and Engineering: C* **121** 111813 (2021)

Authors

Vicente Domínguez-Arca[a,b,c], Rui R.Costa[b,c], Ana M. Carvalho[b,c], Pablo Taboada[d,] Rui L. Reis[b,c], Gerardo Prieto[*a] and Iva Pashkuleva[*,b,c]

[a] Grupo de Biofísica e Interfases, Departamento de Física Aplicada, Facultade de Física, Universidade de Santiago de Compostela, E-15782 Campus Sur s/n, Santiago de Compostela, Spain.

[b] 3B's Research Group, I3Bs – Research Institute on Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics, University of Minho, Headquarters of the European Institute of Excellence on Tissue Engineering and Regenerative Medicine, AvePark, Parque de Ciência e Tecnologia, Zona Industrial da Gandra, 4805-017 Barco, Guimarães, Portugal

[c] ICVS/3B's, PT Government Associated Laboratory, Braga, Guimarães, Portugal

[d] Grupo Física de Coloides y Polímeros, Departamento de Física de Partículas, Facultade de Física, Universidade de Santiago de Compostela, E-15782 Campus Sur s/n, Santiago de Compostela, Spain.

PhD student contribution: First author. Conceptualization; Methodology; Validation; Formal Analysis; Investigation; Writing - Original Draft and Review & Editing; Visualization

Journal information

Journal Name: Materials Science and Engineering: C **Publisher:** Elsevier
ISSN: 0928-4931 **DOI:** https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111813
Impact factor in 2020-2021: 7.328 **Quartile in Condensed Matter Physics:** Q1
Reproduced in this thesis with standard author permissions from Elsevier **Part:** 2, **Chapter:** 3

New insights on the mechanism of polyethylenimine transfection and their implications on gene therapy and DNA vaccines, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **210** 112219 (2022)

Authors

Juan Sabin[*,a,b], Manuel Alatorre-Meda[c], Jose Miñones Jr.[d], Vicente Domínguez-Arca[*,a] and Gerardo Prieto [a].

[a] Grupo de Biofísica e Interfases, Departamento de Física Aplicada, Facultade de Física, Universidade de Santiago de Compostela, E-15782 Campus Sur s/n, Santiago de Compostela, Spain.

[b] AFFINImeter-Software 4 Science Developments S.L. Edificio Emprendia s/n Campus Vida, Santiago de Compostela, Spain.

[c] Cátedras CONACyT-Tecnológico Nacional de México/I. T. Tijuana, Centro de Graduados e Investigación en Química-Grupo de Biomateriales y Nanomedicina, Blvd. Alberto Limón Padilla S/N, 22510 Tijuana, BC, Mexico.

[d] Department of Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy Universidade de Santiago de Compostela, Spain.

PhD student contribution: Conceptualization, Molecular Dynamic Simulation Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft.

Journal information

Journal Name: Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **Publisher:** Elsevier
ISSN: 0927-7765 **DOI:** https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112219
Impact factor in 2020-2021: 5.268 **Quartile in Biotechnology:** Q1
Reproduced in this thesis with standard author permissions from Elsevier **Part:** 2, **Chapter:** 2

On the structure and stability os novel cationic DPPC liposomes doped with gemini surfactants

Authors
Vicente Domínguez-Arca[*a], Juan Sabín[a,b], Luís García-Río[c], Margarida Bastos[d], Pablo Taboada[e,f], Silvia Barbosa[e,f] and Gerardo Prieto[*a,f]

[a] Grupo de Biofísica e Interfases, Departamento de Física Aplicada, Facultade de Física, Universidade de Santiago de Compostela, E-15782 Campus Sur s/n, Santiago de Compostela, Spain.
[b] AFFINImeter-Software 4 Science Developments S.L. Edificio Emprendia s/n Campus Vida, Santiago de Compostela, Spain.
[c] Departamento de Química Física, Facultad de Química, Universidad de Santiago, 15782 Santiago, Spain.
[d] CIQ-UP, Institute of Molecular Sciences (IMS), Departamento de Química e Bioquímica, Facultade de Ciências da Universidade do Porto, R. Campo Alegre 687, P-4169-007, Porto, Portugal
[e] Grupo de Física de Coloides y Polímeros, Departamento de Física de Partículas; Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain.
[f] Instituto de Materiales, Universidad de Santiago de Compostela, E-15782 Santiago de Compostela, Spain.

PhD student contribution: First and corresponding author. Conceptualization, Investigation, Methodology, Formal Analysis, Writing Original Draft, Writing, Review and Editing.

Journal information

Submitted

Part: 2, **Chapter:** 2

Dexamethasone-loaded cationic liposomes adsorbed on hyaluronic hydrogel porous surfaces. An approach to MSC differentiation platform.

Authors
Vicente Domínguez-Arca[*a], Brenda Velasco[b,c], Javier Fernández-Vega[c], Pablo Taboada[c,d], Silvia Barbosa[c,d] and Gerardo Prieto[*a,d]

[a] Grupo de Biofísica e Interfases, Departamento de Física Aplicada, Facultade de Física, Universidade de Santiago de Compostela, E-15782 Campus Sur s/n, Santiago de Compostela, Spain.
[b] Department of Chemical Engineering, CUCEI, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Mexico.
[c] Grupo Física de Coloides y Polímeros, Departamento de Física de Partículas, Facultade de Física, Universidade de Santiago de Compostela, E-15782 Campus Sur s/n, Santiago de Compostela, Spain.
[d] Instituto de Materiales, Universidad de Santiago de Compostela, E-15782 Santiago de Compostela, Spain

PhD student contribution: First and corresponding author. Conceptualization, Investigation, Methodology, Formal Analysis, Writing Original Draft, Writing, Review and Editing.

Journal information

In progress

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Part: 2, **Chapter:** 3

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

14 Bibliography

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Bibliography

[1] L. L. Schramm, E. N. Stasiuk, and D. G. Marangoni, "Surfactants and their applications", Annual Reports Section C (Physical Chemistry) **99**, 3–48 (2003).

[2] R. Zana and J. Xia, "Applications of gemini surfactants", in (CRC Press, 2003).

[3] S. Svenson, "Self-assembly and self-organization: important processes, but can we predict them?", Journal of Dispersion Science and Technology **25**, 101–118 (2004).

[4] F. M. Menger and C. A. Littau, "Gemini surfactants: a new class of self-assembling molecules", Journal of the American Chemical Society **115**, 10083–10090 (1993).

[5] D. Myers, "Surfactant science and technology", in, 3rd edition (John Wiley and Sons, Inc, 2005).

[6] R. Zana, "Gemini surfactants in water", in (CRC Press, 2003).

[7] R. Zana, "Properties of micelles and of micellar solutions of gemini surfactants", in (CRC Press, 2003).

[8] F. M. Menger and J. S. Keiper, "Gemini surfactants", Angewandte Chemie International Edition **39**, 1906–1920 (2000).

[9] R. Zana, "State of gemini surfactants in solution at concentrations below the cmc", in (CRC Press, 2003).

[10] R. Zana and M. In, "Phase behavior of gemini surfactants", in (CRC Press, 2003).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[11] I. S. Oliveira, M. Lo, M. J. Araújo, and E. F. Marques, "Temperature-responsive self-assembled nanostructures from lysine-based surfactants with high chain length asymmetry: from tubules and helical ribbons to micelles and vesicles", Soft Matter **15**, 3700–3711 (2019).

[12] Y. Han and Y. Wang, "Aggregation behavior of gemini surfactants and their interaction with macromolecules in aqueous solution", Physical Chemistry Chemical Physics **13**, 1939–1956 (2011).

[13] M. Pakiet, I. Kowalczyk, R. L. Garcia, R. Moorcroft, T. Nichol, T. Smith, R. Akid, and B. Brycki, "Gemini surfactant as multifunctional corrosion and biocorrosion inhibitors for mild steel", Bioelectrochemistry **128**, 252–262 (2019).

[14] B. E. Brycki, "Multifunctional gemini surfactants: structure, synthesis, properties and applications", in, edited by I. H. Kowalczyk, Application and Characterization of Surfactants (IntechOpen, Rijeka, 2017), Ch. 4.

[15] A. M. S. Cardoso, H. Faneca, J. A. S. Almeida, A. A.C. C. Pais, E. F. Marques, M. C. P. de Lima, and A. S. Jurado, *Gemini surfactant dimethylene-1,2-bis(tetradecyldimethylammonium bromide)-based gene vectors: a biophysical approach to transfection efficiency*, 2011.

[16] J. A. S. Almeida, H. Faneca, R. A. Carvalho, E. F. Marques, and A. A.C. C. Pais, "Dicationic alkylammonium bromide gemini surfactants. membrane perturbation and skin irritation", PLOS ONE **6**, e26965 (2011).

[17] B. Brycki and A. Szulc, "Gemini alkyldeoxy-d-glucitolammonium salts as modern surfactants and microbiocides: synthesis, antimicrobial and surface activity, biodegradation", PLOS ONE **9**, e84936 (2014).

[18] S. Silva, J. J. S. Sousa, E. F. Marques, A. A.C. C. Pais, and B. Michniak-Kohn, "Structure activity relationships in alkylammonium c12-gemini surfactants used as dermal permeation enhancers", The AAPS Journal **15**, 1119–1127 (2013).

USC
DE COMPOSTELA

[19] B. Borycki, "Gemini alkylammonium salts as biodeterioration inhibitor", PJM **59 (4)**, 227–231 (2010).

[20] B. E. Brycki, I. H. Kowalczyk, A. M. Szulc, and J. A. Brycka, "Quaternary alkylammonium salts as cleaning and disinfectant agents", Tenside Surfactants Detergents **55 (6)**, 432–438 (2018).

[21] P. X. Li, R. K. Thomas, and J. Penfold, "Limitations in the use of surface tension and the gibbs equation to determine surface excesses of cationic surfactants", Langmuir **30**, 6739–6747 (2014).

[22] F. M. Menger, L. Shi, and S. A. A. Rizvi, "Re-evaluating the gibbs analysis of surface tension at the air/water interface", Journal of the American Chemical Society **131**, 10380–10381 (2009).

[23] J. Laven and G. de With, "Should the gibbs analysis be revised?", Langmuir **27**, 7958–7962 (2011).

[24] F. M. Menger and S. A. A. Rizvi, "Relationship between surface tension and surface coverage", Langmuir **27**, 13975–13977 (2011).

[25] F. M. Menger, S. A. A. Rizvi, and L. Shi, "Reply to 'should the gibbs analysis be revised?'", Langmuir **27**, 7963–7965 (2011).

[26] F. M. Menger, L. Shi, and S. A. A. Rizvi, "Additional support for a revised gibbs analysis", Langmuir **26**, 1588–1589 (2010).

[27] C. M. Phan, T. N. Le, C. V. Nguyen, and S. ichi Yusa, "Modeling adsorption of cationic surfactants at air/water interface without using the gibbs equation", Langmuir **29**, 4743–4749 (2013).

[28] A. Frumkin, "Über die beeinflussung der adsorption von neutralmolekülen durch ein elektrisches feld", Zeitschrift für Physik **35**, 792–802 (1926).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[29] A. F. H. Ward and L. Tordai, "Time dependence of boundary tensions of solutions I. the role of diffusion in time effects", The Journal of Chemical Physics **14**, 453–461 (1946).

[30] K. May, S. A. K. Jeelani, and S. Hartland, "Influence of ionic surfactants on separation of liquid liquid dispersions", Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **139**, 41–47 (1998).

[31] M. J. Mitchell, M. M. Billingsley, R. M. Haley, M. E. Wechsler, N. A. Peppas, and R. Langer, "Engineering precision nanoparticles for drug delivery", Nature Reviews Drug Discovery **20**, 101–124 (2021).

[32] A. D. Bangham and R. W. Horne, "Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope", Journal of Molecular Biology **8**, 660–IN10 (1964).

[33] J. O. Eloy, M. C. de Souza, R. Petrilli, J. P. A. Barcellos, R. J. Lee, and J. M. Marchetti, "Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: strategies to enhance encapsulation and delivery", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **123**, 345–363 (2014).

[34] L. Sercombe, T. Veerati, F. Moheimani, S. Y. Wu, A. K. Sood, and S. Hua, "Advances and challenges of liposome assisted drug delivery", Frontiers in Pharmacology **6**, 286 (2015).

[35] V. Domínguez-Arca, R. R. Costa, A. M. Carvalho, P. Taboada, R. L. Reis, G. Prieto, and I. Pashkuleva, "Liposomes embedded in layer by layer constructs as simplistic extracellular vesicles transfer model", Materials Science and Engineering: C **121**, 111813 (2021).

[36] J. Sabín, J. M. Ruso, A. González-Pérez, G. Prieto, and F. Sarmiento, "Characterization of phospholipid+semifluorinated alkane vesicle system", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **47**, 64–70 (2006).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[37] C. N. C. Sobral, M. A. Soto, and A. M. Carmona-Ribeiro, "Characterization of dodab/dppc vesicles", Chemistry and Physics of Lipids **152**, 38–45 (2008).

[38] E. A. Ho, E. Ramsay, M. Ginj, M. Anantha, I. Bregman, J. Sy, J. Woo, M. Osooly-Talesh, D. T. Yapp, and M. B. Bally, "Characterization of cationic liposome formulations designed to exhibit extended plasma residence times and tumor vasculature targeting properties", Journal of pharmaceutical sciences **99**, 2839–2853 (2010).

[39] V. Rajendran, S. Rohra, M. Raza, G. M. Hasan, S. Dutt, and P. C. Ghosh, "Stearylamine liposomal delivery of monensin in combination with free artemisinin eliminates blood stages of plasmodium falciparum in culture and p. berghei infection in murine malaria", Antimicrobial Agents and Chemotherapy **60**, 1304–1318 (2016).

[40] S. Koirala, B. Roy, P. Guha, R. Bhattarai, M. Sapkota, P. Nahak, G. Karmakar, A. K. Mandal, A. Kumar, and A. K. Panda, "Effect of double tailed cationic surfactants on the physicochemical behavior of hybrid vesicles", RSC Advances **6**, 13786–13796 (2016).

[41] C. Montis, S. Sostegni, S. Milani, P. Baglioni, and D. Berti, "Biocompatible cationic lipids for the formulation of liposomal dna vectors", Soft Matter **10**, 4287–4297 (2014).

[42] J. A. S. Almeida, E. F. Marques, A. S. Jurado, and A. A.C. C. Pais, "The effect of cationic gemini surfactants upon lipid membranes. an experimental and molecular dynamics simulation study", Physical Chemistry Chemical Physics **12**, 14462–14476 (2010).

[43] S. Aleandri, C. Bombelli, M. G. Bonicelli, F. Bordi, L. Giansanti, G. Mancini, M. Ierino, and S. Sennato, "Fusion of gemini based cationic liposomes with cell membrane models: implications for their biological activity", Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1828**, 382–390 (2013).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[44] E. Feitosa, F. R. Alves, A. Niemiec, M. E.C. D. Real Oliveira, E. M. S. Castanheira, and A. L. F. Baptista, "Cationic liposomes in mixed didodecyldimethylammonium bromide and dioctadecyldimethylammonium bromide aqueous dispersions studied by differential scanning calorimetry, nile red fluorescence, and turbidity", Langmuir **22**, 3579–3585 (2006).

[45] V. Domínguez-Arca, J. Sabín, P. Taboada, L. García-Río, and G. Prieto, "Micellization thermodynamic behavior of gemini cationic surfactants. modeling its adsorption at air/water interface", Journal of Molecular Liquids **308**, 113100 (2020).

[46] V. Walter, C. Ruscher, O. Benzerara, C. M. Marques, and F. Thalmann, "A machine learning study of the two states model for lipid bilayer phase transitions", Physical Chemistry Chemical Physics **22**, 19147–19154 (2020).

[47] D. Marsh, A. Watts, and P. F. Knowles, "Cooperativity of the phase transition in single- and multibilayer lipid vesicles", Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **465**, 500–514 (1977).

[48] I. P. Sugár, E. Michonova-Alexova, and P. L.-G. Chong, "Geometrical properties of gel and fluid clusters in dmpc/dspc bilayers: monte carlo simulation approach using a two-state model", Biophysical journal **81**, 2425–2441 (2001).

[49] S. G. Brush, "History of the Lenz-Ising model", Reviews of Modern Physics **39**, 883–893 (1967).

[50] P. F. Almeida, "How to determine lipid interactions in membranes from experiment through the ising model", Langmuir **35**, 21–40 (2019).

[51] Q. Fei, D. Kent, W. Botello-Smith, F. Nur, S. Nur, A. Alsamarah, P. Chatterjee, M. Lambros, and Y. Luo, "Molecular mechanism of resveratrol lipid membrane protection", Scientific Reports **8**, 1587 (2018).

[52] C. T. de Ilarduya, Y. Sun, and N. Düzgünes, "Gene delivery by lipoplexes and polyplexes", European Journal of Pharmaceutical Sciences **40**, 159–170 (2010).

[53] W. T. Godbey, K. K. Wu, and A. G. Mikos, "Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery", Journal of Controlled Release **60**, 149–160 (1999).

[54] S. Zhang, Y. Xu, B. Wang, W. Qiao, D. Liu, and Z. Li, "Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery", Journal of Controlled Release **100**, 165–180 (2004).

[55] O. Boussif, F. Lezoualch, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, and J. P. Behr, "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine", Proceedings of the National Academy of Sciences **92**, 7297–7301 (1995).

[56] N. Martinho, C. Damgé, and C. P. Reis, "Recent advances in drug delivery systems", Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology **2**, 510–526 (2011).

[57] M. Rezaee, R. K. Oskuee, H. Nassirli, and B. Malaekeh-Nikouei, "Progress in the development of lipopolyplexes as efficient non-viral gene delivery systems", Journal of Controlled Release **236**, 1–14 (2016).

[58] U. Lungwitz, M. Breunig, T. Blunk, and A. Göpferich, "Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems", European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **60**, 247–266 (2005).

[59] X.-X. Zhang, T. J. McIntosh, and M. W. Grinstaff, "Functional lipids and lipoplexes for improved gene delivery", Biochimie **94**, 42–58 (2012).

[60] X. Zhou, F. Laroche, G. E. M. Lamers, V. Torraca, P. Voskamp, T. Lu, F. Chu, H. P. Spaink, J. P. Abrahams, and Z. Liu, "Ultra-small graphene oxide functionalized with polyethylenimine for very efficient gene delivery in cell and zebrafish embryos", Nano Research **5**, 703–709 (2012).

[61] J.-S. Remy, B. Abdallah, M. A. Zanta, O. Boussif, J.-P. Behr, and B. Demeneix, "Gene transfer with lipospermines and polyethylenimines", Advanced Drug Delivery Reviews **30**, 85–95 (1998).

[62] F. Wegmann, K. H. Gartlan, A. M. Harandi, S. A. Brinckmann, M. Coccia, W. R. Hillson, W. L. Kok, S. Cole, L.-P. Ho, T. Lambe, M. Puthia, C. Svanborg, E. M. Scherer, G. Krashias, A. Williams, J. N. Blattman, P. D. Greenberg, R. A. Flavell, A. E. Moghaddam, N. C. Sheppard, and Q. J. Sattentau, "Polyethyleneimine is a potent mucosal adjuvant for viral glycoprotein antigens", Nature biotechnology **30**, 883–888 (2012).

[63] B.-S. Shim, S.-M. Park, J.-S. Quan, D. Jere, H. Chu, M. K. Song, D. W. Kim, Y.-S. Jang, M.-S. Yang, S. H. Han, Y.-H. Park, C.-S. Cho, and C.-H. Yun, "Intranasal immunization with plasmid DNA encoding spike protein of SARS-coronavirus/polyethylenimine nanoparticles elicits antigen-specific humoral and cellular immune responses", BMC Immunology **11**, 65 (2010).

[64] N. C. Sheppard, S. A. Brinckmann, K. H. Gartlan, M. Puthia, C. Svanborg, G. Krashias, S. C. Eisenbarth, R. A. Flavell, Q. J. Sattentau, and F. Wegmann, "Polyethyleneimine is a potent systemic adjuvant for glycoprotein antigens", International immunology **26**, 531–538 (2014).

[65] X. Zhou, B. Liu, X. Yu, X. Zha, X. Zhang, X. Wang, Y. Jin, Y. Wu, Y. Chen, Y. Shan, Y. Chen, J. Liu, W. Kong, and J. Shen, "Controlled release of PEI/DNA complexes from plga microspheres as a potent delivery system to enhance immune response to HIV vaccine DNA prime/MVA boost regime", European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **68**, 589–595 (2008).

[66] H.-J. Cho, S.-E. Han, S. Im, Y. Lee, Y. B. Kim, T. Chun, and Y.-K. Oh, "Maltosylated polyethylenimine-based triple nanocomplexes of human papillomavirus 16L1 protein and DNA as a vaccine co-delivery system", Biomaterials **32**, 4621–4629 (2011).

[67] Y.-F. Ma and Y.-W. Yang, "Delivery of DNA-based cancer vaccine with polyethylenimine", European Journal of Pharmaceutical Sciences **40**, 75–83 (2010).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[68] E. Mohit, A. Bolhassani, F. Zahedifard, N. Seyed, A. Eslamifar, M. Taghikhani, K. Samimi-Rad, and S. Rafati, "Immunomodulatory effects of IP-10 chemokine along with PEI600-Tat delivery system in DNA vaccination against HPV infections", Molecular immunology **53**, 149–160 (2013).

[69] K. Regnström, E. G. E. Ragnarsson, M. Köping-Höggard, E. Torstensson, H. Nyblom, and P. Artursson, "PEI - a potent, but not harmless, mucosal immunostimulator of mixed T-helper cell response and FasL-mediated cell death in mice", Gene therapy **10**, 1575–1583 (2003).

[70] T. Bieber, W. Meissner, S. Kostin, A. Niemann, and H.-P. Elsasser, "Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes", Journal of Controlled Release **82**, 441–454 (2002).

[71] H. Pollard, J.-S. Remy, G. Loussouarn, S. Demolombe, J.-P. Behr, and D. Escande, "Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells", Journal of Biological Chemistry **273**, 7507–7511 (1998).

[72] I. Moret, J. E. Peris, V. M. Guillem, M. Benet, F. Revert, F. Dasí, A. Crespo, and S. F. Alino, "Stability of PEI-DNA and DOTAP-DNA complexes: effect of alkaline pH, heparin and serum", Journal of Controlled Release **76**, 169–181 (2001).

[73] J. Shi, B. Chou, J. L. Choi, A. L. Ta, and S. H. Pun, "Investigation of polyethylenimine/DNA polyplex transfection to cultured cells using radiolabeling and subcellular fractionation methods", Molecular Pharmaceutics **10**, 2145–2156 (2013).

[74] B. I. Florea, C. Meaney, H. E. Junginger, and G. Borchard, "Transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine in differentiated Calu-3 and nondifferentiated COS-1 cell cultures", eng, AAPS pharmSci **4**, E12–E12 (2002).

[75] W. T. Godbey, K. K. Wu, and A. G. Mikos, "Poly(ethylenimine)-mediated gene delivery affects endothelial cell function and viability", Biomaterials **22**, 471–480 (2001).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[76] M. Sikor, J. Sabin, A. Keyvanloo, M. F. Schneider, J. L. Thewalt, A. E. Bailey, and B. J. Frisken, "Interaction of a charged polymer with zwitterionic lipid vesicles", Langmuir **26**, 4095–4102 (2010).

[77] U. Kwolek, D. Jamróz, M. Janiczek, M. Nowakowska, P. Wydro, and M. Kepczynski, "Interactions of polyethylenimines with zwitterionic and anionic lipid membranes", Langmuir **32**, 5004–5018 (2016).

[78] L. Li, C. He, W. He, and C. Wu, "How does a hyperbranched chain pass through a nanopore", Macromolecules **45**, 7583–7589 (2012).

[79] M. Gao, W. Gao, J. M. Papadimitriou, C. Zhang, J. Gao, and M. Zheng, "Exosomes - the enigmatic regulators of bone homeostasis", Bone Research **6**, 36 (2018).

[80] C.-Y. Kao and E. T. Papoutsakis, "Extracellular vesicles: exosomes, microparticles, their parts, and their targets to enable their biomanufacturing and clinical applications", Current Opinion in Biotechnology **60**, 89–98 (2019).

[81] M. Mathieu, L. Martin-Jaular, G. Lavieu, and C. Théry, "Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication", Nature cell biology **21**, 9–17 (2019).

[82] J. M. Street, E. H. Koritzinsky, D. M. Glispie, R. A. Star, and P. S. T. Yuen, "Chapter Three - Urine exosomes: an emerging trove of biomarkers", Advances in Clinical Chemistry **78**, 103–122 (2017).

[83] Y. Zhang, Y. Liu, H. Liu, and W. H. Tang, "Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential", Cell and Bioscience **9**, 19 (2019).

[84] E. J. Bunggulawa, W. Wang, T. Yin, N. Wang, C. Durkan, Y. Wang, and G. Wang, "Recent advancements in the use of exosomes as drug delivery systems", Journal of Nanobiotechnology **16**, 81 (2018).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[85] H. Valadi, K. Ekström, A. Bossios, M. Sjöstrand, J. J. Lee, and J. L. O., "Exosome-mediated transfer of mrnas and micrornas is a novel mechanism of genetic exchange between cells", Nature cell biology **9**, 654–659 (2007).

[86] M. Sancho-Albero, N. Navascués, G. Mendoza, V. Sebastián, M. Arruebo, P. Martín-Duque, and J. Santamaría, "Exosome origin determines cell targeting and the transfer of therapeutic nanoparticles towards target cells", Journal of Nanobiotechnology **17**, 16 (2019).

[87] M. Tkach and C. Théry, "Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go", Cell **164**, 1226–1232 (2016).

[88] C. Chen, S. Zong, Z. Wang, J. Lu, D. Zhu, Y. Zhang, and Y. Cui, "Imaging and intracellular tracking of cancer-derived exosomes using single-molecule localization-based super-resolution microscope", ACS Applied Materials and Interfaces **8**, 25825–25833 (2016).

[89] J. Maia, S. Caja, M. C. S. Moraes, N. Couto, and B. Costa-Silva, "Exosome-based cell-cell communication in the tumor microenvironment", Frontiers in Cell and Developmental Biology **6**, 18 (2018).

[90] J. Meldolesi, "Exosomes and ectosomes in intercellular communication", Current Biology **28**, R435–R444 (2018).

[91] I. Wortzel, S. Dror, C. M. Kenific, and D. Lyden, "Exosome-mediated metastasis: communication from a distance", Developmental Cell **49**, 347–360 (2019).

[92] M. Vidal, "Exosomes: revisiting their role as "garbage bags"", Traffic **20**, 815–828 (2019).

[93] M. Boyiadzis and T. L. Whiteside, "Information transfer by exosomes: a new frontier in hematologic malignancies", Blood Reviews **29**, 281–290 (2015).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[94] A. Takahashi, R. Okada, K. Nagao, Y. Kawamata, A. Hanyu, S. Yoshimoto, M. Takasugi, S. Watanabe, M. T. Kanemaki, C. Obuse, and E. Hara, "Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful dna from cells", Nature Communications **8**, 15287 (2017).

[95] W. Tian, S. Liu, and B. Li, "Potential role of exosomes in cancer metastasis", BioMed Research International **2019**, 4649705 (2019).

[96] C. Zhang, K. Zhang, F. Huang, W. Feng, J. Chen, H. Zhang, J. Wang, P. Luo, and H. Huang, "Exosomes, the message transporters in vascular calcification", Journal of Cellular and Molecular Medicine **22**, 4024–4033 (2018).

[97] J. Sabín, G. Prieto, J. M. Ruso, R. Hidalgo-Alvarez, and F. Sarmiento, "Size and stability of liposomes: a possible role of hydration and osmotic forces", eng, The European physical journal.E, Soft matter **20**, 401–408 (2006).

[98] U. Bulbake, S. Doppalapudi, N. Kommineni, and W. Khan, "Liposomal formulations in clinical use: an updated review", Pharmaceutics **9** (2017).

[99] M. E. F. Brollo, A. Domínguez-Bajo, A. Tabero, V. Domínguez-Arca, V. Gisbert, G. Prieto, C. Johansson, R. Garcia, A. Villanueva, M. C. Serrano, and M. del Puerto Morales, "Combined magnetoliposome formation and drug loading in one step for efficient alternating current-magnetic field remote-controlled drug release", ACS Applied Materials and Interfaces **12**, 4295–4307 (2020).

[100] V. P. Torchilin, "Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers", Nature Reviews Drug Discovery **4**, 145–160 (2005).

[101] G. S. Antimisiaris, S. Mourtas, and A. Marazioti, "Exosomes and exosome-inspired vesicles for targeted drug delivery", Pharmaceutics **10** (2018).

[102] G. Rackov, N. Garcia-Romero, S. Esteban-Rubio, J. Carrión-Navarro, C. Belda-Iniesta, and A. Ayuso-Sacido, "Vesicle-mediated control of cell function: the role of extracellular matrix and microenvironment", Frontiers in Physiology **9**, 651 (2018).

[103] H. C. Anderson, "Matrix vesicles and calcification", Current rheumatology reports **5**, 222–226 (2003).

[104] I. Azoidis, S. C. Cox, and O. G. Davies, "The role of extracellular vesicles in biomineralisation: current perspective and application in regenerative medicine", J Tissue Eng **9**, 2041731418810130 (2018).

[105] O. Guillame-Gentil, O. Semenov, A. S. Roca, T. Groth, R. Zahn, J. Vörös, and M. Zenobi-Wong, "Engineering the extracellular environment: strategies for building 2d and 3d cellular structures", Advanced Materials **22**, 5443–5462 (2010).

[106] S. Amorim, D. S. da Costa, D. Freitas, C. A. Reis, R. L. Reis, I. Pashkuleva, and R. A. Pires, "Molecular weight of surface immobilized hyaluronic acid influences CD44-mediated binding of gastric cancer cells", Scientific Reports **8**, 16058 (2018).

[107] S. Amorim, I. Pashkuleva, C. A. Reis, R. L. Reis, and R. A. Pires, "Tunable layer-by-layer films containing hyaluronic acid and their interactions with CD44", Journal of Materials Chemistry B **8**, 3880–3885 (2020).

[108] S. Amorim, D. S. da Costa, S. Mereiter, I. Pashkuleva, C. A. Reis, R. L. Reis, and R. A. Pires, "Multilayer platform to model the bioactivity of hyaluronic acid in gastric cancer", Materials Science and Engineering: C **119**, 111616 (2021).

[109] S. Amorim, D. S. da Costa, I. Pashkuleva, C. A. Reis, R. L. Reis, and R. A. Pires, "Hyaluronic acid of low molecular weight triggers the invasive "hummingbird" phenotype on gastric cancer cells", Advanced Biosystems **4**, 2000122 (2020).

[110] D. Alkekhia, P. T. Hammond, and A. Shukla, "Layer-by-layer biomaterials for drug delivery", Annual Review of Biomedical Engineering **22**, 1–24 (2020).

[111] R. R. Costa and J. F. Mano, "Polyelectrolyte multilayered assemblies in biomedical technologies", Chemical Society Reviews **43**, 3453–3479 (2014).

[112] S. Yue, H. He, B. Li, and T. Hou, "Hydrogel as a biomaterial for bone tissue engineering: a review", Nanomaterials **10** (2020).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

[113] N. V. Rao, "22 - Hyaluronic acid-based hydrogels for tissue engineering", in, edited by N. E. Vrana, H. Knopf-Marques, and J. Barthes, Biomaterials for Organ and Tissue Regeneration (Woodhead Publishing, 2020), pages 551–565.

[114] B. Velasco-Rodriguez, T. Diaz-Vidal, L. C. Rosales-Rivera, C. A. García-González, C. Alvarez-Lorenzo, A. Al-Modlej, V. Domínguez-Arca, G. Prieto, S. Barbosa, J. F. A. Soltero Martínez, and P. Taboada, "Hybrid methacrylated gelatin and hyaluronic acid hydrogel scaffolds. preparation and systematic characterization for prospective tissue engineering applications", International Journal of Molecular Sciences **22** (2021).

[115] R. Beninatto, C. Barbera, O. D. Lucchi, G. Borsato, E. Serena, C. Guarise, M. Pavan, C. Luni, S. Martewicz, D. Galesso, and N. Elvassore, "Photocrosslinked hydrogels from coumarin derivatives of hyaluronic acid for tissue engineering applications", Materials Science and Engineering: C **96**, 625–634 (2019).

[116] P. Zhai, X. Peng, B. Li, Y. Liu, H. Sun, and X. Li, "The application of hyaluronic acid in bone regeneration", International journal of biological macromolecules **151**, 1224–1239 (2020).

[117] Y.-J. Choi, H. Park, D.-H. Ha, H.-S. Yun, H.-G. Yi, and H. Lee, "3D Bioprinting of in vitro models using hydrogel-based bioinks", Polymers **13** (2021).

[118] H. Zhu, N. Mitsuhashi, A. Klein, L. W. Barsky, K. Weinberg, M. L. Barr, A. Demetriou, and G. D. Wu, "The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix", Stem Cells **24**, 928–935 (2006).

[119] S.-C. Wu, C.-H. Chen, J.-K. Chang, Y.-C. Fu, C.-K. Wang, R. Eswaramoorthy, Y.-S. Lin, Y.-H. Wang, S.-Y. Lin, G.-J. Wang, and M.-L. Ho, "Hyaluronan initiates chondrogenesis mainly via CD44 in human adipose-derived stem cells", Journal of applied physiology **114**, 1610–1618 (2013).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[120] L.-T. Zhang, R.-M. Liu, Y. Luo, Y.-J. Zhao, D.-X. Chen, C.-Y. Yu, and J.-H. Xiao, "Hyaluronic acid promotes osteogenic differentiation of human amniotic mesenchymal stem cells via the tgf-b/Smad signalling pathway", Life Sciences **232**, 116669 (2019).

[121] M. T. Poldervaart, B. Goversen, M. de Ruijter, A. Abbadessa, F. P. W. Melchels, F. C. Öner, W. J. A. Dhert, T. Vermonden, and J. Alblas, "3D Bioprinting of methacrylated hyaluronic acid (MeHA) hydrogel with intrinsic osteogenicity", eng, PloS one **12**, e0177628–e0177628 (2017).

[122] M. Wang, Y. Xin, H. Cao, W. Li, Y. Hua, T. J. Webster, C. Zhang, W. Tang, and Z. Liu, "Recent advances in mesenchymal stem cell membrane-coated nanoparticles for enhanced drug delivery", Biomaterials Science **9**, 1088–1103 (2021).

[123] F. Langenbach and J. örg Handschel, "Effects of dexamethasone, ascorbic acid and b-glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro", Stem Cell Research and Therapy **4**, 117 (2013).

[124] Y. Xiao, V. Peperzak, L. van Rijn, J. Borst, and J. D. de Bruijn, "Dexamethasone treatment during the expansion phase maintains stemness of bone marrow mesenchymal stem cells", Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine **4**, 374–386 (2010).

[125] A. J. Giles, M.-K.N. D. Hutchinson, H. M. Sonnemann, J. Jung, P. E. Fecci, N. M. Ratnam, W. Zhang, H. Song, R. Bailey, D. Davis, C. M. Reid, D. M. Park, and M. R. Gilbert, "Dexamethasone-induced immunosuppression: mechanisms and implications for immunotherapy", eng, Journal for immunotherapy of cancer **6**, 51–51 (2018).

[126] H. Wang, B. Pang, Y. Li, D. Zhu, T. Pang, and Y. Liu, "Dexamethasone has variable effects on mesenchymal stromal cells", Cytotherapy **14**, 423–430 (2012).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[127] S. Grijalvo, R. Eritja, and D. D. Díaz, "Liposomes-in-chitosan hydrogels: challenges and opportunities for biomedical applications", Materials Science and Technology, 1–32 (2019).

[128] W. Gao, D. Vecchio, J. Li, J. Zhu, Q. Zhang, V. Fu, J. Li, S. Thamphiwatana, D. Lu, and L. Zhang, "Hydrogel containing nanoparticle-stabilized liposomes for topical antimicrobial delivery", ACS Nano **8**, 2900–2907 (2014).

[129] L. Liu, Y. Xiang, Z. Wang, X. Yang, X. Yu, Y. Lu, L. Deng, and W. Cui, "Adhesive liposomes loaded onto an injectable, self-healing and antibacterial hydrogel for promoting bone reconstruction", NPG Asia Materials **11**, 81 (2019).

[130] M. M. Ibrahim, "Hydrogels and their combination with liposomes, niosomes, or transfersomes for dermal and transdermal drug delivery", in (IntechOpen, 2017).

[131] S. Peers, P. Alcouffe, A. Montembault, and C. Ladaviere, "Embedment of liposomes into chitosan physical hydrogel for the delayed release of antibiotics or anaesthetics, and its first ESEM characterization", Carbohydrate Polymers **229**, 115532 (2020).

[132] Y. Li, R. Zhang, X. Li, W. Li, Y. Lu, and C. Dai, "The preparation of dexamethasone sodium phosphate multivesicular liposomes thermosensative hydrogel and its impact on noise-induced hearing loss in the Guinea pigs", Experimental cell research **387**, 111755 (2020).

[133] R. Cheng, L. Liu, Y. Xiang, Y. Lu, L. Deng, H. Zhang, H. A. Santos, and W. Cui, "Advanced liposome-loaded scaffolds for therapeutic and tissue engineering applications", Biomaterials **232**, 119706 (2020).

[134] S. Grijalvo, J. Mayr, R. Eritja, and D. D. Díaz, "Biodegradable liposome encapsulated hydrogels for biomedical applications: a marriage of convenience", Biomaterials Science **4**, 555–574 (2016).

[135] M.-C. Chang, Y.-J. Kuo, K.-H. Hung, C.-L. Peng, K.-Y. Chen, and L.-K. Yeh, "Liposomal dexamethasone-moxifloxacin nanoparticle combinations with collagen

gelatin alginate hydrogel for corneal infection treatment and wound healing", Biomedical Materials **15**, 055022 (2020).

[136] H. A. Wege, J. A. Holgado-Terriza, and M. A. Cabrerizo-Vílchez, "Development of a constant surface pressure penetration langmuir balance based on axisymmetric drop shape analysis", Journal of Colloid and Interface Science **249**, 263–273 (2002).

[137] H. A. Wege, M. A Cabrerizo-Vílchez, and J. Holgado-Terriza, "Development of a pressure-controlled pendant-drop surface balance", in, edited by M. Miguel and H. D. Burrows, Trends in Colloid and Interface Science XVI (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2004), pages 188–193.

[138] M. A. Cabrerizo-Vílchez, H. A. Wege, J. A. Holgado-Terriza, and A. W. Neumann, "Axisymmetric drop shape analysis as penetration langmuir balance", Review of Scientific Instruments **70**, 2438–2444 (1999).

[139] J. Maldonado-Valderrama, A. Torcello-Gómez, T. del Castillo-Santaella, J. A. Holgado-Terriza, and M. A. Cabrerizo-Vílchez, "Subphase exchange experiments with the pendant drop technique", Advances in Colloid and Interface Science **222**, 488–501 (2015).

[140] Y Rotenberg, L Boruvka, and A. Neumann, "Determination of surface tension and contact angle from the shapes of axisymmetric fluid interfaces", Journal of Colloid and Interface Science **93**, 169–183 (1983).

[141] O. I. del Río and A. W. Neumann, "Axisymmetric drop shape analysis: computational methods for the measurement of interfacial properties from the shape and dimensions of pendant and sessile drops", Journal of Colloid and Interface Science **196**, 136–147 (1997).

[142] M. Rodríguez-Valverde, M. Cabrerizo-Vílchez, P Rosales-López, A Páez-Dueñas, and R Hidalgo-Álvarez, "Contact angle measurements on two (wood and stone) non-ideal surfaces", Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **206**, 485–495 (2002).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[143] F. Carrión, A. De La Maza, and J. Parra, "The influence of ionic strength and lipid bilayer charge on the stability of liposomes", Journal of Colloid and Interface Science **164**, 78–87 (1994).

[144] S. Bhattacharjee, "DLS and zeta potential - what they are and what they are not", Journal of Controlled Release **235**, 337–351 (2016).

[145] S. Jo, T. Kim, V. G. Iyer, and W. Im, "Charmm-gui: a web-based graphical user interface for charmm", Journal of Computational Chemistry **29**, 1859–1865 (2008).

[146] S. Jo, T. Kim, and W. Im, "Automated builder and database of protein/membrane complexes for molecular dynamics simulations", PLOS ONE **2**, e880 (2007).

[147] S. Jo, J. B. Lim, J. B. Klauda, and W. Im, "Charmm-gui membrane builder for mixed bilayers and its application to yeast membranes", Biophysical journal **97**, 50–58 (2009).

[148] E. L. Wu, X. Cheng, S. Jo, H. Rui, K. C. Song, E. M. Dávila-Contreras, Y. Qi, J. Lee, V. Monje-Galvan, R. M. Venable, J. B. Klauda, and W. Im, "Charmm-gui membrane builder toward realistic biological membrane simulations", Journal of Computational Chemistry **35**, 1997–2004 (2014).

[149] J. Lee, X. Cheng, J. M. Swails, M. S. Yeom, P. K. Eastman, J. A. Lemkul, S. Wei, J. Buckner, J. C. Jeong, Y. Qi, S. Jo, V. S. Pande, D. A. Case, C. L. Brooks, A. D. MacKerell, J. B. Klauda, and W. Im, "Charmm-gui input generator for namd, gromacs, amber, openmm, and charmm/openmm simulations using the charmm36 additive force field", Journal of Chemical Theory and Computation **12**, 405–413 (2016).

[150] J. Lee, D. S. Patel, J. Stahle, S.-J. Park, N. R. Kern, S. Kim, J. Lee, X. Cheng, M. A. Valvano, O. Holst, Y. A. Knirel, Y. Qi, S. Jo, J. B. Klauda, G. Widmalm, and W. Im, "Charmm-gui membrane builder for complex biological membrane simulations with glycolipids and lipoglycans", Journal of Chemical Theory and Computation **15**, 775–786 (2019).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[151] J. Lee, M. Hitzenberger, M. Rieger, N. R. Kern, M. Zacharias, and W. Im, "Charmm-gui supports the amber force fields", The Journal of chemical physics **153**, 035103 (2020).

[152] P. Mark and L. Nilsson, "Structure and dynamics of the tip3p, spc, and spc/e water models at 298 k", The Journal of Physical Chemistry A **105**, 9954–9960 (2001).

[153] A. Srivastava and A. Debnath, "Hydration dynamics of a lipid membrane: hydrogen bond networks and lipid-lipid associations", The Journal of chemical physics **148**, 094901 (2018).

[154] M. J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J. C. Smith, B. Hess, and E. Lindahl, "Gromacs: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers", SoftwareX **1-2**, 19–25 (2015).

[155] S. Páll and B. Hess, "A flexible algorithm for calculating pair interactions on simd architectures", Computer Physics Communications **184**, 2641–2650 (2013).

[156] T. Darden, D. York, and L. Pedersen, "Particle mesh ewald: an nlog(n) method for ewald sums in large systems", The Journal of chemical physics **98**, 10089–10092 (1993).

[157] B. Hess, H. Bekker, H. J. C. Berendsen, and J. G.E. M. Fraaije, "Lincs: a linear constraint solver for molecular simulations", Journal of Computational Chemistry **18**, 1463–1472 (1997).

[158] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, and J. R. Haak, "Molecular dynamics with coupling to an external bath", The Journal of chemical physics **81**, 3684–3690 (1984).

[159] S. Nosé, "A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble", Mol.Phys. **52**, 255–268 (1984).

[160] W. G. Hoover, "Canonical dynamics: equilibrium phase-space distributions", Physical Review A **31**, 1695–1697 (1985).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[161] M. Parrinello and A. Rahman, "Polymorphic transitions in single crystals: a new molecular dynamics method", Journal of Applied Physics **52**, 7182–7190 (1981).

[162] S. A. Bencherif, A. Srinivasan, F. Horkay, J. O. Hollinger, K. Matyjaszewski, and N. R. Washburn, "Influence of the degree of methacrylation on hyaluronic acid hydrogels properties", Biomaterials **29**, 1739–1749 (2008).

[163] S. A. Bencherif, D. J. Siegwart, A. Srinivasan, F. Horkay, J. O. Hollinger, N. R. Washburn, and K. Matyjaszewski, "Nanostructured hybrid hydrogels prepared by a combination of atom transfer radical polymerization and free radical polymerization", Biomaterials **30**, 5270–5278 (2009).

[164] K. A. Smeds, A. Pfister-Serres, D. L. Hatchell, and M. W. Grinstaff, "Synthesis of a novel polysaccharide hydrogel", **36**, 981–989 (1999).

[165] R. G. Woolford, "The electrolysis of w-bromocarboxylic acids", Canadian Journal of Chemistry **40**, 1846–1850 (1962).

[166] L. D. Mayer, M. J. Hope, P. R. Cullis, and A. S. Janoff, "Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles", Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **817**, 193–196 (1985).

[167] S. G. Taneva, P. J. Patty, B. J. Frisken, and R. B. Cornell, "Ctp:phosphocholine cytidylyltransferase binds anionic phospholipid vesicles in a cross-bridging mode", Biochemistry **44**, 9382–9393 (2005).

[168] L. Diaz-Gomez, C. A. García-González, J. Wang, F. Yang, S. Aznar-Cervantes, J. L. Cenis, R. Reyes, A. Delgado, C. Évora, A. Concheiro, and C. Alvarez-Lorenzo, "Biodegradable pcl/fibroin/hydroxyapatite porous scaffolds prepared by supercritical foaming for bone regeneration", International Journal of Pharmaceutics **527**, 115–125 (2017).

[169] S. Paula, W. Sues, J. Tuchtenhagen, and A. Blume, "Thermodynamics of micelle formation as a function of temperature: a high sensitivity titration calorimetry study", The Journal of physical chemistry **99**, 11742–11751 (1995).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[170] Z. Király and I. Dekány, "A thermometric titration study on the micelle formation of sodium decyl sulfate in water", Journal of Colloid and Interface Science **242**, 214–219 (2001).

[171] H. Piekarski and K. Ludzik, "A microcalorimetric titration study on the micelle formation of alkanediyl-a,b-bis(dimethylalkylammonium bromide) surfactants at a 283.15-343.15 k temperature range", Journal of Thermal Analysis and Calorimetry **110**, 263–271 (2012).

[172] J. Makowska, D. Wyrzykowski, B. Pilarski, and L. Chmurzyński, "Thermodynamics of sodium dodecyl sulphate (sds) micellization in the presence of some biologically relevant ph buffers", Journal of Thermal Analysis and Calorimetry **121**, 257–261 (2015).

[173] J. C. Martinez, J. Murciano-Calles, E. S. Cobos, M. Iglesias-Bexiga, I. Luque, and J. Ruiz-Sanz, *Isothermal titration calorimetry: thermodynamic analysis of the binding thermograms of molecular recognition events by using equilibrium models*, edited by A. A. Elkordy, Applications of Calorimetry in a Wide Context - Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry (InTech, Rijeka, 2013), Ch. 04.

[174] R. Zana, "Critical micellization concentration of surfactants in aqueous solution and free energy of micellization", Langmuir **12**, 1208–1211 (1996).

[175] R. Zana, "Ionization of cationic micelles: effect of the detergent structure", Journal of Colloid and Interface Science **78**, 330–337 (1980).

[176] K. Bouchemal, F. Agnely, A. Koffi, M. Djabourov, and G. Ponchel, "What can isothermal titration microcalorimetry experiments tell us about the self-organization of surfactants into micelles?", Journal of Molecular Recognition **23**, 335–342 (2010).

[177] S. F. Burlatsky, V. V. Atrazhev, D. V. Dmitriev, V. I. Sultanov, E. N. Timokhina, E. A. Ugolkova, S. Tulyani, and A. Vincitore, "Surface tension model for surfactant

USC
DE COMPOSTELA

solutions at the critical micelle concentration", Journal of colloid and interface science **393**, 151–160 (2013).

[178] G. Castro, P. F. Garrido, A. Amigo, and P. Brocos, "Boosting the use of thermoacoustimetry in micellization thermodynamics studies by easing an objective determination of the cmc", Fluid Phase Equilibria **478**, 1–13 (2018).

[179] B. Sarac, Žiga Medos, A. Cognigni, K. Bica, L.-J. Chen, and M. Bester-Rogac, "Thermodynamic study for micellization of imidazolium based surface active ionic liquids in water: effect of alkyl chain length and anions", Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **532**, 609–617 (2017).

[180] S. Khrapunov, "The enthalpy-entropy compensation phenomenon. limitations for the use of some basic thermodynamic equations", Current Protein and Peptide Science **19**, 1088–1091 (2018).

[181] U. Ryde, "A fundamental view of enthalpy-entropy compensation", MedChemComm **5**, 1324–1336 (2014).

[182] A. Pan, T. Kar, A. K. Rakshit, and S. P. Moulik, "Enthalpy-entropy compensation (eec) effect: decisive role of free energy", The Journal of Physical Chemistry B **120**, 10531–10539 (2016).

[183] C. V. Nguyen, T. V. Nguyen, and C. M. Phan, "Adsorption of alkyltrimethylammonium bromide surfactants at the air/water interface", International Journal of Heat and Mass Transfer **106**, 1035–1040 (2017).

[184] C. V. Nguyen, T. V. Nguyen, and C. M. Phan, "Dynamic adsorption of a gemini surfactant at the air/water interface", Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **482**, 365–370 (2015).

[185] C. M. Phan, A. V. Nguyen, and G. M. Evans, "Dynamic adsorption of sodium dodecylbenzene sulphonate and dowfroth 250 onto the air–water interface", Minerals Engineering **18**, 599–603 (2005).

[186] C. Qibin, L. Xiaodong, W. Shaolei, X. Shouhong, L. Honglai, and H. Ying, "Cationic gemini surfactant at the air/water interface", Journal of colloid and interface science **314**, 651–658 (2007).

[187] M. Volkova-Gugeshashvili, A. G. Volkov, and V. S. Markin, "Adsorption at liquid interfaces: the generalized frumkin isotherm and interfacial structure", Russian Journal of Electrochemistry **42**, 1073–1078 (2006).

[188] C. Bermúdez-Salguero and J. Gracia-Fadrique, "Analysis of gibbs adsorption equation and thermodynamic relation between gibbs standard energies of adsorption and micellization through a surface equation of state", Journal of Colloid and Interface Science **355**, 518–519 (2011).

[189] J. Eastoe and J. S. Dalton, "Dynamic surface tension and adsorption mechanisms of surfactants at the air-water interface", Advances in Colloid and Interface Science **85**, 103–144 (2000).

[190] M. Nilsson, C. Cabaleiro-Lago, A. J. M. Valente, and O. Söderman, "Interactions between gemini surfactants, 12-s-12, and b-cyclodextrin as investigated by nmr diffusometry and electric conductometry", Langmuir **22**, 8663–8669 (2006).

[191] A. Siderius, S. K. Kehl, and D. G. Leaist, "Surfactant diffusion near critical micelle concentrations", Journal of Solution Chemistry **31**, 607–625 (2002).

[192] N. Yellin and I. W. Levin, "Hydrocarbon chain trans-gauche isomerization in phospholipid bilayer gel assemblies", Biochemistry **16**, 642–647 (1977).

[193] H. Heerklotz, H. Binder, G. Lantzsch, G. Klose, and A. Blume, "Lipid/detergent interaction thermodynamics as a function of molecular shape", The Journal of Physical Chemistry B **101**, 639–645 (1997).

[194] J. Sabin, G. Prieto, J. Estelrich, F. Sarmiento, and M. Costas, "Insertion of semifluorinated diblocks on dmpc and dppc liposomes. influence on the gel and liquid states of the bilayer", Journal of colloid and interface science **348**, 388–392 (2010).

[195] J. E. McMurry, "Organic chemistry", in, 8th (Brooks/Cole Publishing Co., Canada, 2012).

[196] W. Chen, F. Dusa, J. Witos, S.-K. Ruokonen, and S. K. Wiedmer, "Determination of the main phase transition temperature of phospholipids by nanoplasmonic sensing", Scientific Reports **8**, 14815 (2018).

[197] P. D. Dobson and D. B. Kell, "Carrier-mediated cellular uptake of pharmaceutical drugs: an exception or the rule?", Nature Reviews Drug Discovery **7**, 205–220 (2008).

[198] M. Alatorre-Meda, P. Taboada, B. Krajewska, M. Willemeit, A. Deml, R. Klösel, and J. R. Rodríguez, "Dna-poly(diallyldimethylammonium chloride) complexation and transfection efficiency", The Journal of Physical Chemistry B **114**, 9356–9366 (2010).

[199] T. Iida, T. Mori, Y. Katayama, and T. Niidome, "Overall interaction of cytosolic proteins with the pei/dna complex", Journal of Controlled Release **118**, 364–369 (2007).

[200] F. Jähnig, "What is the surface tension of a lipid bilayer membrane?", Biophysical journal **71**, 1348–1349 (1996).

[201] B. Klajnert and R. M. Epand, "Pamam dendrimers and model membranes: differential scanning calorimetry studies", International journal of pharmaceutics **305**, 154–166 (2005).

[202] C. K. Choudhury, A. Kumar, and S. Roy, "Characterization of conformation and interaction of gene delivery vector polyethylenimine with phospholipid bilayer at different protonation state", Biomacromolecules **14**, 3759–3768 (2013).

[203] Y. Nademi, T. Tang, and H. Uludağ, "Membrane lipids destabilize short interfering ribonucleic acid (sirna)/polyethylenimine nanoparticles", Nanoscale **12**, 1032–1045 (2020).

[204] P. Greenspan and S. D. Fowler, "Spectrofluorometric studies of the lipid probe, nile red.", Journal of lipid research **26**, 781–789 (1985).

[205] E. Reimhult, F. Höök, and B. Kasemo, "Intact vesicle adsorption and supported biomembrane formation from vesicles in solution: influence of surface chemistry, vesicle size, temperature, and osmotic pressure", Langmuir **19**, 1681–1691 (2003).

[206] R. Teixeira, R. L. Reis, and I. Pashkuleva, "Influence of the sulfation degree of glycosaminoglycans on their multilayer assembly with poly-l-lysine", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **145**, 567–575 (2016).

[207] C. He, S. Zheng, Y. Luo, and B. Wang, "Exosome theranostics: biology and translational medicine", Theranostics **8**, 237–255 (2018).

[208] T. Yong, X. Zhang, N. Bie, H. Zhang, X. Zhang, F. Li, A. Hakeem, J. Hu, L. Gan, H. A. Santos, and X. Yang, "Tumor exosome-based nanoparticles are efficient drug carriers for chemotherapy", Nature Communications **10**, 3838 (2019).

[209] X. Wang, X. Hu, I. Dulińska-Molak, N. Kawazoe, Y. Yang, and G. Chen, "Discriminating the independent influence of cell adhesion and spreading area on stem cell fate determination using micropatterned surfaces", Scientific Reports **6**, 28708 (2016).

[210] H. Hanna, L. M. Mir, and F. M. Andre, "In vitro osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells generates cell layers with distinct properties", Stem Cell Research & Therapy **9**, 203 (2018).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Os liposomas son sistemas nanobiotecnolóxicos cun gran potencial para ser aplicados como “vehículos” na administración de fármacos ou como elementos activos na tecnoloxía de biosensores. Neste proxecto estudaranse novos sistemas liposómicos para aplicacións no ámbito biotecnolóxico, mudando diferentes propiedades dos liposomas: estabilidade, porosidade, permeabilidade, etc. Empregaranse compostos de fosfolípidos dopados con surfactantes catiónicos gemini (GS). O estudo abordarase en tres bloques: (1) estudar a adsorción en interfases aire/auga e a autoagregación dos GS, (2) caracterizar sistemas liposómicos con distintas formulacións introducindo GS e outros polímeros e (3) Aplicar estes sistemas como modelo de vesículas extracelulares, ou incorporándoos en hidroxeis.