

**UNIVERSIDAD DE SONORA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS DE INGENIERÍA**

**DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN POLÍMEROS Y MATERIALES**

**Interacción Quitosano-Colesterol y Quitosano-Ácido  
Estéarico en la Interfase Agua-Aire**

**TESIS**

**Que para obtener el Grado de:**

**MAESTRÍA EN POLÍMEROS Y MATERIALES**

**Presenta:**

**Hilda Parra Barraza**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos  
hará mi grandeza”



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

# ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABLAS.....	IV
RESUMEN .....	V
OBJETIVOS .....	IX
JUSTIFICACIÓN .....	X
INTRODUCCIÓN .....	1
ANTECEDENTES .....	3
Historia del quitosano.....	3
Estructura química.....	6
Aplicaciones del quitosano.....	9
Ácidos grasos.....	10
Colesterol.....	11
Superficies, Interfases y Monocapas.....	16
Interfase agua-aire.....	19
Tensión superficial.....	22
Tensión superficial como fuerza por unidad de longitud.....	23
Tensión superficial como energía libre de exceso.....	23
Tensión superficial y sus relaciones termodinámicas.....	24
Placa de Wilhelmy.....	27
Isotermas y Monocapa de Langmuir.....	30
Parámetros que modifican la isoterma.....	34
Historia de las Monocapas de Langmuir.....	34
Monocapas de Langmuir.....	39
Formación de multicapas.....	43
Estudio de las monocapas de Langmuir.....	48
Colapsado de las monocapas de Langmuir.....	48
Módulo de compresibilidad.....	49
Sustratos utilizados para transferir monocapas de Langmuir .....	50
Aplicaciones de las monocapas de Langmuir.....	51
Métodos experimentales.....	53
Balanza de Langmuir .....	53
Microscopia de fuerza atómica.....	55

Modos de operación.....	57
Modo contacto.....	57
Modo no contacto.....	58
Espectroscopia de Infrarrojo.....	61
Resonancia Magnética Nuclear.....	64
Cromatografía Líquida de Alta Resolución.....	64
Simulación Molecular.....	64
Viscosidad Intrínseca.....	65
DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	67
Sustancias.....	67
Obtención del quitosano modificado hidrofóbicamente.....	67
Obtención del cloruro de quitosano.....	68
Preparación de la balanza de Langmuir.....	68
Limpieza de la balanza.....	68
Preparación de las muestras para la formación de la película.....	69
Deposito de las moléculas.....	70
Preparación de la película de Langmuir Blodgett.....	71
Caracterización de la película por microscopia de fuerza atómica (AFM).....	71
Caracterización de los complejos Quitosano-colesterol y Quitosano-Ácido esteárico por Espectroscopia de Infrarrojo (IR).....	72
Caracterización del grados de acetilación de los quitosanos por Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	72
Estudios de adsorción de colesterol por los diferentes quitosanos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC.....	72
Simulación molecular de los complejos Quitosano-colesterol y Quitosano-Ácido esteárico.....	73
Caracterización de Peso Molecular por viscosidad intrínseca.....	73
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	74
Caracterización de los diferentes quitosanos %DA, %DS y PM.....	74
Isotherma de Langmuir.....	75
Microscopia de Fuerza Atómica.....	86
Análisis de Infrarrojo.....	94
Cromatografía Líquida de Alta Resolución.....	96
Simulación molecular.....	98
CONCLUSIONES.....	101
BIBLIOGRAFÍA.....	102
ARTICULO CORRESPONDIENTE AL TRABAJO.....	105

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Muestra la estructura de la quitina .....	4
Figura 2. Muestra el esquema de la producción de los derivados de la quitina .....	5
Figura 3. Representación de la estructura química del quitosano .....	7
Figura 4. Ácido graso completamente saturado.....	12
Figura 5. Molécula del colesterol.....	13
Figura 6. Biopsias en donde se tienen diferentes tipos de cristales de colesterol.....	15
Figura 7. Muestra la interfase vidrio-aire .....	18
Figura 8. Muestra la interfase agua-aceite .....	20
Figura 9. Ilustración esquemática de la interacción de las moléculas en la interfase y en el bulto .....	21
Figura 10. Película de jabón .....	25
Figura 11. Placa de Wilhelmy .....	28
Figura 12. Isoterma generalizada para los ácidos grasos .....	32
Figura 13. Balanza de Langmuir.....	38
Figura 14. Monocapa de Langmuir.....	41
Figura 15. Formación de una monocapa de Langmuir y obtención de la isoterma...	42
Figura 16. Transferencia de una monocapa de Langmuir a un sustrato sólido.....	44
Figura 17. Transferencia de monocapa de Langmuir a un sustrato hidrofílico e hidrofóbico respectivamente.....	46
Figura 18. Tipos de deposición.....	47
Figura 19. Balanza de Langmuir .....	54
Figura 20 .Muestra la curva de van der Waals.....	58
Figura 21. Sistema de detección para desviación del haz láser en el AFM .....	60
Figura 22. Muestra el microscopio de AFM .....	62
Figura 23. Muestran las isotermas del colesterol y quitosano – colesterol en la interfase aire-agua. Los diferentes quitosanos utilizados fueron disueltos en HCl 0.2M a una concentración de 0.01% w/w.....	76
Figura 24. Se muestran las isotermas de colesterol puro y QMPM–colesterol en la interfase aire-agua. Las tres diferentes concentraciones de quitosano fueron disueltos en HCl 0.2 M. ....	77
Figura 25. Se muestran las isotermas de ácido esteárico puro y quitosano-ácido esteárico en la interfase aire-agua. Los diferentes quitosanos fueron disueltos en HCl 0.2 M a una concentración de 0.01% w/w. ....	81
Figura 26. Se muestran las isotermas de ácido esteárico puro y QMPM - ácido esteárico en la interfase aire-agua. Las diferentes concentraciones de QMPM se disolvieron en HCl0.2 .....	84

Figura. 27 Muestra imágenes de AFM de las mezclas de colesterol con QMPM para dos diferentes concentraciones. a) QMPM obtenido directamente de la solución, b) colesterol puro , c) colesterol – QMPM 0.03 w/w %, d) colesterol-QMPM 0.01 w/w %.....	87
Figura. 28 Muestra imágenes de AFM para dos mezclas de diferentes quitosanos con colesterol obtenidos por la balanza de Langmuir. a) QMH 0.03% w/w con colesterol, b) histograma de Alturas del QMH con colesterol, c) QHMP 0.03% con colesterol, d) Histograma de altura del QHPM con colesterol.....	90
Figura 29 Muestra imágenes de AFM de las mezclas de QMPM con ácido esteárico para dos concentraciones diferentes de quitosano. a) ácido esteárico, b) QMPM 0.03% con ácido esteárico, c) QMPM 01% con ácido esteárico, d) Histograma de altura para el QMPM con ácido esteárico .....	91
Figura 30 Muestra imágenes de AFM para dos quitosanos diferentes mezclados con ácido esteárico obtenidos de la balanza de Langmuir. a) QHM 0.03% con ácido esteárico, b) histograma de altura del QHM con ácido esteárico, c) QHPM 0.03% con ácido esteárico d) histograma de Alturas de QHPM con ácido esteárico. ....	93
Figura 31 Espectro de Infrarrojo del quitosano-ácido esteárico.....	95
Figura 32 Estructura molecular quitosano-ácido esteárico calculada con Mecánica Molecular (UFF).....	99
Figura 33 Estructura molecular quitosano-colesterol calculada con Mecánica Molecular (UFF).....	100

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Caracterización de los diferentes quitosanos utilizados, %DA, %DS y PM.....	74
Tabla 2 Muestra el área extrapolada ( $A_{ex}$ ), área 'limite de condensación' ( $A_o$ ), y módulos de compresibilidad máximas ( $C_s^{-1}$ ) y el área $A_M$ de las isothermas $\pi - A$ del colesterol y quitosano-colesterol en la interfase aire / agua para diferentes concentraciones de quitosano.....	79
Tabla 3 Muestra el área extrapolada ( $A_{ex}$ ), el área 'limite de condensación' ( $A_o$ ), módulos de compresibilidad máximas ( $C_s^{-1}$ ) Y el área molecular $A_M$ de las isothermas $\pi - A$ de ácido esteárico puro y ácido esteárico - quitosano en la interfase aire / agua para diferentes concentraciones de quitosano.....	85
Tabla 4. Muestra los picos de altura máxima y el grado de rugosidad (rms) de las superficie, observados en el histograma de alturas para el ácido esteárico, colesterol, diferentes quitosanos y sus complejos obtenidos sobre mica.....	89
Tabla 5. Muestra la adsorción del colesterol por los diferentes quitosanos por HPLC. Dos concentraciones de colesterol en cloroformo fueron utilizadas y se mezclaron 10 ml de solución con cada muestra de quitosano (0.1g).....	97

## Resumen

En este trabajo reportamos isotermas de colesterol y ácido esteárico en la interfase agua aire modificadas por diferentes quitosanos (cloruro de quitosano, quitosano de medio peso molecular (QMPM), quitosano de alto peso molecular (QHPM), y quitosano modificado hidrofóbicamente (QMH) en la subfase acuosa. Las películas de Langmuir de los complejos quitosano-colesterol y quitosano-ácido esteárico fueron analizadas por microscopia de fuerza atómica (AFM) y se realizó simulación molecular para visualizar la interacción quitosano-lípido. Se obtuvieron fuertes modificaciones en la isoterma debido a la interacción del quitosano con colesterol y/o ácido esteárico en la interfase aire agua. Estas modificaciones dependen del tipo y concentración de quitosano, severas modificaciones de todas las fases fueron observadas con áreas moleculares grandes y los cambios en los módulos de compresión dependen del quitosano utilizado. El complejo quitosano-ácido esteárico es más flexible que el complejo quitosano-colesterol. Imágenes de AFM demostraron que el quitosano fue desagregado por la interacción con colesterol y ácido esteárico produciendo superficies más homogéneas. El quitosano hidrofóbico muestra mas afinidad con ácido esteárico, el quitosano de medio peso molecular y el quitosano de alto peso molecular producen superficies homogéneas con el colesterol. La simulación molecular de las cadenas de quitosano demostraron la interacción con colesterol y ácido esteárico, mostrando la posibilidad de la existencia de sitios específicos para la formación de puentes de hidrógeno entre estas moléculas. La adsorción del colesterol por los diferentes polvos de quitosano fue estudiada por HPLC, mostrando que el quitosano de medio y alto peso molecular pueden retener proporciones altas de colesterol comparada con las otras muestras analizadas.



## **Objetivo general**

Estudiar los aspectos físicoquímicas de la interacción Quitosano-Colesterol y Quitosano-ácido esteárico en sistemas de monocapas de Langmuir y Langmuir Blodgett, y en estado sólido y mediante un modelo de simulación molecular

## **Objetivos específicos**

- Estudiar las isotermas de ácido esteárico y colesterol en agua.
- Estudiar las isotermas de ácido esteárico y colesterol utilizando diferentes soluciones de quitosano.
- Estudiar la influencia de la concentración del quitosano.
- Obtener monocapas de ácido esteárico y colesterol y observarlas por fuerza atómica.
- Observar la formación del complejo quitosano-colesterol y quitosano-ácido esteárico mediante AFM.
- Estudiar la formación de los complejos quitosano-colesterol y quitosano-ácido esteárico mediante análisis de espectroscopia de infrarrojo.

## **Justificación**

El quitosano es un polisacárido que se obtiene a partir de la quitina la cual se encuentra en estado natural en los crustáceos y en las paredes celulares de algunos hongos, pero actualmente la única fuente de producción es la hidrólisis de la quitina en medio alcalino. La presencia de grupos aminos en la cadena polimérica han hecho del quitosano uno de los materiales más versátiles que se estudian desde hace algún tiempo por la posibilidad de realizar una amplia variedad de modificaciones tales como, reacciones de anclaje de enzimas, reacciones de injerto, obtención de películas entrecruzadas, etc., de las cuales se obtienen materiales con propiedades adecuadas para diversas aplicaciones tecnológicas. En la industria farmacéutica se utiliza en grandes volúmenes como atrapador de grasas en el estómago. En la actualidad, existen en el mercado una amplia variedad de productos que utilizan quitosano como reductor de peso corporal, y además como un agente que ayuda a la disminución de colesterol y triglicéridos. A pesar del éxito de mercado de estas aplicaciones no se cuenta con un respaldo científico que especifique un mecanismo por el cual el quitosano disminuye los niveles de colesterol y triglicéridos. Debido a esto nosotros iniciamos este estudio para poder comprender como interaccionan el quitosano con el colesterol y el ácido esteárico.

## INTRODUCCIÓN

El quitosano es un polisacárido preparado convencionalmente por la deacetilación de la quitina en medio alcalino (1,2). La cual es un componente estructural del exoesqueleto de crustáceos e insectos y de la pared celular de hongos y levaduras. El quitosano tiene un uso potencial en varias áreas incluidas la aplicación en cosméticos (3) biotecnología y medicina (4). En estas aplicaciones el quitosano interactúa generalmente con superficies biomembranosas. El quitosano se utiliza en varios países como suplemento dietético para el consumo humano, la eficiencia mostrada del quitosano para reducir la hipercolesterolemia, hipertensión y sobrepeso estimuló la producción industrial de tabletas de quitosano a pesar del insuficiente conocimiento científico acerca de la reacción del quitosano con lípidos. Aun cuando se conoce que la naturaleza catiónica del quitosano lo hace particularmente ajustable para capturar ácidos grasos y ácidos biliares, la información acerca de la interacción del quitosano con lípidos es escasa. (5).

El mecanismo de interacción entre polielectrólitos y gotas de lípidos en el intestino es desconocido. La interacción entre el quitosano y un polielectrólito catiónico y lípidos emulsificados ha sido analizada por Faldt y colaboradores (6). Ellos sugieren que el quitosano puede cubrir partículas de lípidos cargados negativamente en el intestino y este proceso es ligado a la influencia de remoción de lípidos del tracto intestinal.

La interacción quitosano y lecitina fue estudiada por Magdassi, Bach y Mumcuoglu (7,8), los cuales compararon la capacidad de enlace del lípido con el quitosano en términos de la capacidad de retención del aceite, la capacidad de unión con el colesterol y ácido bílico. Como lo mencionó Muzarelli y colaboradores(5), es evidente que es interesante examinar la habilidad de colectar lípidos por quitosanos altamente catiónicos y quitosanos

hidrofóbicos para verificar si la densidad de carga es un aspecto clave. Por otra parte la formación de agregados hidrofóbicos parece tener un efecto sobre la capacidad de secuestrar lípidos por el quitosano y sobre la asociación quitosano-ácido bílico. Muzarelli y colaboradores(5)concluyen que ciertos componentes del aceite de oliva pueden ser retenidos en la fracción del aceite cuya absorción la inhibe la quitina o derivados de la quitina. Además, en este mismo grupo observaron que ciertos esteroides que interactúan efectivamente con polisacáridos y estos pueden implicar que el colesterol puede ser un poderoso análogo de dichos esteroides.

La interacción de lípidos con algunas macromoléculas ha sido investigada en la interfase agua aire con la ayuda de la balanza de Langmuir, tomando en cuenta las interacciones electrostáticas entre la parte anfifílica de los lípidos depositado sobre la interfase agua aire y las macromoléculas cargadas como el DNA (9,10) y proteínas (11-13) en la subfase. En esta tesis se estudió la interacción del colesterol y ácido esteárico con diferentes quitosanos en la interfase agua-aire analizando los cambios en las isothermas producidas por la interacción de estos lípidos y el quitosano. Las películas de Langmuir Blodgett (película delgada de grosos molecular insoluble en agua y que se encuentra en la interfase aire-agua, la cual se transfiere a un sustrato sólido) de las mezclas fueron analizadas por microscopia de fuerza atómica y un modelo de simulación molecular fue propuesto para entender la interacción quitosano-lípido. La absorción de colesterol del quitosano fue analizado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

## ANTECEDENTES

### Quitosano, Ácidos Grasos y Colesterol

#### **Historia del quitosano**

Por su amplia distribución en la naturaleza la quitina es el segundo polisacárido más abundante en el mundo después de la celulosa. Fue descubierta por Braconnot en 1811 cuando estudiaba las sustancias derivadas del *Agaricus volvaceus* y otros hongos. Posteriormente Odier en 1823, en un artículo sobre insectos reportó que había encontrado en algunos insectos la misma sustancia que forma la estructura de las plantas, llamándola quitina (del griego "tunic", envoltura).

Payen, inició una controversia que duró más de cien años sobre las diferencias entre la quitina y la celulosa, en parte por que se pensaba que la presencia de nitrógeno reportada en algunas investigaciones se debía a residuos de proteínas que no podían ser completamente eliminadas de las muestras (7).

La quitina es completamente insoluble en agua o en medio ácido. Su estructura química se muestra en la Figura 1. Por su parte, el quitosano es también un polisacárido que se encuentra en estado natural en las paredes celulares en algunos hongos, sin embargo, su principal fuente de producción es la hidrólisis de la quitina en medio alcalino, usualmente hidróxido de sodio o de potasio a altas temperaturas. El quitosano fue descubierto por Rouget en 1859, quien encontró que al tratar quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio se obtiene un producto soluble en ácidos orgánicos. Esta quitina modificada como el la llamó, se tornaba de color violeta en soluciones diluidas de yoduro y ácido. Más tarde, en 1894, fue estudiada por Hoppe-Seyler quien la denominó quitosano. En la Figura 2 se aprecian los pasos elementales en la obtención del quitosano:

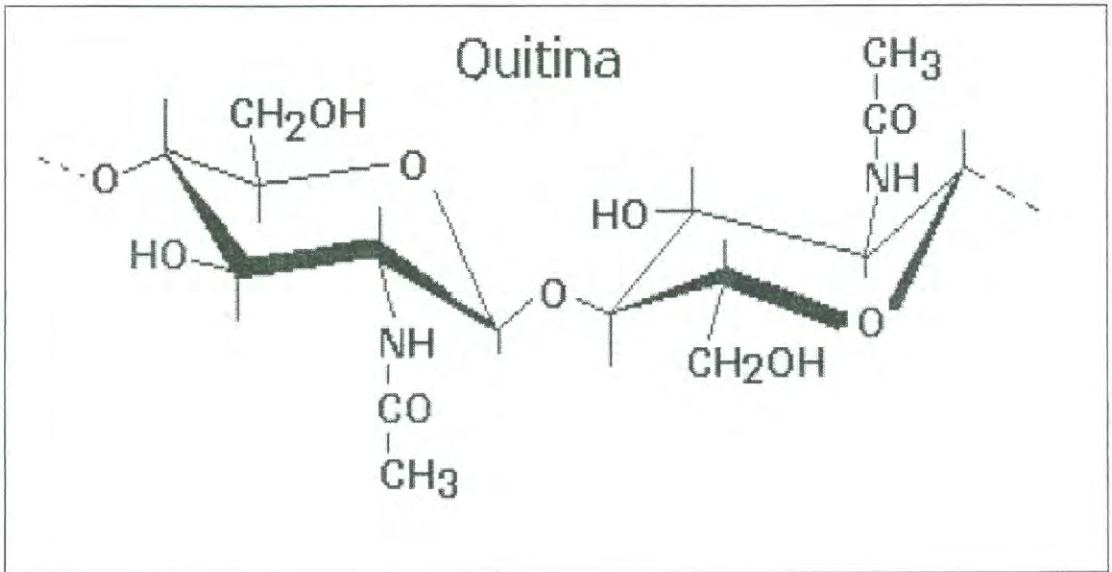


Figura 1. Muestra la estructura de la quitina



Figura 2. Muestra el esquema de la producción de los derivados de la quitina.

## Estructura química

Químicamente la estructura de la quitina es parecida a la celulosa, con la sustitución de un oxhidrilo(2) por grupos acetilamino, es una por tanto una macromolécula lineal neutra constituida por *N*-acetilglucosamina polimerizada.

El quitosano es un polisacárido formado predominantemente por unidades repetidas de  $\beta$  (1-4) -2- amino -2 -deoxi-*D*-glucosa o *D*-glucosamina (12). La quitina es fácilmente transformada en una variedad de materiales con propiedades químicas y mecánicas diversas. La modificación de quitina a quitosano por medio de la acetilación es común. otras reacciones típicas de derivatización de quitina y quitosano incluyen carboximetilación, sulfonación, acetilación o bien adición de grupos funcionales a los sitios aminos(aunque también el C-6 puede ser afectado). Estas modificaciones pueden cambiar las propiedades funcionales del quitosano y la quitina, alterando la habilidad para adsorber agua, la permeabilidad, la capacidad de gelificación, la resistencia de las películas y fibras, liberación de metales adsorbidos.

Cuando la desacetilación del material es incompleta se crea una mezcla de cadenas que tienen distintas proporciones de unidades  $\beta$ (1-4)-2-acetamida-2-desoxi-*D*-glucosa y  $\beta$ (1-4)-2-amino-2-desoxi-*D*-glucosa, cuya relación depende de las condiciones de reacción y que genera materiales con distintas propiedades denominados quitosanos. La diferencia en las propiedades de estos materiales en medio acuoso puede llegar a ser notable, como por ejemplo la distinta solubilidad en medio acuoso que pueden llegar a tener. La estructura química del quitosano se muestra a continuación en la Figura 3.



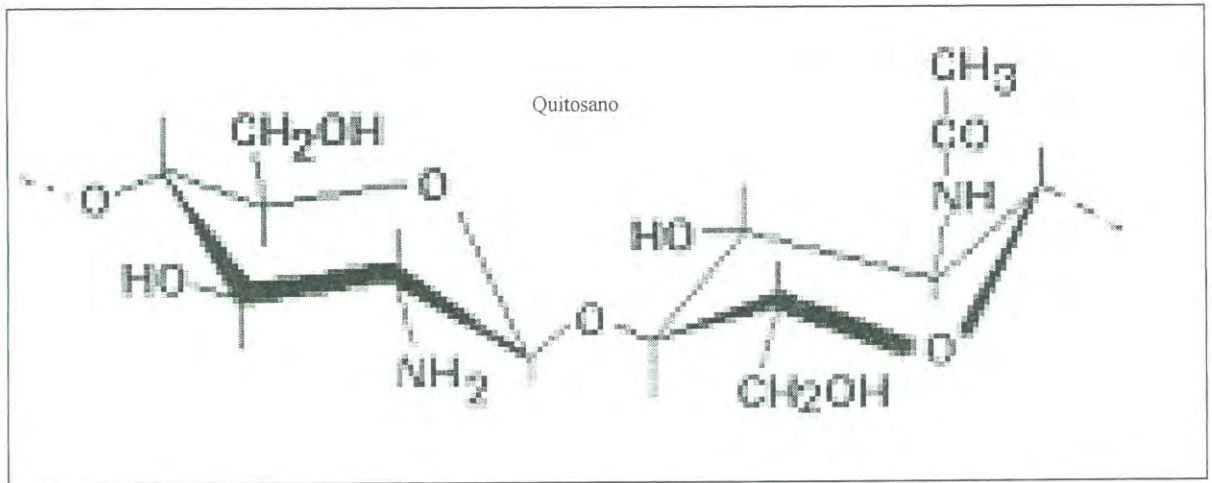


Figura 3. Representación de la estructura química del quitosano

La presencia de grupos aminos en la cadena polimérica ha hecho del quitosano uno de los materiales más versátiles que se estudian desde hace ya algún tiempo, por la posibilidad de realizar una amplia variedad de modificaciones, tales como las reacciones de anclaje de enzimas, reacciones de injerto, obtención de películas entrecruzadas, etc. De las cuales, se obtienen materiales con propiedades adecuadas para aplicaciones inmediatas y futuras en biotecnología, biomedicina, agricultura.

La importancia del quitosano se puso de relieve a finales de los setenta cuando apareció el libro Chitin de R.A Muzarelli en 1977 (3) y se realizó la primera conferencia internacional sobre quitina y quitosano en 1978. También en Iberoamérica se ha venido trabajando con el quitosano y en el 2000 se celebró en la Habana el primer simposium Latinoamericano de quitina y quitosano, en el marco de XI simposio latinoamericano de polímeros (SLAP) (14).

La capacidad del quitosano para formar complejos con lípidos ha sido estudiada en el tratamiento para remover fragmentos de grasa de la leche. Estos lípidos aparecen dispersos en su forma coloidal estable, y son responsables de la turbidez. La adición de quitosano remueve más del 95% de la turbidez del queso a un pH óptimo cerca de 4.5 donde el máximo de floculación y precipitación ocurre. (3)

Se ha establecido que el quitosano no puede ser digerido por humanos por lo que se considera como fibra dietética con nulo contenido calórico. El quitosano disminuye los niveles de colesterol del suero y del hígado en ratas alimentadas con colesterol sin afectar el desempeño de los órganos.(3)

El mecanismo específico por el cual el quitosano disminuye los niveles de colesterol no está entendido claramente. Dos posibles mecanismos han sido sugeridos: 1)El quitosano se enlaza al ácido bílico y/o forma micelas alteradas. Se conoce que la ingestión del quitosano

tiene un efecto en los ácidos bilícos usados por el cuerpo para emulsificar el contenido de agua en el estómago tales como los lípidos y el colesterol. Estos previenen o evitan el transporte de lípidos no emulsificados a través de la mucosa del intestino. 2) También se ha postulado que el quitosano atrapa algunas de las micelas que contienen colesterol mientras se precipitan en el intestino delgado (es decir de la solución viscosa del pH ácido del estómago) (3).

### **Aplicaciones del quitosano**

Dado el gran número de trabajos que existen sobre este versátil biopolímero es conveniente realizar una clasificación por área sobre las aplicaciones que se le han ido dando. A continuación se presentan algunas de ellas (12,14,15).

#### **Química analítica:**

Aplicaciones cromatográficas, con intercambiadores de iones, absorción de iones de metales pesados y absorción de ácidos, fabricación de electrodos específicos para metales.

#### **Biomedicina:**

Membrana de hemodiálisis, suturas biodegradables, sustituyentes artificiales de piel, agentes cicatrizantes en quemaduras, sistemas liberadores de fármacos, liberación de insulina, transporte de agentes anticancerígenos, tratamientos de tumores, control del virus del SIDA.

#### **Agricultura y ganadería:**

Recubrimiento de semillas para su conservación durante el almacenamiento, aditivo para alimento de animales y en formulación de pesticidas.

#### **Dietéticos:**

Adelgazantes, existen una amplia variedad de productos comerciales que ofrecen el polímero como un capturador de grasas en el estómago.

**Industria:**

Del papel, textil y alimentaria (soporte para la inmovilización de enzimas en la producción de maltosa, espesante, agente de oxidación controlada, agente preservante).

**Tratamiento de agua:**

Agente floculante, agente coagulante, tratamientos de floculación para la remoción de aceite de pescado en agua, agentes filtrantes para piscinas, remoción de metales, remoción de surfactantes, etc. (12,14,15).

### Ácidos Grasos

El ácido graso es la unidad química básica de todas las grasas; un ácido graso está compuesto por una cadena de carbonos, con un grupo carboxílico en un extremo de la cadena, y un grupo metilo (un carbono rodeado por tres hidrógenos) en el otro extremo. Se utilizan los términos de saturado o no saturado para indicar la estructura química de un ácido graso (18).

*Saturado:* describe un ácido graso en el cual cada átomo de carbono en la cadena está unido únicamente por enlaces covalentes simples. La Figura 4 representa la molécula del ácido esteárico, la cual es una de las grasas saturadas más estudiadas. El ácido esteárico tiene 18 de sus carbonos saturados, mientras que el ácido araquídico presenta una cadena más larga, de 20 carbonos saturados.

*Insaturado* se refiere a un ácido graso en el cual al menos un par de carbonos se encuentran formando un doble enlace entre sí ejemplos de ellos son, ácido linoleico (tiene 18 átomos de C y un doble enlace) y oleico (con 18 átomos de carbono y dos dobles enlaces) en su cadena.

La mayoría de los ácidos grasos insaturados se encuentran en vegetales, aceites naturales como cacahuete, nuez y olivo, así como en diferente tipo de semillas y pescados. A temperatura ambiente éste tipo de grasas se comportan como líquidos y se esparcen fácilmente. Algo que importante de mencionar es que los ácidos grasos saturados incrementan la cantidad de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y disminuyen la cantidad de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Las LDL son las responsables de llevar el colesterol y depositarlo en los vasos sanguíneos, mientras de las HDL son las responsables de remover el colesterol y depositarlo en el hígado para luego ser reciclado al torrente sanguíneo.

### Colesterol

La molécula del colesterol se presenta en la Figura 5. Esta molécula es el esterol mas abundante en los tejidos animales, es un componente de las membranas celulares, de lipoproteínas del plasma y es un precursor en la biosíntesis de las sales biliares y hormonas. Recientemente, se ha encontrado evidencia de que controlan las propiedades mecánicas de las membranas celulares, el colesterol, junto con los esfingolípidos puede forma, dominios orgánicos (26, 27), que participan en la distribución de proteínas en la superficie de la célula, en la transducción de señales de la célula y en la activación de la inmuno respuesta. Niveles fisiológicos anormales de colesterol (colesterol alto) pueden desarrollar una precipitación perjudicial de cristales de colesterol que están asociados con las placas artereoscleróticas (28), con artritis reumatoide, y con los cálculos biliares.

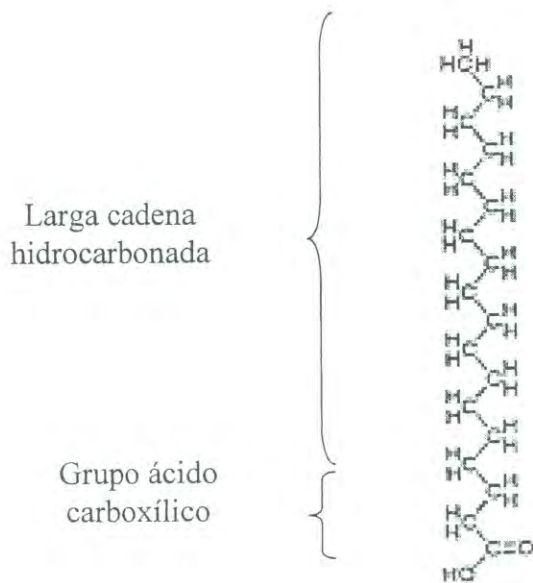


Figura 4. Ácido graso completamente saturado.

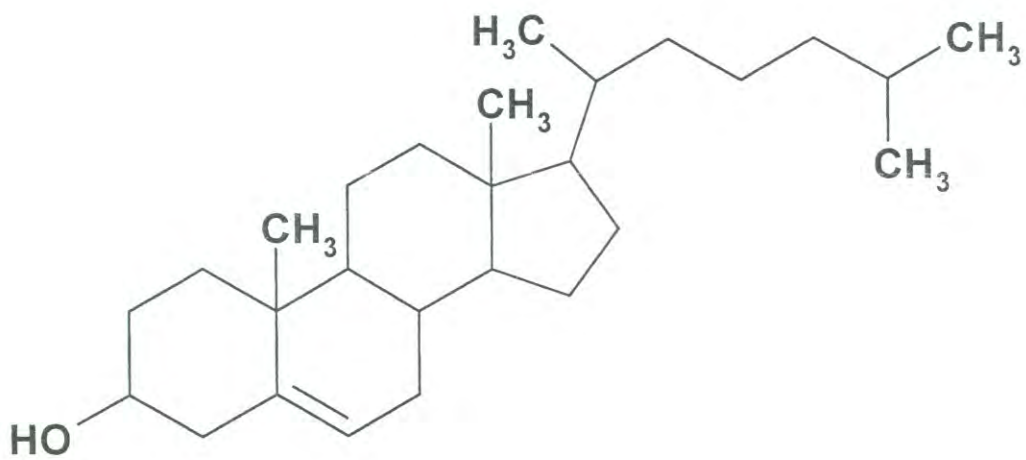
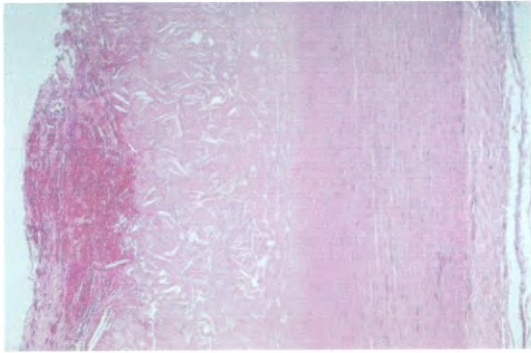


Figura 5. Molécula del colesterol

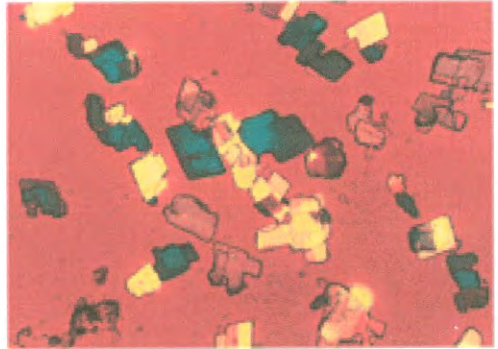
En las placas arteroescleróticas Figura 6a), el colesterol tiene la forma morfológica de barras que aparentemente tienen forma de agujas pero a mayores magnificaciones actualmente se tiene una sección transversal rectangular. El tejido fino que rodea esas barras es tejido muerto, los cristales de colesterol se pueden asociar con la inflamación cuando hay necrosis implicada. Cuando el material se rompe de la placa en el torrente sanguíneo puede causar coágulos de sangre, responsables de infartos al miocardio, derrames, y de gangrena, entre otros problemas de salud. Los cristales de colesterol están también presentes en artritis reumatoide, pero estos cristales tienen diferente forma que los encontrados en las placas arteroescleróticas. Se caracterizan por tener una forma de plato cuadrado o rectangular Figura 6b), hechas por su tendencia a adherirse a una otra superficie. Normalmente presentan una grieta fácil de identificar.

Algunos factores ayudan al colesterol para que su agregación y crecimiento en la formación de los cálculos biliares. La bilis, en una dispersión acuosa secretada del hígado es heterogénea en composición contiene mayormente sales, fosfolípidos y colesterol libre en una relación fisiológica aproximada de 7:3:1, respectivamente. Muchos otros componentes están presentes en la bilis a bajas concentraciones, por ejemplo las glicoproteínas. Con la absorción del agua en el sistema biliar se forman micelas y vesículas que solubilizan el colesterol. Las vesículas son mucho más eficientes en la solubilidad del colesterol que las micelas, requiriendo solamente una molécula de fosfolípido para solubi-





(a)



(b)

Figura 6. Biopsias en donde se tienen diferentes tipos de cristales de colesterol: a) en forma de barras delgadas (arteroesclerosis) y b) en forma de placas cuadradas o rectangulares (artritis reumática).

lizar una molécula de colesterol, se ha demostrado por microscopia electrónica y difracción de rayos X que una razón alta vesicular de colesterol-fosfolípido favorece la cristalización del colesterol. Además, el patrón de difracción de rayos X del polvo obtenido de filamentos de cristales de colesterol en una solución biliar se ha interpretado como un cristal polimórfico desconocido de colesterol. Por otro lado, el calcio incrementa la velocidad de crecimiento de los cristales, las glicoproteínas forman una matriz que ayuda a agregar los cristales, etc. En general la cristalización del colesterol es de gran importancia en medicina.

### **Superficies, Interfases y Monocapas**

El objetivo de la ciencia de superficie e interfase es la descripción de los fenómenos interfaciales sobre la base de la estructura y las interacciones moleculares. Podemos ir un poco más lejos de esta definición general, si pensamos que una monocapa de Langmuir es un sistema único en el que podemos hacer química y física en dos dimensiones. Estas tienen aplicaciones potenciales desde el punto de vista de ciencia básica así como de desarrollo tecnológico.

En los años recientes el avance que se ha realizado en el entendimiento de las superficies e interfases fluidas ha sido realmente espectacular, tanto desde el punto de vista estructural como de su comportamiento dinámico. Fenómenos como la adhesión o el mojado o la relación entre la estructura química y la actividad superficial han sido estudiados durante años y los conocimientos desarrollados se encuentran ya en una amplia aplicación industrial y tecnológica. (16)

El estudio de los fenómenos de superficie ha ocupado siempre un importante espacio dentro de la ciencia de coloides, aunque mucho del trabajo más significativo se ha desarrollado en el último siglo debido a importantes contribuciones realizadas por distintos

investigadores y a la refinación de los métodos experimentales utilizados para estudiar dichos fenómenos.

Es un hecho bien conocido que cuando un líquido es depositado sobre una superficie sólida, el líquido tiende a esparcirse tratando de ocupar la mayor cantidad de superficie disponible, siempre y cuando no exista una barrera externa que le impida continuar, esto se debe a que la fuerza de enlace entre sus moléculas no tienen una rigidez tan grande como la que presenta un sólido (orden), ni la libertad absoluta que tienen las moléculas en la expansión libre de un gas (desorden). Así que podemos afirmar que las moléculas de un líquido tienen un grado de libertad medio, ya que continuamente se encuentran atrayéndose unas a otras (grado de desorden medio), lo cual que le concede al líquido la capacidad de tomar la forma del recipiente que lo contiene.

La manera a través de la cual el líquido se esparce en la superficie del sólido va a depender de parámetros característicos tanto del líquido como de la superficie, así como el medio bajo el cual se encuentra el líquido, ya que éste está en la interfase de dos medios y la densidad del medio bajo la que se encuentra el líquido puede ser importante. Algunos de los parámetros característicos del líquido podrían ser su viscosidad, densidad, peso molecular y la tensión superficial, entre otros. De la superficie podrían ser su porosidad, composición química, etc. Como un ejemplo de esto podemos mencionar lo que pasa cuando se derrama un vaso de agua sobre una mesa con superficie de vidrio, en este caso el agua se encuentra en la interfase vidrio-aire formando una película delgada de algunos cuantos milímetros (Figura 7).

Agua  
Interfase  
Vidrio



Aire

Figura 7. Interfase vidrio-aire

Por otro lado, cuando en un recipiente se mezcla agua con aceite podemos ver que el aceite, debido a que no es soluble en agua, tiende a separarse del agua permaneciendo arriba de ésta, ya que el agua tiene una mayor densidad y en este caso el agua hace el papel de superficie o subfase y el aceite es el líquido presente en la interfase agua-aire. Por lo tanto, podemos decir que se forma una especie de capa en la interfase (Figura 8).

En muchas ocasiones donde el líquido depositado cubre toda la superficie de la subfase, la película formada tiende a romperse y a nuclear regiones de mayor densidad (pequeñas gotas), dando lugar también a regiones de secado de la superficie. Películas delgadas formadas por la deposición de líquidos en sólidos están presentes en muchas situaciones de la vida diaria. Por ejemplo, sirven como películas lubricantes en la cornea de los ojos, en el escurrimiento de pinturas, adsorción en medios porosos, así como también en en los pistones de motores en automóviles (16,2). En la mayoría de los casos de desarrollo tecnológico se requiere que estas películas no se fragmenten y sean estables bajo diferentes intervalos de temperaturas y condiciones ambientales, las películas semiconductoras pertenecen a un extenso campo de estudio en el cual se trata de encontrar la mayor estabilidad de la película para grosores cada vez menores, para lograr así la construcción de dispositivos electrónicos cada vez mas diminutos, es por eso que existe el interés de conocer que fuerzas intervienen y gobiernan en la interfase a nivel microscópico(17).

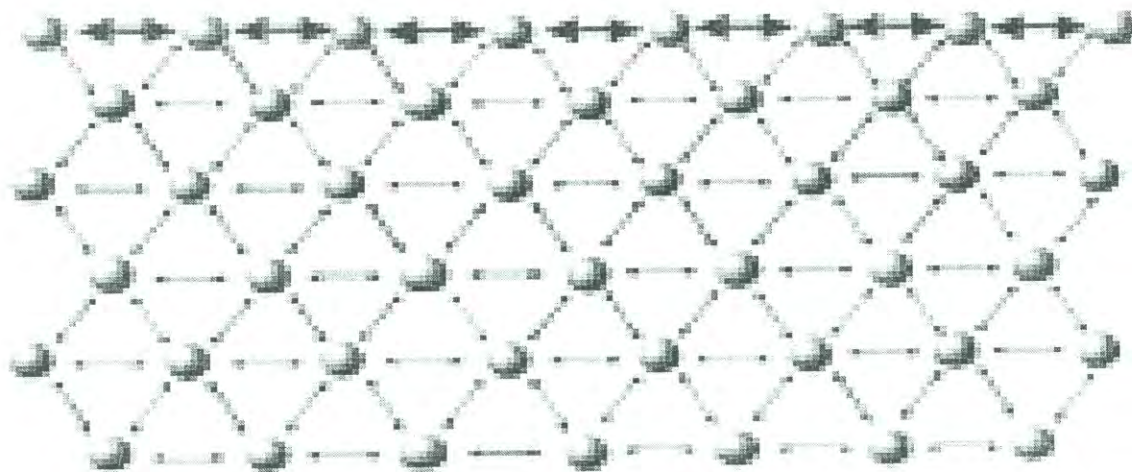
### **Interfase Aire-Agua**

Las moléculas de un líquido tienen cierto grado de atracción entre ellas, este grado de atracción, también llamado cohesión, es dependiente de las propiedades de la sustancia. Las interacciones de una molécula en cierto volumen de un líquido son balanceadas por fuerzas atractivas de igual magnitud en todas direcciones como se muestra en la Figura 9.



Figura 8. Interfase agua aceite

Aire



Líquido

Figura 9. Ilustración esquemática de la interacción de las moléculas en la interfase y en el bulto.

Las moléculas en la superficie de un líquido experimentan un desequilibrio de fuerzas, es decir, una molécula en la interfase agua-aire tiene una mayor atracción hacia la fase líquida que hacia la fase aire o fase gas. (10,20) por lo tanto existirá una fuerza neta atractiva hacia el volumen del líquido y en la interfase agua-aire se minimizará espontáneamente su área.

El efecto de esta situación es la presencia de energía libre en la superficie. El exceso de esta energía es llamada *energía libre superficial* y puede ser cuantificado como una medida de energía por área. La tensión superficial  $\gamma$ , es la medida de energía cohesiva presente en la interfase. Las unidades de la tensión superficial son dinas/cm o mN/m. Los sólidos pueden tener una energía libre superficial en sus interfases, pero es imposible obtener mediciones directas de su valor mediante técnicas utilizadas para líquidos.

Los líquidos polares tales como el agua, tienen interacciones intermoleculares muy fuertes y por lo tanto una tensión superficial grande. Cualquier factor que disminuya las interacciones intermoleculares disminuirá la tensión superficial. Por consiguiente, un incremento en la temperatura de este sistema bajará la tensión superficial; cualquier contaminante, especialmente los surfactantes, disminuirán la tensión superficial (16). La tensión superficial se define como una fuerza por unidad de longitud o una energía por unidad de área, más precisamente se define como la fuerza que actúa en ángulo recto a cualquier línea de longitud unitaria en la superficie del líquido. Es conveniente definirla en términos de energía cuando no sea clara la existencia de tal fuerza tangencial, tal como lo es la superficie de un líquido.



## La tensión superficial como fuerza por unidad de longitud

La superficie de un líquido parece ser estirada por el líquido que engloba, por ejemplo la formación de gotas de agua en algunas superficies y el ascenso de los líquidos en capilares, este efecto se mide cuantitativamente por la  $\gamma$ ; es una fuerza que actúa en la superficie y es dirigida perpendicularmente hacia dentro a partir de la superficie y tiende a hacer decrecer el área de la interfase (20).

Una forma de entender más que es la tensión superficial es considerando un anillo de alambre con un lado móvil en el cual se ha formado una película de jabón (Figura 2.3) la tensión superficial de la película causará que el lado móvil se mueva en la dirección que haga decrecer el área, a menos que se le aplique una fuerza contraria  $F$ .

Por lo tanto, es la fuerza que actúa a lo largo de todo el borde de la película y variará con la longitud  $l$  de la parte móvil del alambre. Por tanto, es una fuerza por unidad de longitud del borde la que es propiedad intrínseca de la superficie, y como la película tiene dos caras, la dividimos entre dos de aquí que la tensión superficial este dada por:

$$\gamma = \frac{F}{2l} \quad (2)$$

Las dimensiones de  $\gamma$  son fuerza por unidad de longitud (dinas /cm en el sistema c.g.s o mN/m en el MKS).

## Tensión superficial como energía libre de exceso

En el ejemplo anterior propuesto para la película de jabón en el aro Figura 10, al estirar esta una distancia  $dx$  por una fuerza se realiza un trabajo (20).

$$W' = -Fdx = \frac{\gamma}{dx} \quad (2.1)$$

Esta expresión nos proporciona otra definición de lo que es la tensión superficial (y de energía libre superficial) como el trabajo requerido para aumentar el área de la superficie de manera isotérmica y de manera reversible.

### **La tensión superficial y relaciones termodinámicas**

El trabajo no es una función de estado ya que este proceso depende de la trayectoria. Si analizamos el trabajo que hace un sistema al cambiar su área (20) por ejemplo al reducirla, (será utilizando la notación  $\delta$  para una diferencial inexacta y  $d$  para una diferencial exacta).

$$\delta W' = \gamma dA \quad (2.2)$$

Además de la primera ley de la termodinámica

$$dU = \delta q - \delta W \quad (2.3)$$

Donde  $\delta q$  es el calor absorbido por el sistema y  $\delta W$  el trabajo hecho por el sistema en un proceso estático ( $\delta W \leq 0$ ).

Podemos dividir este trabajo en dos partes, uno que involucre un cambio de volumen  $pdV$ , y otro hecho por medios distintos, es decir

$$\delta W = pdV + \delta W' \quad (2.4)$$

Usando la segunda ley de la termodinámica para un proceso reversible tenemos:

$$\delta q_{rev} = TdS \quad (2.5)$$

Por lo que para un proceso reversible

$$\delta U = \delta q - \delta W = TdS - pdV - \delta W' \quad (2.6)$$

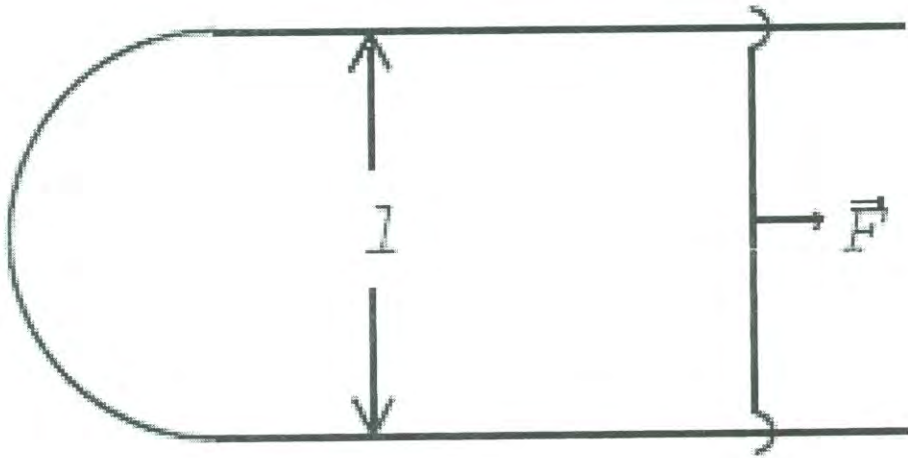


Figura 10. Película de jabón

Considerando la energía libre de Gibbs:

$$dG_{rev} = dU_{rev} + pdV + Vdp - TdS - SdT \quad (2.7)$$

Sustituyendo la ecuación (2.7) ( a p y T ctes )

$$dG_{rev} = -\delta W' \quad (2.8)$$

Se tiene que dG es igual al máximo de trabajo obtenible (que no sea debido a cambios en la presión o en el volumen) por lo tanto tenemos:

$$dG = \gamma dA \quad (2.9)$$

O sea

$$\gamma = \left( \frac{\partial G}{\partial A} \right)_{T, p} = G^s \quad (2.10)$$

Esto es la tensión superficial es igual al incremento en la energía libre de Gibbs por unidad de área ( $G^s$  = energía libre de exceso por unidad de área, los superíndices denotan las cantidades en exceso por unidad de área).

Se puede además relacionar G con la entalpía, usando la relación:

$$G^s = \gamma = H^s - TS^s \quad (2.11)$$

y

$$\left( \frac{\partial G^s}{\partial T} \right)_p = \left( \frac{\partial \gamma}{\partial T} \right)_p = -S^s \quad (2.12)$$

Con lo cual finalmente llegamos a:

$$\gamma = H^s + T \left( \frac{\partial \gamma}{\partial T} \right)_p \quad (2.13)$$

De lo anterior deducimos que si medimos  $\gamma$  para diferentes valores de temperatura, una grafica de  $\gamma$  vs T nos daría una línea recta con pendiente  $\left(\frac{\partial\gamma}{\partial T}\right)_p$  esta última cantidad se puede considerar prácticamente constante para intervalos pequeños de temperatura (20),

De igual manera se puede demostrar que:

$$\gamma = \left(\frac{\partial U}{\partial A}\right)_{S,V,m} \quad (2.14)$$

$$\gamma = \left(\frac{\partial F}{\partial A}\right)_{T,V,m} \quad (2.15)$$

$$\gamma = \left(\frac{\partial H}{\partial A}\right)_{S,P,m} \quad (2.16)$$

Donde F es la energía libre de Helmholtz.

Existen varios métodos para determinar la tensión superficial tales como ascensión capilar, método del anillo, método de volumen o pesada de gota y el método de la placa de Wilhelmy que es el que describiremos a continuación por que es el método empleado para realizar este trabajo.

### **Método de la placa de Wilhelmy:**

Este método es el que utiliza la balanza de Langmuir para monitorear la tensión superficial en las monocapas.

En esencia el método consiste en lo siguiente consideremos una placa o lamina vertical suspendida y sumergida dentro de un líquido como se muestra en la Figura 11.

La tensión superficial del líquido se manifestara en forma de menisco en el contorno de la placa. Este desbalance que ocurre al sumergir la placa se debe al peso del menisco. Como este menisco es mantenido por la tensión superficial, debe haber un desbalance de fuerzas entre ese peso y la fuerza total que empuja hacia arriba. Esta fuerza es la componente vertical de la tensión superficial  $\gamma$ .

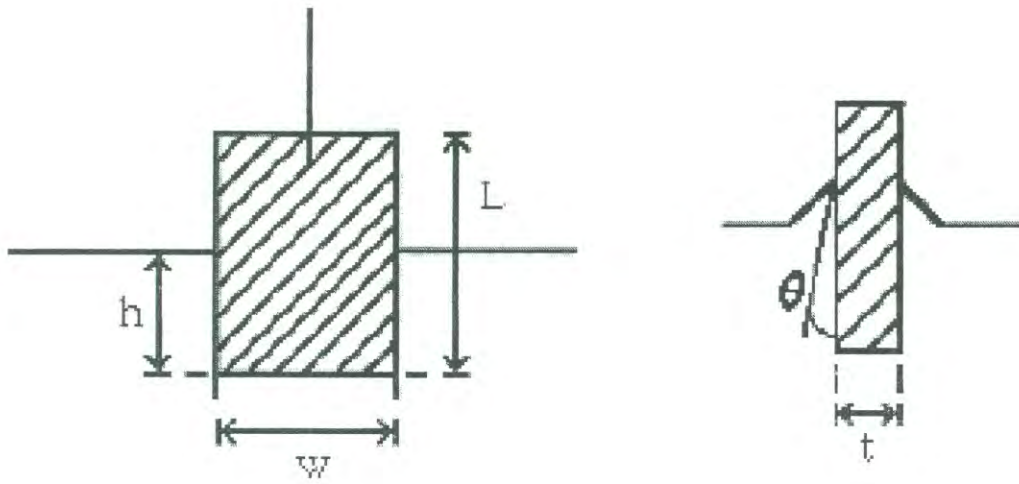


Figura 11. Placa de Wilhelmy

Las fuerzas que actúan sobre la lamina son el peso de la placa, el empuje hacia arriba sobre la parte sumergida y la tensión superficial del líquido sobre la placa. Considerando que  $l$  es la longitud de la placa,  $t_p$  el grosor,  $w$  el ancho y  $h$  la longitud de la placa que se encuentra sumergida: entonces podemos expresar la fuerza que actúa sobre la placa como:

$$F = (\rho_p l w t_p)_g - (\rho_l h w t_p)_g + 2(w + t_p)\gamma \cos \theta \quad (2.17)$$

(Fuerza = peso – empuje hacia arriba + tensión superficial)

Donde  $\rho_p$  es la densidad de la placa,  $\rho_l$  es la densidad del líquido y  $\gamma$  es la tensión superficial del líquido,  $\theta$  es el ángulo de contacto del líquido y  $g$  es la magnitud de la aceleración debida a la gravedad.

En los equipos actuales de medición, normalmente el peso de la placa es compensado y la unidad de control es calibrada a cero; con lo cual eliminamos el termino del peso y tenemos la siguiente ecuación :

$$F = -(\rho_l h w t_p)_g + 2(w + t_p)\gamma \cos \theta \quad (2.18)$$

Ahora cuando la placa es empujada hacia la superficie del líquido, con lo cual  $h$  es muy pequeño y consecuentemente el empuje hacia arriba lo podemos aproximar a un valor de cero y, por lo tanto podemos eliminar el termino debido al empuje.

$$F = 2(w + t_p)\gamma \cos \theta \quad (2.19)$$

Finalmente si el ángulo de contacto del líquido con respecto a la placa es  $0^\circ$ , podemos obtener la expresión reducida a:

$$F = 2(w + t_p)\gamma \quad (2.20)$$

Por lo cual, la tensión superficial sobre la placa quedará expresada como:

$$\gamma = \frac{F}{2(w + t_p)} \quad (2.21)$$

Si  $t_p \ll w$  entonces generalmente la tensión superficial esta dada como:

$$\gamma = \frac{f}{\text{perimetro} - \text{de} - \text{la} - \text{placa}} \quad (2.22)$$

Para un alambre, la tensión superficial sobre éste:

$$\gamma = \frac{F}{\pi d + \pi(d - 2t_a)} \quad (2.23)$$

Donde  $d$  es el diámetro del alambre, y  $t_a$  es la longitud del alambre en metros. La tensión superficial esta dada en mN/m y la fuerza en mN.( 19,20)

### **Isotermas y Monocapas de Langmuir**

La isoterma es el mejor método para obtener información sobre el estado termodinámico que presenta una monocapa a una temperatura dada, ya que a través de las isotermas podemos identificar transiciones de fase que nos indican cambios termodinámicos que ocurren en la monocapa y al mismo tiempo saber el área aproximada que ocupan las moléculas. Desde la primera isoterma obtenida por Agnès Pockels, se aceptó la importancia de su técnica en la comunidad científica y se consideró como fundamental en el estudio de las propiedades termodinámicas de las monocapas de Langmuir. Esto se debe principalmente a la capacidad de controlar la velocidad de compresión de las barreras y medir simultáneamente la presión superficial presente en la monocapa. Al comprimir las moléculas anfífilas, éstas comienzan a ordenarse, incrementando de ésta manera la presión superficial haciendo que la monocapa presente diferentes fases que nos indican cambios termodinámicos en la superficie. La presión superficial se determina suspendiendo una pequeña lámina de un material caracterizado (placa de Wilhelmy) en agua, entonces se mide la fuerza con la que es atraída hacia abajo del líquido. Esta fuerza que jala un pequeño brazo metálico es medida por medio de la



deflexión de luz infrarroja que emite un diodo para después ser traducida a señal eléctrica por un sensor electrónico (20, 19).

La termodinámica de superficies líquidas ha sido descrita por Gaines (20,16). La tensión superficial de una interfase plana está dada por la derivada parcial:

$$\gamma = \left( \frac{\partial G}{\partial s} \right)_{T,P,n} \quad (2.24)$$

donde  $G$  es la energía libre de Gibbs del sistema y  $s$  es el área de la superficie.  $T$  es la temperatura,  $P$  la presión y  $n$  es la composición que se mantienen constantes. Por varias razones el agua ultra pura es considerada la mejor subfase sobre la cual formar monocapas de Langmuir, ya que posee una alta constante dieléctrica y tensión superficial (73 mN/m a 20°C) superior a la mayoría de los líquidos ordinarios. Cuando las moléculas anfifílicas acaban de ser depositadas, éstas formarán un gas en dos dimensiones que tendrá un mínimo efecto sobre la tensión superficial del agua. Pero cuando el sistema de barreras comienza a reducir la superficie disponible, entonces la densidad de las moléculas y la presión superficial se incrementan.

La presión superficial es el análogo bidimensional de la presión, se denota por la letra griega  $\Pi$  y se define como:

$$\Pi = \gamma - \gamma_0 \quad (2.25)$$

donde  $\gamma_0$  es la tensión superficial en presencia de la monocapa, y  $\gamma$  es el valor de la tensión superficial del agua pura.

La Figura 12. Muestra una isoterma generalizada para un ácido graso. La monocapa es muy diluida, cuando el área por molécula está en el rango de cientos de  $\text{Å}^2$ , en este caso se tiene un gas en dos dimensiones. Cuando el área por molécula decrece (incremento en

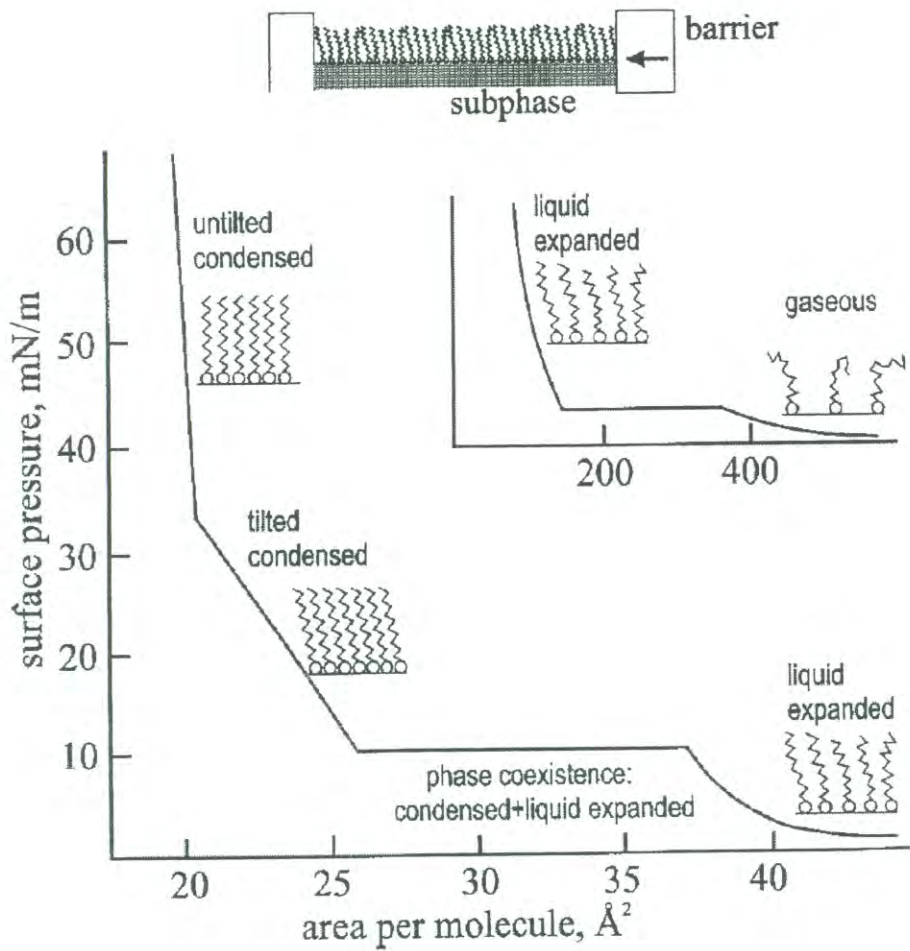


Figura 12. Isotherma generalizada para los ácidos grasos.

lapresión superficial), la monocapa se encuentra en una fase que tradicionalmente se le ha llamado líquido expandido (denotado como LE o L1). En esta fase, como en la fase gaseosa, y no hay señal detectable por medio de la difracción de rayos X, presumiblemente, las cabezas de las moléculas son traslacionalmente desordenadas y las cadenas hidrocarbonadas son conformacionalmente desordenadas.

Una futura compresión de la monocapa produce un cambio brusco en la isoterma indicando una transición de fase de un líquido expandido (LE) a una fase condensada (LC), usualmente una meseta o plato indica una transición de primer orden. Este plato no es perfectamente horizontal en muchos sistemas, lo cual hacía pensar que se estaba violando la regla de las fases de Gibbs, esto fue la fuente de mucha controversia con respecto a la existencia de una transición, orden y número de transiciones. Esta controversia fue resuelta directamente mediante la observación óptica de la coexistencia de fases (Lösche, Sackmann, y Möhwald, 1983), utilizando la técnica de microscopia de fluorescencia de luz polarizada.

La monocapa es menos compresible en la fase condensada que en la líquido expandido. En el rango de área de 20 a 25 Å<sup>2</sup> por molécula, la monocapa posee el mismo grado de orden traslacional en ambas regiones de la isoterma, la cual puede ser, dependiendo de la temperatura, cualquiera de las dos fases sólidas las cuales tienen un orden de corto alcance traslacional. Los rayos X muestran que las cadenas hidrofóbicas de las moléculas están alineadas paralelamente una a otra en ambas secciones de la isoterma, y solo la diferencia puede deberse a la orientación de sus cadenas hidrocarbonadas. Las cuales pueden estar inclinadas o perpendiculares a la superficie del agua. Otra diferencia en las fases puede deberse a la dirección de inclinación, la cual puede ser hacia los vecinos

cercanos, hacia los vecinos próximos o hacia una inclinación intermedia de las dos anteriores. A bajas temperaturas, los experimentos de rayos X han revelado la existencia de fases bidimensionales.

Las fases G y LE son fluidos bidimensionales, las fases LC y S son mesofases, ahora se sabe que no son fases únicas, y dependiendo de la presión y temperatura se pueden tener mesofases análogas a las mesofases tridimensionales de cristales líquidos.

### **Parámetros que Modifican la Isoterma**

La forma de la isoterma depende del material, y de la temperatura, ya que se puede observar un diferente número de transiciones de fase al variar la temperatura. A partir de estudios realizados con moléculas similares a la del ácido esteárico se ha encontrado que otro parámetro que modifica la forma de la isoterma es la longitud de la cadena hidrocarbonada, ya que una reducción en la cadena puede ser interpretada como un incremento en la temperatura.

Otro parámetro que modificará la forma de la isoterma es la velocidad a la cual se está comprimiendo la monocapa. Esto se debe a que entre mayor sea la velocidad de compresión, el sistema se aleja del equilibrio termodinámico. Por esta razón, es importante comprimir a velocidades bajas.

### **Historia de las monocapas de Langmuir**

Durante muchos años se han conocido los efectos producidos por el aceite sobre agua. Los babilonios concedían un carácter divino a la observación del esparcimiento de aceites sobre agua en el siglo XVIII, A.C. Una de las primeras aplicaciones realizadas con este tipo de capas las llevaron a cabo los japoneses quienes practicaban el arte de la impresión sumi-nagashi que consistía en el uso de tintas negras compuestas de micropartículas de carbón en

en suspensión y proteína las cuales eran transferidas a hojas de papel que depositaban debajo de éstas (16,18). Benjamín Franklin fue el primero en darle una interpretación científica a la formación de capas de líquido atrapadas en la interfase agua-aire. En una de sus visitas a Europa observó que la superficie de un estanque de agua era casi completamente cubierta por una sola cucharada de aceite de oliva. Franklin escribió una carta a la Royal Society de Londres en 1774 reportando la particularidad de su experimento, haciendo la observación de que la capa que cubría la superficie del agua debía ser extremadamente delgada. La ciencia de las monocapas en la interfase aire-agua había comenzado. Con este importante descubrimiento otros científicos de la época se vieron interesados en analizar el fenómeno, dos de ellos fueron Shields y Aitken (16), los cuales fueron algunos de los pioneros en estudiar y tratar de explicar el efecto producido por aceites o grasa sobre el agua. Los estudios realizados por Lord Rayleigh (16) sobre la dinámica del movimiento de líquidos y las ondas producidas en éstos, fue el inicio de un estudio mas detallado sobre líquidos dispersos sobre otros formando capas. Fue Lord Rayleigh el primero en proponer que el espesor de la película formada al esparcir aceite sobre una gran extensión de agua, debía ser aproximadamente del orden molecular. Sin embargo Rayleigh, no contaba con una técnica experimental para llevar a cabo las mediciones, y fue por eso que la obtención de las propiedades fundamentales de dichas monocapas tuvo que esperar cierto tiempo. No fue sino hasta que Agnes Pockels de origen alemán llevara a cabo los primeros experimentos de mayor relevancia en el estudio de las monocapas, que la investigación de superficies adquirió un carácter cuantitativo. Desde los 18 años de edad comenzó a trabajar en la cocina de su casa con un pequeño recipiente rectangular plano poco profundo con forma de cubeta, el cual es el antecesor de la actual

cubeta o Balanza de Langmuir usada hasta nuestros días para el estudio de las monocapas de Langmuir.

El líquido a investigar se introducía en la cubeta de Pockles para después con un listón atado a un extremo, barrer completamente la superficie del líquido y así limpiarla de impurezas atrapadas en la interfase agua-aire.

Pockles fue capaz de medir la tensión superficial del agua pura y contaminada por algún agente como el aceite de oliva esparcido en su superficie, por medio de un botón suspendido en la interfase del líquido. Pockles observó que la tensión superficial del agua disminuía conforme aumentaba las impurezas sobre su superficie, obteniendo así la primera relación entre la tensión superficial y el área ocupada por la monocapa (16). Por medio de esta técnica Agnes Pockels obtuvo la primera isoterma área presión superficial la cual es tan familiar en la ciencia de monocapas de Langmuir de hoy en día. Fue entonces cuando Agnes Pockels por medio de una carta dirigida a Rayleigh logró publicar sus hallazgos, los cuales llevarían a posteriores estudios por este mismo método.

En su publicación Pockels hace notar la importancia de mantener limpia la superficie por medio del barrido de su listón sobre la interfase ya que un mínimo descuido en la contaminación del líquido llevaría a un cambio sustancial en la isoterma.

Como se indica, esta isoterma área-presión se lleva a cabo manteniendo la temperatura constante durante todo el proceso. Cuando Lord Rayleigh publicó el trabajo llevado a cabo por Pockels, los estudios llevados a cabo sobre interfases en líquidos se incrementaron súbitamente haciendo de la cubeta de Pockels una herramienta indispensable para estudio.

La mayor contribución al estudio de las monocapas la realizó Irving Langmuir (16,18) a principios del siglo XX, quien desarrolló toda una teoría del proceso termodinámico de absorción y de la interacción atractiva entre moléculas en la interfase de

un líquido y un sólido. En 1917 publicó “The constitution and fundamental properties of solids and liquids” (16) en la cual describía sus hallazgos de los efectos de superficie. Esta publicación fue una de sus mayores contribuciones científicas por lo cual se le otorgó el premio nobel en química en 1932. El éxito logrado por la teoría de Langmuir se debió en gran parte a la comprobación de la hipótesis de Rayleigh, de que las monocapas formadas en la interfase debían de ser del orden molecular. Es por eso que a dichas monocapas se les conoce hoy en día como monocapas de Langmuir. Los últimos estudios realizados por Langmuir sobre monocapas flotando sobre líquidos lo llevaron a desarrollar técnicas experimentales para estudiar proteínas, formando así películas delgadas del orden molecular con características importantes para el estudio de la interacción de enzimas y toxinas en las membranas celulares. Realizó interesantes experimentos que lo llevarían a la invención del vidrio casi totalmente transparente, el cual lo obtenía al agregar una película de compuesto de fluoruro en la superficie.

Katherine Blodgett quien se encontraba trabajando bajo la dirección de Langmuir en la compañía General Electric, cuando logró transferir las monocapas de Langmuir de diferentes materiales de la subfase líquida a un sustrato sólido (16), fue la primera persona en desarrollar el método para la fabricación de múltiples capas de grosor molecular sobre sólidos. Esto se llevo a cabo sumergiendo un sustrato sólido en la interfase líquido gas en la balanza de Langmuir, para después depositar la sustancia que formaría la monocapa dejándola alcanzar el equilibrio con la interfase. Después de esto se comprimía la monocapa por medio de una barrera rígida (que tenía la misma función que el listón usado por Pockels) que se podía controlar, a la misma razón con la que se extraía el sustrato de la interfase (Figura 13). Haciendo uso de este método de forma repetitiva Blodgett fue capaz

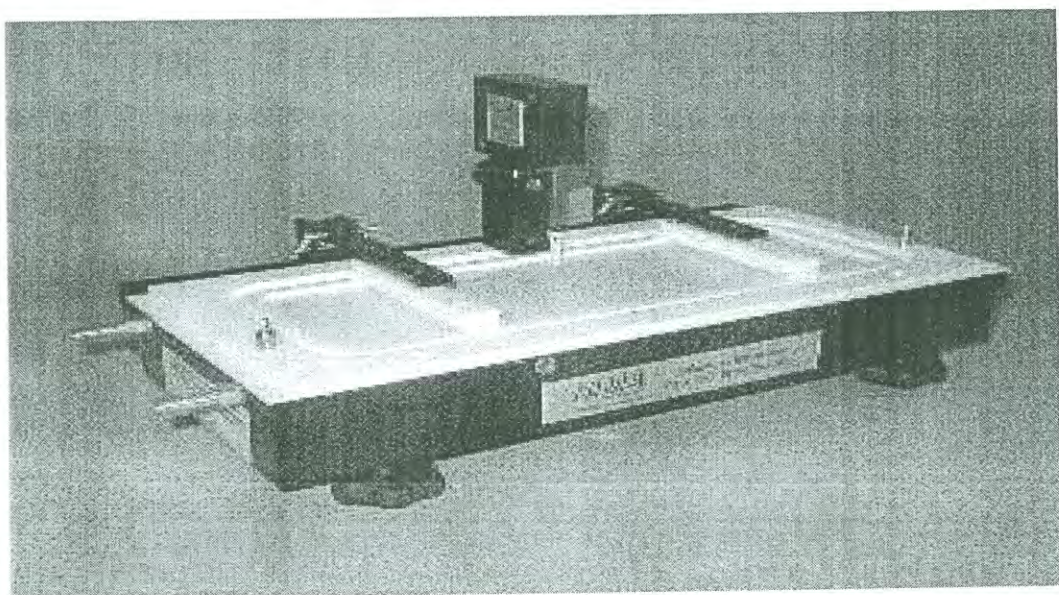


Figura 13. Balanza de Langmuir



de obtener múltiples capas de grosor del orden molecular, logrando así la fabricación de lo que ahora llamamos películas de Langmuir –Blodgett (19).

En 1945, Stenhagen realizó una serie de experimentos con ácidos grasos. Encontró que a altas densidades y presiones superficiales las isothermas mostraban pequeños cambios de pendiente. Él propuso que estos cambios de pendiente se debían a transiciones de fases en las monocapas.

Ya en los años 60's, Lundquist retomó el trabajo de Stenhagen, estudiando la familia de ésteres de ácidos grasos de cadena larga. Ella corroboró los resultados de Stenhagen, mostrando que también estas monocapas presentaban un rico polimorfismo. Sin embargo, el trabajo de ambos fue completamente ignorado, quizás porque no se entendía como un sistema puro podría presentar tantas fases diferentes.

Aún más, fue en esta época que aún la transición de fase líquido expandido-líquido condensado era motivo de gran controversia. Ha sido hasta los 80's y 90's, que con la introducción de nuevas técnicas experimentales, que el rico polimorfismo de las monocapas de Langmuir propuesto por Stenhagen y más tarde por Lundquist ha sido redescubierto.

### **Monocapas de Langmuir**

Una monocapa de Langmuir es una película delgada de grosor molecular insoluble en agua que se encuentra en la interfase agua-aire. Las moléculas que forman monocapas de Langmuir tienen la importante característica de tener dos distintas regiones, una es hidrofóbica (insoluble en agua) que por lo general la forman cadenas hidrocarbonadas, y la otra parte es la hidrofílica (soluble en agua) formada por grupos de ácidos carboxílicos, sulfatos, aminas o alcoholes, entre otros grupos funcionales. A las moléculas con estas características por lo general se les llama moléculas anfifílicas.

Las fuerzas predominantes sobre la región del grupo hidrofóbico son de tipo van der Waals ( $1/r^{12}$  y  $1/r^6$ ), mientras que la interacción molecular en el grupo hidrofílico es predominantemente de tipo Coulómbico ( $1/r^2$ ). Por lo tanto éstas moléculas al ser depositadas sobre la superficie del agua tenderán a cubrir la superficie disponible esparciéndose instantáneamente y orientándose de manera conveniente en la interfase agua-aire, manteniendo al grupo hidrofílico en contacto ó sumergido en el agua y al grupo hidrofóbico con su larga cadena hidrocarbonada tratando de evitar el contacto con el agua (16,20). A continuación se muestra una representación general de una monocapa de Langmuir en la interfase agua-aire Figura 14.

Cuando se deposita una pequeña cantidad de moléculas anfifílicas en la superficie del agua, éstas no se mantendrán unidas, sino que se dispersarán cubriendo toda el área y por lo tanto formarán un gas bidimensional, en el cual las moléculas se encuentran a distancias de muchos diámetros moleculares. Entonces cuando se comprime la superficie por medio de barreras en la balanza de Langmuir, disminuyendo de esta forma el área disponible por molécula; con la compresión las moléculas comienzan a compactarse hasta adquirir un alto orden molecular. Al estar cada vez más cerca las moléculas unas de otras, las fuerzas intermoleculares se hacen más intensas y el empaquetamiento se hace cada vez más difícil aumentando de esta manera la presión superficial de la monocapa formada. En la Figura 15 se muestra la deposición de moléculas anfifílicas sobre la superficie de agua por medio de una microjeringa. Las moléculas en un principio se esparcen por toda la superficie hasta alcanzar los bordes exteriores de la balanza de Langmuir que contiene al agua. Después las barreras que se encuentran en los extremos, "barren" la superficie, comprimiendo ó expandiendo la monocapa. Las moléculas se compactan hasta ordenarse de tal manera que

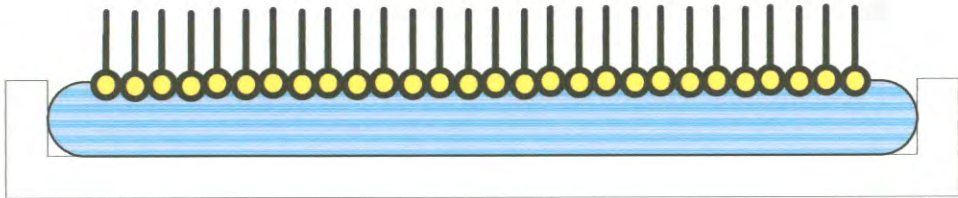


Figura 14. Monocapa de Langmuir.

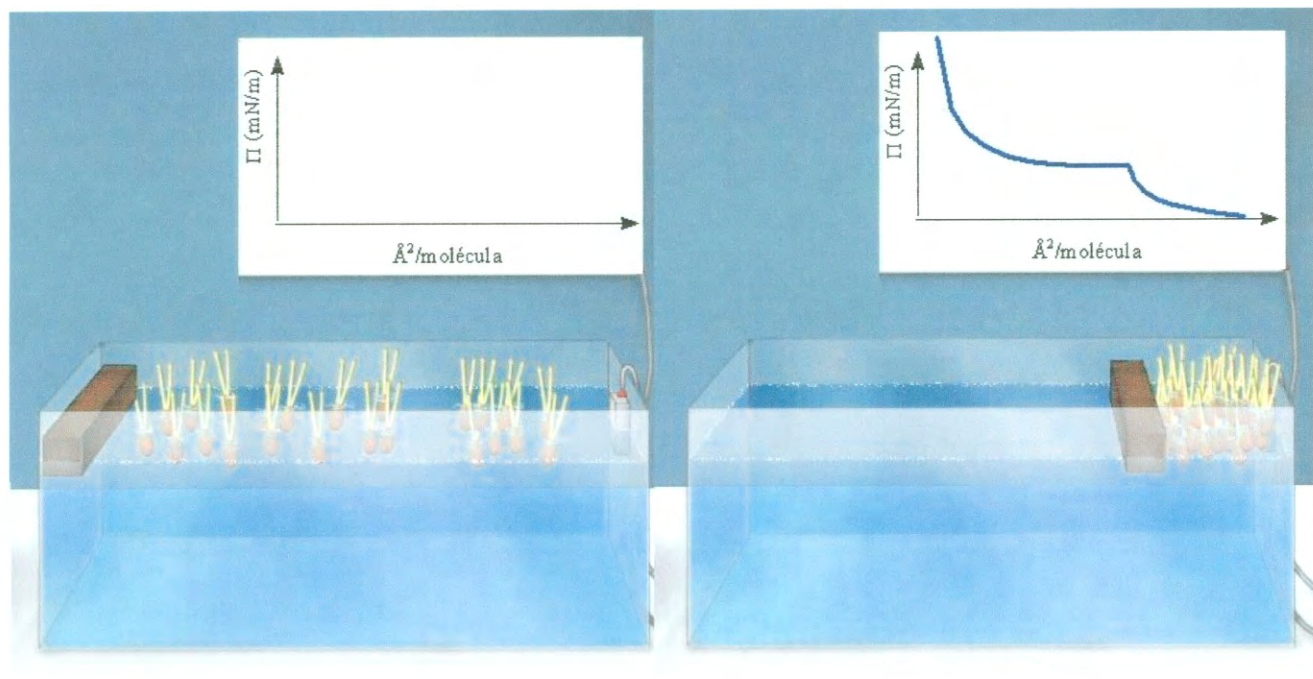


Figura 15. Formación de una monocapa de Langmuir y obtención de la isoterma

sus cabezas (grupos hidrofílicos) están en contacto con el agua y orientadas hacia el aire se disponen sus cadenas hidrocarbonadas (grupos hidrofóbicos), incrementando de ésta manera la presión superficial de la monocapa formada.

Usando la técnica de Blodgett podemos transferir una monocapa de Langmuir de la subfase líquida a un sustrato sólido (Película Langmuir-Blodgett). Esto se hace introduciendo una placa de vidrio o del material sobre el cual se quiere transferir la monocapa en la subfase. Seguido a esto se comprime la superficie por medio de las barreras y controlando la presión superficial de la monocapa, se retira lentamente a velocidad y presión constantes el sustrato introducido, para obtener así una monocapa suave y uniforme sobre éste como se ilustra en la Figura 2.16. Efectuando de manera repetida el procedimiento anterior, o sea retirando e introduciendo nuevamente el sustrato y manteniendo la presión superficial constante, podemos obtener múltiples capas sobrepuestas de grosor molecular.

### **Formación de multicapas**

La formación de películas moleculares se lleva a cabo transfiriendo la monocapa de Langmuir, sobre un sustrato sólido que se hace pasar repetidas veces a través de la interfase agua-aire. La monocapa de Langmuir se debe mantener a presión constante durante el proceso de deposición con el fin de obtener una película molecular homogénea. La composición química del sustrato (hidrofílico o hidrofóbico) y la deposición de la primera monocapa determinará el orden de deposición de las subsecuentes monocapas. Una importante medida de que tan eficiente se ha transferido una película delgada sobre algún sustrato es la Razón de Transferencia, y está dada por:

$$TR = \frac{\text{Área de la monocapa retirada de la subfase a presión cte.}}{\text{Área del sustrato sumergido en la subfase}} \quad 2.26$$

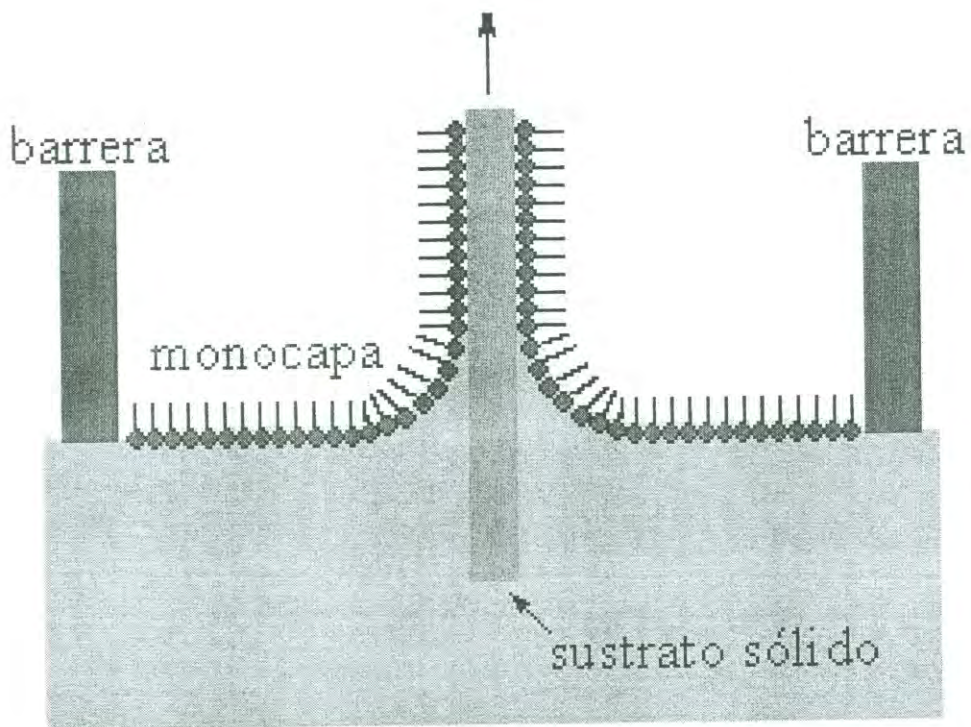


Figura 16. Transferencia de una monocapa de Langmuir a un sustrato

Por lo general ésta razón se mide para cada paso del sustrato a través de la interfase agua-aire. Existen dos clases de sustrato sobre los cuales podemos depositar la monocapa. Los sustratos hidrofílicos y los hidrofóbicos. La transferencia de una monocapa de Langmuir sobre un sustrato de tipo hidrofílico no se lleva a cabo durante la primer inmersión del sustrato en la subfase, debido a que la naturaleza hidrofílica del sustrato causará que se forme un menisco curvado hacia arriba entre éste y el agua. Por lo que es necesario que el sustrato se encuentre inmerso en la subfase desde antes de la formación de la monocapa, para después ser retirado. Conforme es retirado el sustrato, las moléculas anfílicas que forman la monocapa serán transferidas como se ilustra en la Figura 17 Si se repite este paso a cada entrada y salida del sustrato, entonces se forma un sistema de multicapas, a esta secuencia de deposición se le llama tipo Y, que seguirá creciendo con cada entrada y salida del sustrato con la subfase (16, 19).

Este tipo de deposición (Y) es la más favorable energéticamente para las moléculas anfílicas y es la que se presenta más frecuentemente. En un sustrato hidrofóbico el ángulo de contacto con el agua cambia, y el menisco se curva hacia abajo con la entrada del sustrato en la subfase. Entonces para un sustrato de tipo hidrofóbico la transferencia de la monocapa se lleva a cabo desde la primera inmersión como se ilustra en la Figura 2.11.

Ya que al entrar el sustrato en la subfase, serán las cadenas hidrocarbonadas hidrofóbicas las primeras en quedar atrapadas bajo la atracción de la superficie hidrófoba (efecto energéticamente favorable) (16,19). Existen también otros dos tipos de deposición de multicapas sobre los sustratos mencionados, aunque se producen con mayor dificultad ya que su condición es menos favorable y casi siempre su configuración dura poco tiempo antes de que se transformen en tipo Y. Estas configuraciones son las tipo X y Z, y se ilustran en la Figura 18.

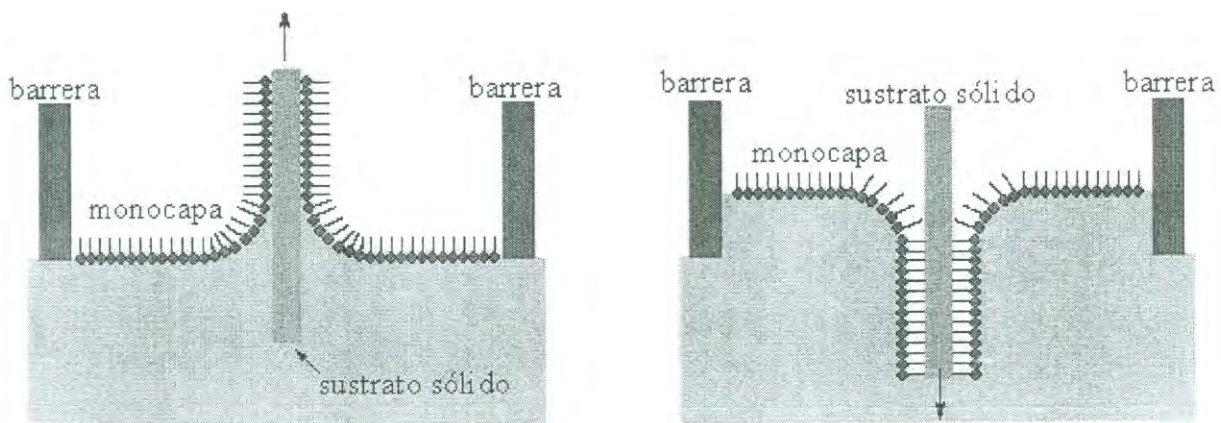


Figura 17. Transferencia de monocapa de Langmuir a sustrato hidrofílico e hidrofóbico respectivamente, (Figura adaptada [17]).



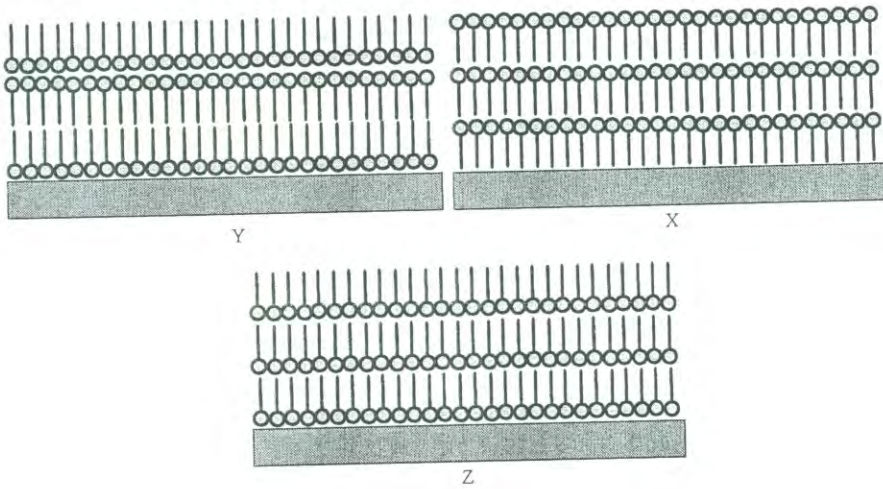


Figura 18. Tipos de deposición

## **Estudio de Monocapas de Langmuir**

El estudio de la morfología, estructura y texturas que presentan las monocapas de Langmuir se puede estudiar a través de diferentes técnicas experimentales como lo son: microscopia de fuerza atómica (AFM) (4), microscopia de ángulo de Brewster (BAM) (20), elipsometría (16), difracción de rayos X en ángulos rasantes (GIXD) (16) y espectroscopia infrarrojo. La técnica de elipsometría se basa en el análisis de los cambios de polarización producidos por la reflexión de la luz al atravesar un medio (18). Ya que la elipsometría depende sólo de la entrada y salida de fotones de luz, ésta técnica por lo tanto no requiere que el sistema se encuentre al vacío.

Gracias a ésta técnica es posible realizar estudios de películas delgadas del orden molecular, así como también de multicapas depositadas en sustratos sólidos, ya que su resolución puede llegar a ser del orden de 0.01 nm.

La difracción de rayos X es la principal técnica utilizada para estudiar la estructura de monocapas que se encuentran directamente sobre la superficie del agua. Fue por medio de ésta técnica que se descubrió que en la fase *Líquido Condensado 1* las moléculas mantienen sus largas cadenas hidrocarbonadas paralelas entre sí, pero formando un cierto ángulo de inclinación con respecto a la superficie del agua. Mientras que en la fase *Líquido Condensado 2* las moléculas se encuentran aún más empaquetadas y sus cadenas hidrocarbonadas se encuentran paralelas entre sí y perpendiculares a la superficie del agua.

## **Colapsado de Monocapas de Langmuir**

Las monocapas de Langmuir y las películas de Langmuir-Blodgett (LB) son de gran interés en biología para modelar membranas (21), tienen aplicación potencial en electrónica (22), en la fabricación de electrodos especiales (23) o biosensores (24).

Sin embargo, la mayoría del trabajo sobre las películas de Langmuir se ha centrado en la parte de la isoterma donde hay sólo una película monomolecular, de baja ó moderada presión superficial  $\leq 35$  mN/m. Solamente en las últimas tres décadas se ha comenzado a estudiar las monocapas colapsadas. La monocapa colapsada, a menudo se identifica en las isotermas como el punto donde la presión superficial alcanza un máximo y es posible observar un pico o una meseta (24). Este punto es normalmente llamado “presión de colapsado”.

Se ha reportado que el colapsado también se presenta a bajas presiones superficiales, donde se cree que el sistema esta cerca del llamado “presión de equilibrio de esparcimiento” (ESP) (24). Esta es la presión donde la monocapa bidimensional coexiste con una fase en bulto (cristales). Por lo tanto cerca de la ESP todas las monocapas son metaestables y el colapsado debería de ocurrir como la relajación de la película hacia la ESP.

### **Modulo de compresibilidad (Elasticidad)**

Sirve para medir la compresibilidad de los fluidos es decir, que tan sensible es el fluido a los cambios de presión, lo que se refleja en cambios en el volumen.

Es definido como:

$$C_s^{-1} = - A \left( \frac{d\Pi}{dA} \right) \quad (2.27)$$

En función de el área molecular (A) y presión de superficie ( $\Pi$ )

Los módulos de compresibilidad nos darán información acerca de la rigidez y flexibilidad de las moléculas. Los módulos de compresión altos indican el estado sólido de la monocapa, es decir estos valores nos darán información acerca del orden de las cadenas hidrofóbicas en la monocapa. Cuando se tiene una monocapa condensada sus moléculas están ordenadas y fuertemente empaquetadas y por lo tanto presentaran módulos de compresibilidad elevados. De acuerdo al criterio dado por Davies y Rideal, valores de

**Recubrimiento de Oro:** El Oro es un material muy utilizado para la microscopia de tunelamiento ya que es altamente conductivo, químicamente inerte, y atómicamente plano, además que es muy fácil de preparar.

**Grafito:** Otro substrato muy útil de naturaleza conductiva es el Grafito, que se encuentra altamente orientado en su superficie. Es bastante conductivo, muy hidrofóbico e inerte y así como la mica se encuentra estructurado en capas que pueden ser fácilmente clivadas.

### **Diferentes Usos y Posibles Aplicaciones de las Monocapas de Langmuir**

Las aplicaciones de las monocapas o multicapas de Langmuir son muy amplias, por lo que aquí se mencionan solo algunas (4, 5, 6,16).

#### **Lubricación**

Lord Rayleigh había notado que la presencia de una capa delgada de aceite adherida a la superficie de un vidrio reducía la fricción estática. Estudios posteriores pusieron en evidencia el hecho de que dos superficies de mica concéntricas en forma de cilindros al ser cubiertas por monocapas de Langmuir de ácidos orgánicos y ser puestas en contacto, se deslizaban con facilidad reduciendo el coeficiente de fricción entre las superficies por un factor de 20. La lubricación y encapsulación son dos áreas de investigación muy importantes en la industria de cintas magnéticas, ya que se requiere de una buena barrera de permeabilidad para que proteja el medio magnético oxidado y una buena lubricación que evite el desgaste y rasgaduras de la cinta a través de la cabeza magnética.

#### **Formación de películas delgadas con fines ópticos**

Las capas orgánicas del orden molecular altamente ordenadas exhiben efectos no lineales únicos, así como respuestas temporales a la aplicación de campos electromagnéticos. Estas propiedades incluyen conjugación de fase y el efecto óptico Kerr, pueden utilizarse para el almacenaje, amplificación y modulación de señales ópticas.

Gracias al alto ancho de banda que pueden lograr las señales ópticas, en comparación con las señales electrónicas, éstas aplicaciones pueden llevar a la construcción de redes de información con ordenes de magnitud de rapidez mucho mayores que las actuales.

### **Membranas de interés Biológico.**

Como se mencionó anteriormente, Langmuir fue el primero en formar monocapas con proteínas y también en reportar la formación de multicapas de clorofila, el pigmento presente en las en las plantas superiores. Desde entonces y hasta la fecha un sin número de moléculas de interés biológico han sido estudiadas por la técnica de balanza de Langmuir . Como ejemplo de esto cabe mencionar la organización instantánea que adquieren en forma de bicapa las moléculas de lípidos como consecuencia de ser moléculas que tienen extremos de solubilidad incompatible (moléculas anfifílicas).

Por ésta razón bicapas de éste tipo fabricadas en el laboratorio pueden llegar a servir como modelo para estudiar las interacciones entre moléculas que suceden en la verdaderas membranas celulares, ya que la naturaleza de su estructura física y química es bastante similar a la que presentan las membranas biológicas en los organismos vivos. Una de las propiedades físicas más significativas que se han obtenido a partir del estudio de éstas membranas es su permeabilidad iónica a ciertas moléculas (iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ , etc), que se logra por medio de la medición de su velocidad de difusión a través de la bicapa lipídica. También se estudia la difusión de moléculas mayores como de toxinas y enzimas a través de éstas membranas, así como también su resistencia estructural a presiones mecánicas. Las aplicaciones de las monocapas Langmuir se extienden a otras muchas áreas como son la Física de semiconductores, fabricación de sensores y transductores, electrónica molecular y microlitografía, entre otras (16). Uno de los problemas principales con la aplicación de las

monocapas de Langmuir es que muchos aspectos de la termodinámica de interfases y de adsorción en sólidos son aún desconocidos. Es por eso que la aplicación de las monocapas de Langmuir a gran escala es aún limitada, enfocándose principalmente al uso como modelo experimental para la investigación de sistemas moleculares en dos dimensiones.

### **Métodos experimentales**

En este capítulo se presentan brevemente los fundamentos físicos de los métodos experimentales que se utilizaron para el estudio.

#### **Balanza de Langmuir**

La medición experimental de las isothermas se lleva a cabo por medio de una balanza de Langmuir, (Nima technology 611) (19). La Figura 19 muestra un diagrama esquemático de la balanza de Langmuir. El contenedor que contendrá la subfase está hecho usualmente de Teflón, para prevenir cualquier contaminación. La temperatura del contenedor es controlada mediante la circulación de agua a través de canales que están colocados abajo del contenedor de teflón. El agua es enfriada o calentada mediante un controlador de temperatura. El área superficial del contenedor puede ser variada mediante barreras móviles sobre la superficie del contenedor. Las barreras también están hechas de teflón y son sujetadas con brazos de acero inoxidable, y en consecuencia son pesadas previniendo que estas floten. La presión superficial y el área molecular son continuamente monitoreadas durante la compresión. La presión superficial y el área molecular se monitorean continuamente durante la compresión. La presión superficial es medida por la placa de Wilhelmy. En este método la medición es realizada por medio de la determinación de la fuerza debida a la tensión superficial en la placa, de tal manera que esta es parcialmente



Figura 19. Balanza de Langmuir

sumergida en la subfase. Esta fuerza es entonces convertida en una fuerza de tensión (mN/m o dynas/cm.) tomando en cuenta las dimensiones de la placa. También la balanza de Langmuir posee un brazo en el que se sujeta un sustrato sólido para transferir la monocapa de Langmuir a este, este brazo puede subir o bajar con la ayuda de un motor al cual está acoplado. Además, por medio de este se puede controlar la velocidad. En general este equipo sirve para obtener isothermas presión superficial – área por molécula, y transferir la monocapa a sustratos sólidos.

La balanza de Langmuir-Blodgett es controlada por una PC vía una interfase. Mediante un software (Nima technology), es llevado a cabo el manipuleo del sensor de tensión superficial y el movimiento de las barreras (compresión y expansión). En este sistema la presión superficial y el área por molécula son las variables termodinámicas del experimento a realizar, ya que estas nos dan información del comportamiento termodinámico de la monocapa a través de las isothermas.

#### **Microscopia de fuerza atómica (AFM).**

**Microscopia de sonda de barrido.** (Scanning probe microscope SPM) son una familia de instrumentos usados para estudiar las propiedades físicas superficiales tales como: conductividad superficial, distribución estática de carga, fricción localizada, campos magnéticos y módulo de elasticidad de materiales conductores y aislantes desde un nivel atómico hasta el orden de micras (29).

El STM (microscopia de tunelamiento) consiste de una punta sostenida de un metal asociado a un piezoeléctrico controlado por una computadora que permite que la muestra se mueva independientemente en las tres direcciones. La punta es una aguja afilada de metal, hecha típicamente de tungsteno, de una aleación de paladio/iridio o de oro. Cuando el voltaje se aplica entre la punta y la muestra una corriente eléctrica pequeña puede ser



medida. Si esta corriente medida es mas pequeña que una determinada corriente de referencia, la punta se acerca a la muestra y si la corriente medida es demasiado grande, la punta se aleja de la muestra para mantener la corriente constante. Una correspondencia topográfica de la superficie de la muestra puede ser creada por este movimiento de la punta a través de la muestra registrando cuanto fue movida la punta para mantener la corriente a un valor constante. Usando este método, el STM puede ser utilizado para "ver" los átomos individuales de la de la muestra. Una de las desventajas de esta técnica es que la muestra debe de ser conductora. En resumen esta técnica nos sirve para obtener la topografía superficial de los estados electrónicos excitados usando una corriente de tunelamiento que depende de la separación de la extremidad de la punta y de la superficie conductora de la muestra.

**La microscopia de fuerza atómica (AFM)** En el AFM una punta fina de varias micras de longitud y menos de 100 Å de diámetro barre la superficie de una muestra. La punta está en el extremo de un soporte (cantilever), de 100 a 200 micras de longitud y un haz de luz de un diodo láser es reflejado por la superficie del cantilever. Las fuerzas de interacción entre los átomos de la punta y la superficie de la muestra producen deflexiones en el cantilever que son medidas mientras la punta rastrea la muestra. La dirección del rayo de luz desviado es detectado por un fotodetector de posición, por medio de este es posible medir las deflexiones del cantilever (del orden de  $1 \times 10^{-5}$  Å). La señal del fotodetector es analizada por medio de una computadora para posteriormente construir una imagen tridimensional de la topografía de la muestra.

Las fuerzas de van der Waals y las electrónicas son las causantes de la deflexión del cantilever. Existen dos modos de medición en el microscopio, que dependen de las

distancias interatómicas entre la punta y la muestra, y que están regidos por la energía potencial entre los átomos con una función de la forma

$$U = \frac{C_n}{r^n} - \frac{C_6}{r^6} \quad (2.28)$$

donde  $r$  es la separación entre partículas y las  $C$  son coeficientes que dependen de la identidad de ellas; el primer término describe la repulsión y el segundo la atracción entre los átomos. Cuando la distancia entre la punta y la muestra es de unos pocos Angstroms, la fuerza es repulsiva; rige el *modo contacto*. En el *modo no contacto* el cantilever está a una distancia del orden de menos de una decena de angstroms de la superficie de la muestra provocando una fuerza interatómica atractiva (Figura. 20).

### **Modo de contacto AFM**

En el modo de contacto, la topografía de la muestra puede ser medida de dos maneras: El modo de “deflexión constante”, en el cual una retroalimentación es usada para mantener constante la deflexión del cantilever, y el modo de “altura constante”, donde la deflexión del cantilever es medida mientras la punta recorre la superficie de la muestra controlando la retroalimentación. En el modo de “no contacto” (Tapping mode) del AFM, la punta es excitada externamente y la amplitud y fase del cantilever son monitoreados cerca de la frecuencia de resonancia del cantilever. Como la muestra y la punta están en contacto, una fuerza es aplicada a la punta y resulta en un corrimiento en la frecuencia de resonancia del cantilever y en la amplitud de vibración en cualquier frecuencia de resonancia cercana. Esto produce una retroalimentación susceptible y es conveniente para materiales suaves ya que la fuerza lateral entre la punta y la muestra es disminuida considerablemente. Además en el modo de contacto, las fuerzas laterales (fuerzas de

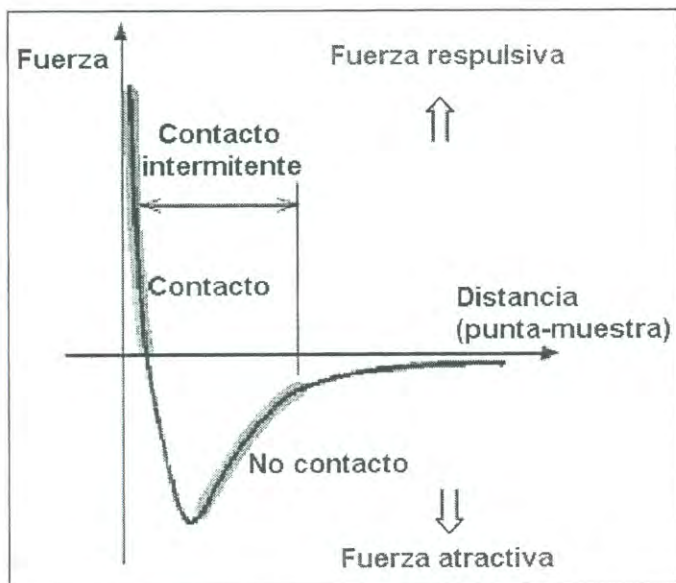


Figura 20. Muestra la curva de Van der Waals

Fricción) producen un torqué en el cantilever, las cuales pueden ser detectadas por la medición de la señal diferencial en el segmento horizontal del fotodetector.

La mayoría de los AFM en el mercado actualmente detectan la posición del cantiliver con técnicas ópticas. En el esquema más común, que se muestra en la Figura 21 se puede observar que un rayo láser se desprende de la parte posterior del cantiliver sobre un fotodetector sensible a la posición (PDSD). A medida que el cantiliver se flexiona, la posición del láser cambia. El PSDS puede medir los desplazamientos de la luz hasta el orden de  $10 \text{ \AA}$ . El cociente de la longitud de trayectoria entre el cantiliver y el detector a la longitud del cantiliver produce una amplificación mecánica. Consecuentemente el sistema puede detectar el movimiento vertical del cantiliver en amstrong.

Una vez que el AFM haya detectado la desviación del cantiliver, puede generar los datos topográficos funcionando en uno o dos modos altura-constante o el modo de la fuerza-constante. En el modo de la altura constante, la variación espacial de la desviación del cantiliver se puede utilizar directamente para generar los datos topográficos por que la altura del escáner esta fija mientras que explora. En el modo de la fuerza constante, la desviación del cantiliver se puede utilizar como entrada a un circuito de la regeneración que mueve al explorador hacia arriba y hacia abajo en Z, respondiendo a la topografía manteniendo constante la desviación del cantiliver. En este caso, la imagen se genera por el movimiento del escáner.

En el modo de fuerza constante, la velocidad del escaneo se limita por el tiempo de reacción del circuito de la regeneración, pero la fuerza total ejercida en la muestra por la punta se controla. El modo de fuerza constante se prefiere generalmente para la mayoría de los usos.

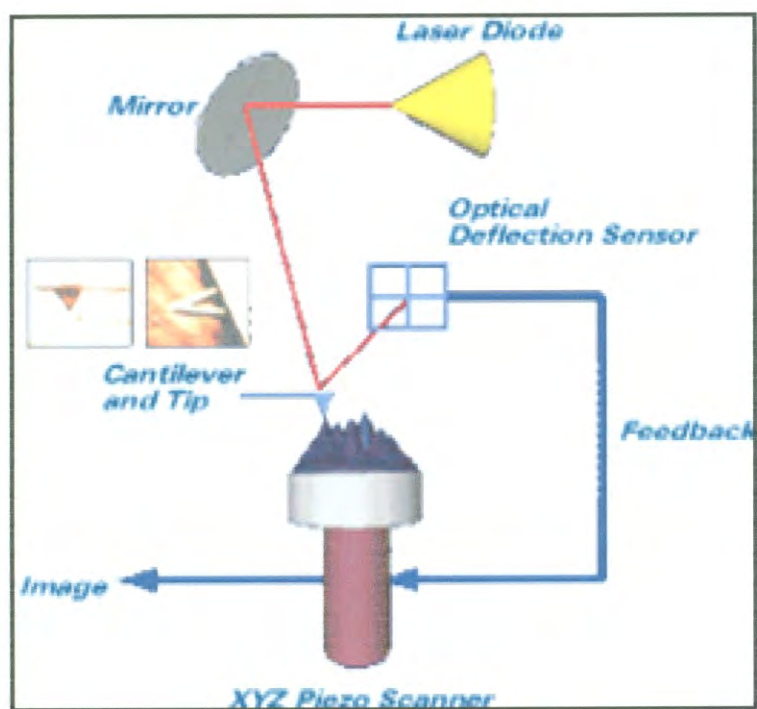


Figura 21. Sistema de detección para desviación del haz láser en el AFM.

El modo de la altura constante se utiliza a menudo para tomar imágenes a escala atómica de superficies atómicas planas, donde las desviaciones del cantiliver son pequeñas y también las variaciones en fuerza aplicada. El modo de la altura constante es también esencial para las imágenes en tiempo real de la grabación de superficies que cambian donde es esencial la alta velocidad de la exploración. A continuación se muestra en la Figura 22 el Microscopio de fuerza atómica utilizado.

### **Espectroscopía de Infrarrojo**

La espectroscopia infrarroja (IR), es una técnica fundamentada en el análisis de las vibraciones moleculares. El principio de esta técnica se basa en entender el movimiento armónico simple. El análisis espectral por medio del infrarrojo revela la estructura de los átomos y la distancia que media entre ellos.

Imagine dos esferas, o masas, conectadas por medio de un resorte, una vez puestas en movimiento, las esferas comienzan a oscilar o vibrar a lo largo del resorte a una frecuencia que dependerá de las masas de las esferas y de la rigidez del resorte. Una esfera de masa pequeña se moverá con mayor facilidad que otra de masa mayor, por lo tanto, las masas pequeñas oscilan a mayor frecuencia que las masas mas grandes. Un resorte sumamente rígido es difícilmente deformable y rápidamente retorna a su forma original cuando se deja de aplicar la fuerza deformante. Por otro lado, un resorte débil se deforma fácilmente y demora mucho tiempo en volver a su forma original, de ahí que un resorte mas rígido oscilara a mayor frecuencia que uno débil. Este modelo de esfera-resorte puede ser utilizado en moléculas donde los átomos juegan el papel de esferas y los enlaces representan los resortes. Cada átomo tiene una masa diferente y los enlaces simples, dobles o triples poseen distinta rigidez, por lo que cada combinación de átomos y enlaces posee su propia frecuencia armónica característica.

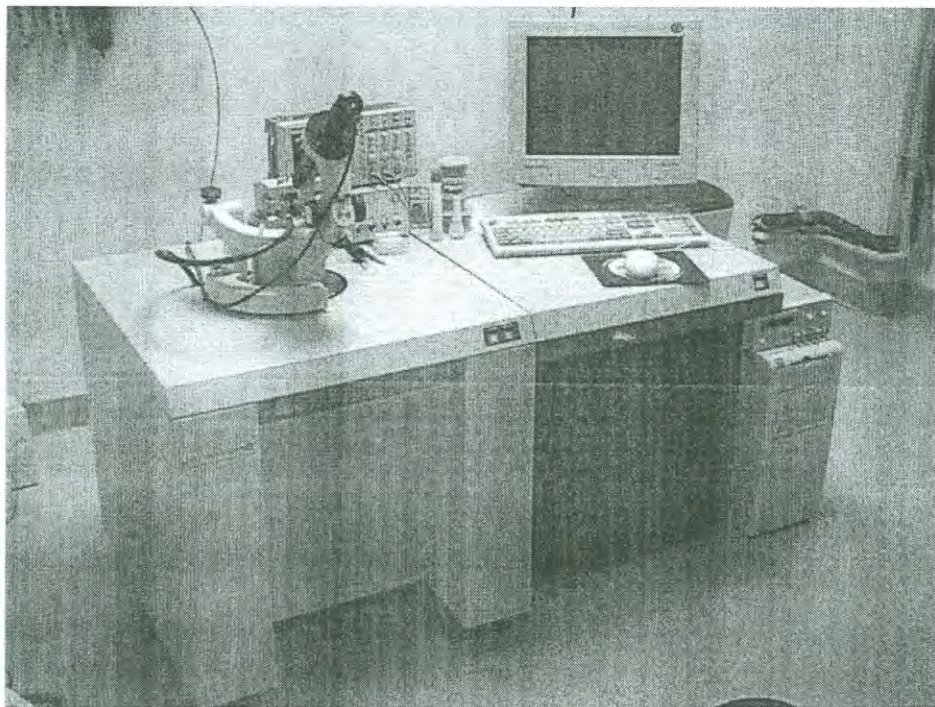


Figura 22. Muestra el microscopio de AFM

Cuando un objeto vibra a una cierta frecuencia y encuentra otra vibración de exactamente la misma frecuencia, el oscilador absorberá esa energía. A cualquier temperatura por encima del cero absoluto, todos los pequeños osciladores armónicos simples que constituyen una molécula se encuentran en vigorosa vibración. La frecuencia de estas moléculas en vibración coinciden con la región del infrarrojo, de modo que si irradiamos una molécula en vibración con luz infrarroja, absorberá aquellas frecuencias de luz que sean exactamente iguales a las frecuencias de los distintos osciladores armónicos que constituyen a dicha molécula. Cuando la luz es absorbida, los pequeños osciladores de la molécula seguirán vibrando a la misma frecuencia, pero dado que han absorbido la energía de la luz, tendrán una amplitud de vibración mas grande. Esto significa que los resortes se estiraran mas que antes de absorber la luz. La luz que no fue absorbida por ninguno de los osciladores de la molécula, es transmitida desde la muestra a un detector y a una computadora que analizara y determinara las frecuencias que fueron absorbidas.

Antes solo era posible obtener buena información irradiando la molécula con una sola frecuencia de IR por vez. Esto lleva mucho tiempo por que existe una gran cantidad de frecuencias y debían realizarse muchos barridos para obtener un buen espectro. Pero ahora utilizando el algoritmo de la transformada de Fourier, puede irradiarse una molécula con cada frecuencia de luz IR a la vez y así poder obtener un espectro perfecto en solo cuestión de minutos. Casi todos los instrumentos utilizados en espectroscopia infrarroja están equipados con sistemas de análisis que utilizan transformadas de Fourier de haz sencillo (30).



## **Resonancia Magnética Nuclear (RMN)**

Es una técnica espectroscópica que permite el estudio de la estructura molecular por medio de la radiación electromagnética en el rango de la radiofrecuencia con un conjunto de núcleos inmersos en un campo magnético fuerte. Estos núcleos forman parte de átomos, los cuales a su vez son parte de las moléculas. Un espectro de RMN, puede proporcionar información detallada de la estructura molecular, información que puede ser difícil o imposible de obtener por cualquier otro método. Un espectro de RMN proporciona información detallada sobre el ambiente químico que rodea a los núcleos en una molécula, a esta información se le conoce como desplazamiento químico y se denota con el símbolo  $\delta$ . Esta técnica es utilizada ampliamente para determinar el grado de acetilación del quitosano (31,33).

## **Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC**

La cromatografía es un método muy utilizada para la separación, identificación y determinación de los compuestos en una mezcla compleja. Generalmente se utiliza para separar y determinar las especies presentes en muestras de materiales orgánicos, inorgánicos y biológicos. La fase móvil es un disolvente líquido que contiene a la muestra como mezcla de solutos. Los componentes de una mezcla se pasan a través de una fase estacionaria mediante el flujo de una fase móvil y las separaciones están basadas en las diferencias en la velocidad de migración entre los componentes de la fase móvil. Esta técnica nos permitió determinar la concentración de colesterol adsorbido por el quitosano (32).

## **Simulación molecular**

La simulación molecular es una herramienta útil que nos permite visualizar los sitios activos de una molécula y su arreglo estructural en el espacio. Con el modelaje molecular

se puede establecer el tipo de reactividad de una molécula. Nosotros utilizamos esta técnica para visualizar el tipo de interacción que se da entre el quitosano-colesterol y quitosano-ácido esteárico.

### **Viscosidad intrínseca**

La presencia de un polímero en un disolvente suele dar como resultado un aumento grande en la viscosidad de la solución aun a bajas concentraciones, este efecto depende fuertemente de la concentración y del disolvente. En un disolvente pobre, la molécula de cadena larga se encuentra enrollada en su mayor parte; en un buen disolvente, la molécula puede encontrarse desenrollada y alargada. La medición de la viscosidad es quizá la forma más simple de obtener un valor para la masa molar de una macromolécula.

La viscosidad de una solución y la del disolvente puro se miden en un viscosímetro capilar de precisión. La viscosidad específica,  $\eta_e$  se define como:

$$\eta_e = \frac{\eta_{\text{solucion}} - \eta_{\text{disolvente}}}{\eta_{\text{disolvente}}} = \eta_r - 1 \quad (2.29)$$

En la que la viscosidad relativa es la relación entre la viscosidad de la solución y la viscosidad del disolvente puro. La viscosidad específica es la contribución relativa del polímero a la viscosidad de la solución. Después se divide la viscosidad específica entre la concentración y graficamos ( $\eta_e/c$  vs  $c$ ) y la extrapolación nos dará el valor de la viscosidad intrínseca y con esta relación podemos determinar el peso molecular del polímero. La relación entre la viscosidad intrínseca y el peso molecular  $M$  del polímero esta dada por la ecuación de Mark Houwnik.

$$[\eta] = KM^\alpha \quad (2.30)$$

$K$  y  $\alpha$  son constantes de Mark Houwnik.

Cuando conocemos las constantes  $K$  y  $\alpha$  para el par polímero-disolvente podemos determinar con facilidad la masa molar de cualquier muestra de polímero a partir del valor medido de la viscosidad intrínseca, las unidades utilizadas son  $\text{g}/100\text{ml} = \text{g}/\text{dl}$  (33).

## **DESARROLLO EXPERIMENTAL**

En este capítulo se exponen las características principales necesarias para llevar a cabo éste experimento como son: Preparación de la muestra a estudiar (pureza máxima en nuestro caso, así como protección del ambiente externo), contar con un equipo de medición capaz de obtener resultados confiables y mantener éste equipo en condiciones óptimas de trabajo (esterilidad del equipo, calibración de los instrumentos, etc). Por último, un software que proporcione ayuda en el análisis de las imágenes, la graficación, cálculo de parámetros, etc. para una correcta interpretación de los resultados.

### **Sustancias**

El colesterol y ácido esteárico utilizado fueron comprados en Sigma (México), el cianohidrobato de sodio, cloroformo, dodecil aldehído (grado reactivo) se compraron Aldrich, el ácido clorhídrico, ácido acético e hidróxido de sodio (grado reactivo) fueron comprados en Merk y el agua utilizada en los experimentos fue de  $18.3\text{M}\Omega\text{ cm}$  y obtenido por el instrumento Easy pure por Barnstead. El quitosano de alto peso molecular (QHPM) y medio peso molecular (QMPM) fueron comprados en Aldrich (lotes 115080H0 y 05405CO, respectivamente).

### **Preparación de las muestras**

#### **Obtención del quitosano hidrofobicamente modificado**

El quitosano hidrofobicamente modificado (quitosano HM) se preparó por aminación reductiva del QMPM en condiciones homogéneas usando n-dodecil aldehído 2g de quitosano fueron disueltos en 110ml de ácido acético 0.2M. después la solución fue agitada, se le agregaron 75 ml de etanol para solvatar al aldehído usado para la alquilación. El pH fue ajustado a 5.1 para evitar la precipitación y la mezcla de aldehído etanol fue agregado a la proporción apropiada con un exceso de cianohidrobato de sodio (3 moles por molécula

de quitosano). La mezcla fue agitada por 24 h. a temperatura ambiente (25°C). El quitosano alquilado fue precipitado con etanol y el pH fue mantenido a 7 con una solución de hidróxido de sodio. El precipitado fue lavado con varias mezclas de etanol /agua incrementando la cantidad de etanol de 70 a 100% v/v (34).

#### **Obtención del cloruro de quitosano:**

El cloruro de quitosano fue obtenido de una solución de quitosano al 1% w/w en ácido clorhídrico 0.1 M después se precipitó con acetona y se centrifugó para obtener al sólido. El sólido fue separado de el sobrenadante, y lavado con diferentes mezclas de agua/acetona y finalmente lavado con acetona pura, el sólido fue secado por cinco días a temperatura del cuarto. El quitosano utilizado fue obtenido a partir de quitina del cefarotórax de camaron azul (*Pinaeus stylirostris*) en la planta piloto del CIAD .

#### **Preparación de la balanza de Langmuir**

#### **Preparación de las soluciones de quitosanos para la obtención de las isothermas de Langmuir:**

Se pesaron 0.2g de los quitosanos QHPM, QMPM, QMH y cloruro de quitosano y se disolvieron con 700ml de ácido clorhídrico 0.2 M, después se agitaron por 30 minutos, a temperatura ambiente para asegurar que estuvieran totalmente disueltos, para el derivatizado se agitó la solución durante dos días. Después se procedió a realizar los experimentos correspondientes.

#### **Limpieza de la balanza de Langmuir**

Para la manipulación de la mayoría de los materiales de laboratorio durante los experimentos, se requirió usar guantes de polietileno, los cuales son indispensables para evitar contaminación por contacto directo de las manos. Antes de depositar agua en la balanza es necesario que el material de su superficie interna (PTFE) se encuentre

absolutamente limpio. Para lograr esto se lavó repetidamente su superficie con cloroformo y agua para después aspirar con una pipeta de Pasteur y lavar con etanol y agua, aplicándolos con algodón varias veces hasta lograr remover todo el polvo y grasas existentes en su superficie.

Una manera eficiente de saber de antemano que nuestra balanza se encuentra limpia es obtener una isoterma de alguna muestra previamente estudiada y catalogada, con la cual comparar los resultados. Si la isoterma obtenida por nosotros concuerda, bajo las mismas condiciones experimentales, con los de la isoterma reportada en la literatura y manual del equipo entonces podemos decir que la balanza se encuentra limpia.

#### **Preparación de la muestra para la formación de la monocapa:**

Para la elaboración de las monocapas de Langmuir del ácido esteárico, colesterol y los diferentes quitosanos, fue necesario preparar una solución que ayudara a esparcir las moléculas del ácido esteárico y colesterol sobre la subfase, es por eso que se utilizó cloroformo como disolvente ya que además es muy volátil. Los quitosanos de medio peso molecular (QMPM), alto peso molecular (QHPM) y quitosano modificado hidrofobicamente (QMH) se disolvieron en una solución de ácido clorhídrico (HCl) 0.2 M, se prepararon soluciones de 0.01%, 0.02% y 0.03% respectivamente, el cloruro de quitosano se disolvió en agua ultrapura a las mismas concentraciones especificadas anteriormente. Una vez depositado la solución de quitosano en la balanza, las moléculas de colesterol y ácido esteárico fueron depositadas sobre la subfase (quitosano), el cloroformo se evaporará y dejará únicamente las moléculas sobre la subfase. Las concentraciones utilizadas para estos experimentos fueron de 1mg /1ml después se tomaron 50 $\mu$ l del ácido esteárico y 30 $\mu$ l de

colesterol y se procedió a depositar las moléculas sobre la subfase a una temperatura de 20°C.

### **Depósito de las soluciones de colesterol y ácido esteárico en la subfase**

Una vez limpia la balanza y haber agregado el quitosano cuidando tener un menisco óptimo (un poco mas de 1mm de altura), ya que en los primeros experimentos se observó que al tener un menisco grande, al comprimir la monocapa era muy fácil que ésta se derramara y por consecuencia no se lograban obtener presiones altas.

Una vez listo el equipo se procedió a depositar las soluciones de colesterol y ácido esteárico sobre la superficie del quitosano utilizando una microjeringa de 100 $\mu$ l depositando 50 $\mu$ l de ácido esteárico y 30 $\mu$ l de colesterol por experimento, el depósito se realiza teniendo mucho cuidado de colocar la aguja de la microjeringa lo mas cerca posible a la subfase, esto es con la finalidad de que la gota de la muestra depositada no se vaya al bulto de quitosano y se tenga una diferente concentración a la calculada (corrimiento de la isoterma hacia áreas menores), después de haber colocado los 50  $\mu$ l de ácido esteárico se esperan 20 minutos, este tiempo se considera apropiado para que las moléculas se distribuyan uniformemente en la subfase y el solvente se evapore, después de este tiempo se procede a comprimir a una velocidad de 50cm<sup>2</sup>/min la monocapa para construir la isoterma la temperatura se controla con un recirculador (polystar). Una vez terminado el experimento se limpia la superficie para remover la monocapa de Langmuir con un sistema al vacío, para cada experimento se cambia la solución de quitosano.

Los cálculos de los módulos de compresibilidad ( $C_s^{-1}$ ) fueron hechos con el software OriginPro-7 con la interpolación de las curvas  $\pi - A$  usando 100 puntos obtenidos de las áreas moleculares igualmente espaciadas a lo largo de la isoterma  $\pi - A$ .

### **Preparación de la película de Langmuir Blodgett**

Una vez determinada la isoterma, se eligen las presiones superficiales a las cuales las monocapas de Langmuir se transferirá a un sustrato sólido (película LB). Como sustrato sólido se eligió mica la cual es un material con grandes áreas superficiales planas a nivel atómico, momentos antes de ser utilizada se le despegó una pequeña capa de cada lado para garantizar que la mica este lo mas limpia posible. Esto es importante para obtener buenas imágenes con el AFM, la transferencia de la película se realizó a una velocidad de 10mm /min, se utiliza una presión baja durante la transferencia para tratar de asegurar que el proceso de transferencia no afecte el arreglo molecular o textura de fase de la monocapa en el agua cuando se transfiera al sustrato sólido.

### **Caracterización de la película por microscopia de fuerza atómica**

Una vez formada la película de Langmuir-Blodgett (esta muestra debe de tener un área máxima que no sobrepasara el porta muestra del microscopio 1.5 cm de diámetro), se procede a analizarla usando el microscopio de fuerza atómica (AFM) marca JEOL modelo JSPM 4210 utilizando el modo de no contacto utilizando un cantiliver de silicón NSC15 de la compañía MikroMasch.

Se utilizó el modo de no contacto ya que al realizar las primeras observaciones se observó que la punta del cantiliver no removía la película de Langmuir-Blodgett de las muestras a analizar por lo cual no fue necesario utilizar otros modos de barrido del AFM. Primero se realizaron barridos de 10 –1  $\mu\text{m}$  cuando se encontraba una región interesante se procedió a realizar mas barridos con el fin de tener un estudio mas completo de la muestra analizar.



## **Caracterización de los complejos quitosano-colesterol y quitosano-ácido esteárico por espectroscopia de Infrarrojo.**

Se preparó una solución al 0.03% de los diferentes quitosanos antes mencionados y se tomaron 2 mL de cada una de las soluciones preparadas y se colocaron en un vial al cual se le agregó 200  $\mu$ l de colesterol y ácido esteárico respectivamente para la formación de los complejos, después se agitan rigurosamente durante 30 minutos, y se colocan en una cámara de vacío se espera a que las muestras se sequen y se procede a realizar las mediciones de cada una de las muestras. Las mediciones se realizaron utilizando bromuro de potasio (KBr) para la formación de la pastilla.

## **Caracterización del grado de acetilación (DA) de los quitosano por Resonancia Magnética Nuclear**

El grado de acetilación (DA) fue determinado por RMN de  $^1\text{H}$ , usando un equipo Bruker Avance 400 (400MHz). Para esta caracterización se pesaron 10 mg de los diferentes quitosanos utilizados y se colocaron en un tubo para RMN y se le agregaron 0.5 mL de una solución de HCl deuterado al 2% y se colocaron en un baño de agua a 70 °C hasta disolverlos completamente. El grado de acetilación fue determinado por la integral de la señal de  $\text{CH}_3$  a 1.97 ppm comparada con la integral de el protón H-2 considerado como un estándar interno (15).

## **Estudios de adsorción de colesterol por los diferentes quitosano por Cromatografía Líquida de alta Resolución (HPLC).**

Los estudios de adsorción fueron hechos a 25 °C utilizando 0.1 g de cada uno de los cuatro tipos de quitosano con dos concentraciones diferentes de colesterol (3 y 5 g/L) en 10 mL de

cloroformo. La adsorción fue calculada de las diferencias entre la concentración de colesterol en la solución antes y después de la adsorción. Las concentraciones de colesterol fue determinada por un HPLC (Agilent HP model 1100, USA) utilizando una columna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent technologies, USA) a 35 °C. El disolvente utilizado en la fase móvil consistió de A (metanol) y B (hexano /2-propanol 4:5 v/v).

### **Simulación molecular de los complejos quitosano-colesterol y quitosano-ácido esteárico.**

#### **Métodos Computacionales**

Todas las optimizaciones de las estructuras mostradas en este trabajo se llevaron a cabo con el programa Gaussian 98(35) en una computadora Compaq Tru64 UNIX, V5.1(36). El método PM3MM (37)(semi-empírico) se utilizó para optimizar los complejos monoméricos mientras que el campo de fuerza UFF se utilizó para optimizar los complejos poliméricos.

#### **Caracterización del peso molecular por viscosidad intrínseca.**

Se utilizó un viscosímetro de Ubbelohde, las muestras de quitosano fueron disueltas en una solución de ácido acético 0.2M y acetato de sodio 0.3 M. Después esta solución se depositó en el viscosímetro a 20 °C y se procedió a cuantificar el tiempo que tarda la solución al pasar por el capilar con la ayuda de un cronómetro.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los quitosanos utilizados, para la elaboración de este trabajo fueron caracterizados para determinar algunas de sus características importantes, como el grado de acetilación de todos los quitosanos, y grado de sustitución para el caso del quitosano modificado hidrofobicamente, se obtuvieron mediante resonancia magnética nuclear de protón y el peso molecular mediante viscosidad intrínseca, como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Caracterización de los diferentes quitosanos utilizados, %DA, %DS y PM.

Quitosano	Grado de acetilación (%DA)	Peso molecular (PM)	Grado de sustitución (%DS)
QHPM	16	266,832	
QMH	22	102,187	3.2
QMPM	18	102,187	
Cloruro de quitosano	22	2500	

## Isotermas de langmuir

En la Figura 23 se muestra la isoterma del colesterol sobre una subfase de ácido clorhídrico 0.2 M y las isotermas del colesterol con diferentes soluciones de quitosano en la subfase. Las isotermas son muy similares a las encontradas por otros autores (38-41). Las monocapas condensadas típicas del colesterol con un área extrapolada ( $A_{ex}$ ) de  $39.6 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$  (estimada por la extrapolación a altas presiones de la parte lineal de la curva  $\pi$ -A a una presión superficial cero) y el área "límite de condensación" ( $A_o$ ) (El área por molécula a una presión superficial de  $1.5 \text{ mN/m}$ ), (39) de  $44 \text{ \AA}^2$ .

En la Figura 23 se muestra el desplazamiento de las isotermas producido por los diferentes quitosanos a la misma concentración (0.01% w/w) en la subfase y de el colesterol en la interfase agua-aire. Las isotermas tienen una gran variación en el  $A_{ex}$  para cada quitosano debido a las diferencias en la interacción con el colesterol en la interfase agua aire. Por ejemplo nosotros observamos un  $A_o = 64.9 \text{ \AA}^2$  para el quitosano modificado hidrofobicamente (QMH) indicando una diferencia promedio de  $(64.9-44) \text{ \AA}^2 = 20.9 \text{ \AA}^2$  área/molécula vacía para el QMH comparado con el del colesterol puro cuando la presión comienza a elevarse ( $1.5 \text{ mN/m}$ ). Cuando la presión es incrementada en la fase condensada la diferencia en  $A_{ex}$  alcanzada =  $48.0 - 39.6 = 8.4 \text{ \AA}^2$ .

Esto significa que ahora esta fase es menos condensada que la del colesterol solo esta área vacía es dependiente sobre el tipo de interacción quitosano colesterol. Como se puede observar en la Figura 23 el  $A_o$  y el  $A_{ex}$  son bajos para el cloruro de quitosano comparado con los otros quitosanos analizados. Esto puede deberse a que la interacción del cloruro de quitosano-colesterol es muy débil comparada con las otras macromoléculas.

En la Figura 24 se muestra el efecto de la concentración del quitosano de medio peso molecular (QMPM) en la subfase sobre la isoterma del colesterol. La inspección de la

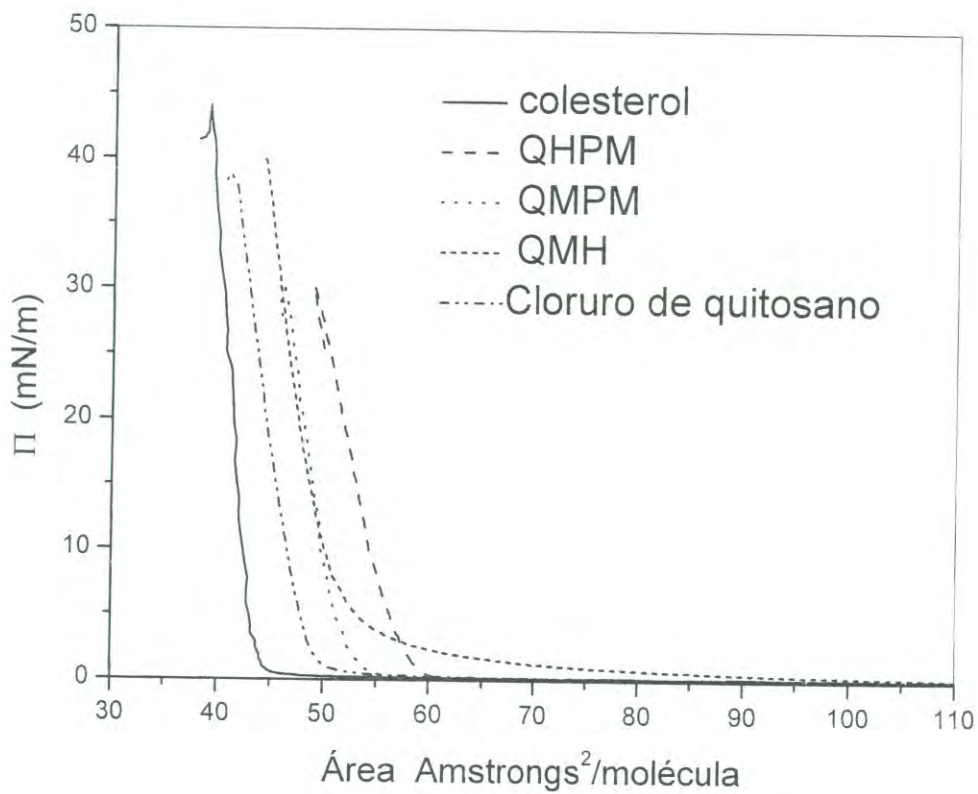


Figura 23. Isothermas del colesterol y quitosano-colesterol en la interfase aire-agua. Los diferentes quitosanos utilizados fueron disueltos en HCl 0.2 M a una concentración de 0.01% w/w, 20°C y una velocidad de compresión de 50cm<sup>2</sup>/minuto.

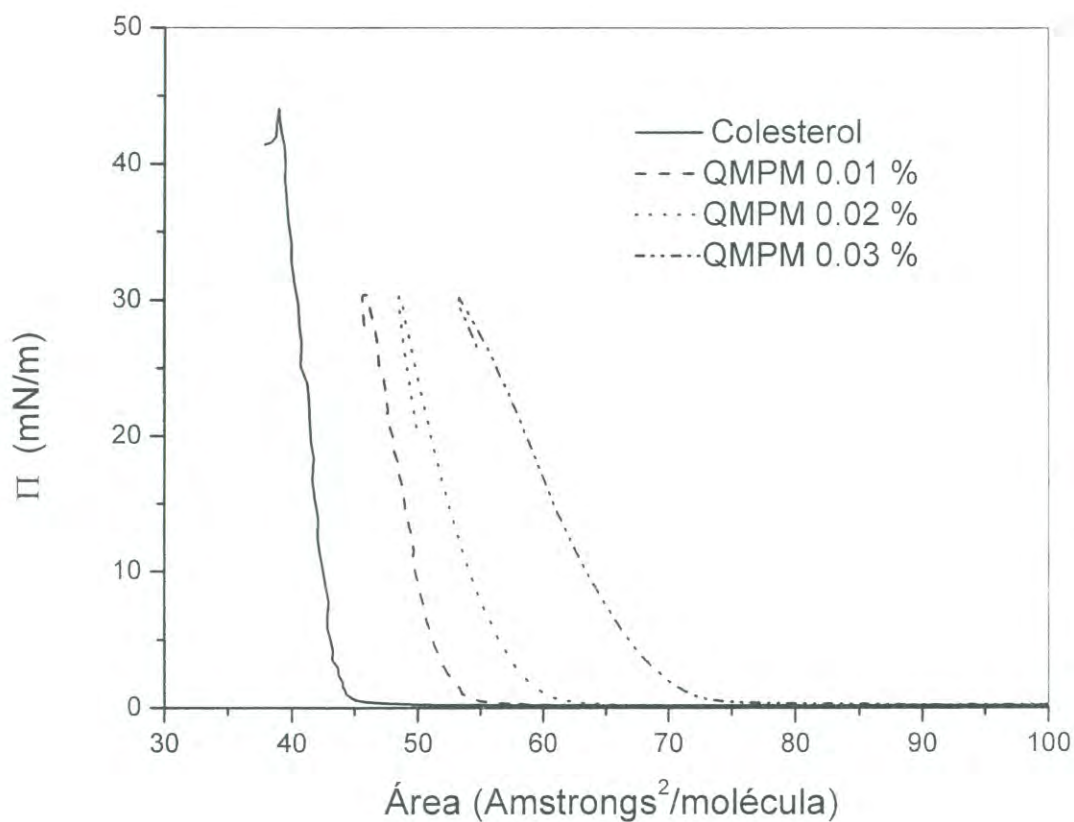


Figura 24. Isothermas de colesterol puro y QMPM-colesterol en la interfase aire-agua. Las tres diferentes concentraciones de quitosano fueron disueltos en HCl 0.2M, 20°C y una velocidad de compresión de 50cm<sup>2</sup>/minuto.

Figura, muestra que el incremento en la concentración del quitosano también incrementan los valores de  $A_{ex}$  y  $A_o$ . Esto efectivamente indica que cuanto más moléculas de quitosano son agregadas a la subfase, más separadas están las moléculas de colesterol unidas a las macromoléculas y/o en uno o más sitios de la molécula de quitosano. Esta separación entre las moléculas del colesterol persiste sólo cuando la presión superficial es aumentada y el área molecular es reducida, indicando que los enlaces moleculares no se pierden a altas presiones. La inclinación de las curvas es reducida cuando la concentración del quitosano es aumentada, indicando la disminución de los módulos de compresibilidad ( $C_s-1$ ) como se observa en la Tabla 2. En la Tabla 2 son resumidos los valores de  $A_{ex}$ ,  $A_o$  y ( $C_s-1$ ) para las isotermas de colesterol con diferentes quitosanos en la subfase. Nosotros observamos que para experimentos del cloruro de quitosano solo hay pequeñas variaciones en  $A_{ex}$  y  $A_o$  para todas las concentraciones y las isotermas permanecen casi juntas y separadas muy poco de la del colesterol. El QMH muestra un desplazamiento máximo en la isoterma en el área límite y el quitosano de alto peso molecular (QHPM) muestra un desplazamiento máximo en el área condensada como lo muestran los valores de  $A_{ex}$  y  $A_o$ , respectivamente. A bajas presiones, esto puede ser entendido por la contribución de los grupos hidrofóbicos unidos a la molécula del quitosano que compiten con el colesterol en la interfase agua aire. A altas presiones el efecto del impedimento estérico de las moléculas largas del quitosano es más importante que la hidrofobicidad de el QMH.

Tabla 2. Área extrapolada ( $A_{ex}$ ), área 'límite de condensación' ( $A_o$ ), y módulos de compresibilidad máximas ( $C_s^{-1}$ ) y el área máxima de compresibilidad  $A_M$  de las isothermas  $\pi - A$  del colesterol y quitosano-colesterol en la interfase aire/agua para diferentes concentraciones de quitosano.

Complejo de colesterol	quitosano % w/w	$A_o$ $\text{Å}^2$	$A_{ex}$ $\text{Å}^2$	$C_s^{-1}$ mN/m	$A_M$ $\text{Å}^2$
colesterol	0	44.0	39.6	417	41.6
QHM	0.01	64.9	48.0	272	46.1
	0.02	69.2	55.8	207	51.0
	0.03	76.6	61.5	191	52.8
QHPM	0.01	58.3	55.5	233	53.1
	0.02	60.6	56.9	187	52.7
	0.03	71.5	68.9	160	53.5
QMPM	0.01	54.0	51.4	282	49.1
	0.02	59.8	56.7	202	50.7
	0.03	71.2	67.2	133	60.1
Cloruro de quitosano	0.01	49.5	47.5	255	43.7
	0.02	51.5	49.5	229	43.0
	0.03	51.5	49.8	254	43.4



El comportamiento de  $C_s^{-1}$  muestra interesantes diferencias con el tipo y concentración del quitosano. El valor máximo de  $C_s^{-1}$  fue alcanzado utilizando concentraciones bajas para todos los quitosanos y de todos los materiales. El QMPM muestra valores máximos de  $C_s^{-1}$ . Los resultados indican que la rigidez de la monocapa del colesterol es afectada por la interacción del quitosano y cuando la concentración es aumentada, la monocapa llega a ser más flexible. Otros parámetros interesantes encontrados para el comportamiento de  $C_s^{-1}$  fue el área correspondiente en el modulo de compresión máximo ( $A_M$ ). Como se muestra en la Tabla 2, el área resultante es más pequeña que la correspondiente  $A_o$  para cada isoterma y muy cercana a la del colapso. Diferencias muy pequeñas fueron encontradas en los valores  $A_M$  del cloruro de quitosano con respecto a la del colesterol puro. Nuestros valores de  $C_s^{-1}$  para el colesterol puro son mas elevados que los reportados por Gomez-Serranillos y colaboradores (40). El valor máximo que ellos encontraron fue de  $C_s^{-1} = 289 \text{ mN/m}$  a  $10\text{mN/m}$ . Sin embargo, ellos no mencionan el método numérico utilizado. Los valores de  $C_s^{-1}$  obtenidos por diferentes investigadores parecen diferir dependiendo del el método utilizado. Li y colaboradores (41) han determinado la importancia del método utilizado para obtener los valores de los módulos de compresibilidad de las monocapas.

Los resultados de la interacción del ácido esteárico y los diferentes quitosanos a bajas concentraciones (0.01% w/w) analizadas son mostrados en la Figura 25. La monocapa de ácido esteárico exhibe una isoterma típica con un cambio en la inclinación a una presión superficial ( $\pi$ ) =  $24 \text{ mN/m}$  y una transición del estado líquido condensado al sólido,

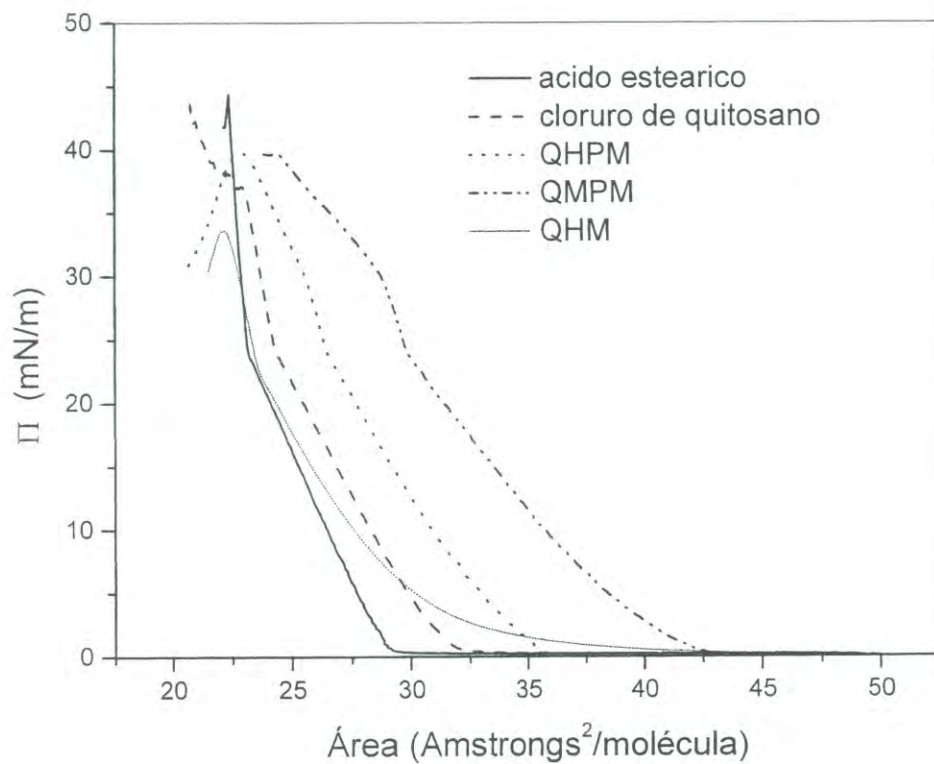


Figura 25. Isotermas de ácido esteárico puro y quitosano-ácido esteárico en la interfase aire-agua. Los diferentes quitosanos fueron disueltos en HCl 0.2 M a una concentración de 0.01% w/w, 20°C y una velocidad de compresión de 50cm<sup>2</sup>/minuto.

valores similares fueron obtenidos por Seoane y colaboradores (38). El área extrapolada del ácido esteárico  $A_{ex} = 22.5 \text{ \AA}^2$  similar a los valores encontrados por ellos. Sin embargo, la presión de colapso obtenida por nosotros fue mas pequeña que la obtenida por estos autores, probablemente debido a las diferencias en la velocidad de compresión.

La presión de colapso es obtenida cuando la isoterma exhibe un pico que aparece después de la fase sólida seguido por una caída de la presión superficial y ha recibido mucha atención debido a su importancia para entender el fenómeno de agregación cuando la monocapa es comprimida hasta comenzar a destruir la estructura en dos dimensiones.(43).

En la Figura 25 se muestra el desplazamiento de la isoterma producidos por los diferentes quitosanos a una concentración de 0.01% w/w en la subfase y el ácido esteárico en la interfase aire agua. Se observa una pequeña variación en el  $A_{ex}$  para cada quitosano comparado con el desplazamiento producido con el colesterol a las mismas condiciones debido alas diferencias de interacción de el colesterol y ácido esteárico con el quitosano. Se observa un  $A_{ex} = 35 \text{ \AA}^2$  para el QMH indicando una diferencia de  $(35-28.9) \text{ \AA}^2 = 6.1 \text{ \AA}^2$ , comparado con el ácido esteárico puro. Cuando la presión es aumentada en la fase condensada, la diferencia en  $A_o$  alcanza  $26.1-22.5 = 3.6 \text{ \AA}^2$ . Estas diferencias son pequeñas comparadas con las obtenidas con el mismo complejo quitosano-colesterol, indicando que la distancia promedio de las moléculas del colesterol son mas grandes que las observadas con ácido esteárico con el mismo quitosano en la subfase. Como se puede observar en la Figura 25, el  $A_o$  y  $A_{ex}$  son más pequeños para el cloruro de quitosano comparado con otros quitosanos analizados. Esto podría indicar, similitud con el caso de colesterol, que la interacción del cloruro de quitosano con ácido esteárico es mucho mas débil cuando se compara con las otras macromoléculas.

En la Figura 26 se muestra el efecto de la concentración del quitosano de medio peso molecular en la subfase sobre la isoterma de ácido esteárico. Cuando se incrementa la concentración del quitosano se produce un efecto débil sobre  $A_{ex}$  y  $A_o$ , indicando que cuanto mas moléculas de quitosano son agregadas a la subfase, más separadas están las moléculas de ácido esteárico unidas a la macromoléculas y/o a más sitios en la molécula del quitosano. Sin embargo, el efecto es menos significativo comparado con el que se observó con el mismo complejo quitosano-colesterol. En este caso observamos que el colapso en las isotermas comenzó a baja presión y la fase sólida es muy corta.

Los valores de  $A_{ex}$ ,  $A_o$  y  $C_s^{-1}$  para las isotermas de ácido esteárico con los diferentes quitosanos en la subfase son presentados en la Tabla 2. Otra vez, se observa que en los experimentos de cloruro de quitosano los desplazamientos de  $A_{ex}$  y  $A_o$  son pequeños y las isotermas permanecen separadas un poco de las del ácido esteárico, el QMH mostró un desplazamiento máximo en las isotermas en la fase expandida como se observo en los valores de  $A_o$ .

El comportamiento de  $C_s^{-1}$  de las monocapas de quitosano con ácido esteárico mostraron un comportamiento similar a las de colesterol. El valor máximo alcanzado de  $C_s^{-1}$  fue usando bajas concentraciones para todos los quitosanos, en general los valores de  $C_s^{-1}$  alcanzados fueron bajos comparados con los obtenidos para los mismos quitosanos con colesterol mostrados en la Tabla 2. El comportamiento de  $A_M$  para el quitosano con ácido esteárico fue muy similar al mostrado con el quitosano-colesterol. Estos resultados

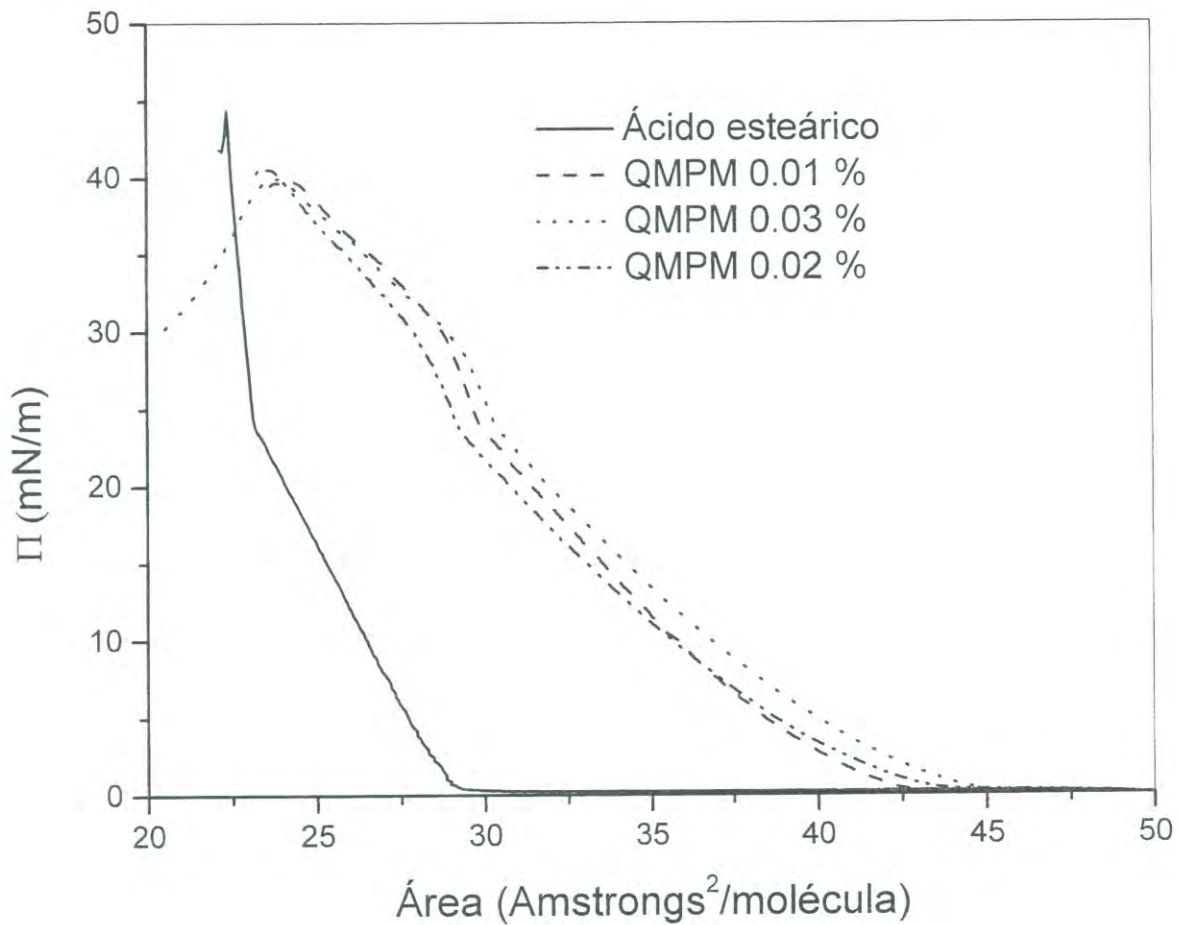


Figura 26. Isothermas de ácido esteárico puro y QMPM-ácido esteárico en la interfase aire-agua. Las diferentes concentraciones de QMPM se disolvieron en HCl 0.2 M, 20°C y una velocidad de compresión de 50cm<sup>2</sup>/minuto.

Tabla 3. Área extrapolada ( $A_{ex}$ ), el área ‘límite de condensación’ ( $A_0$ ), módulos de compresibilidad máximas ( $C_s^{-1}$ ) y el área máxima de compresibilidad  $A_M$  de las isothermas  $\pi - A$  de ácido esteárico puro y ácido esteárico-quitosano en la interfase aire/agua para diferentes concentraciones de quitosano.

Complejo ácido esteárico	% w/w Quitosano	$A_0$ $\text{Å}^2$	$A_{ex}$ $\text{Å}^2$	$C_s^{-1}$ mN/m	$A_M$ $\text{Å}^2$
Ácido esteárico	0	28.9	22.5	407	22.8
QMH	0.01	35	26.1	207	23.0
	0.02	44.2	33.7	150	27.9
	0.03	51.2	39	103	31.9
QHPM	0.01	34.7	31.8	181	26.2
	0.02	39.2	35.8	143	28.5
	0.03	41.6	35.8	138	30.1
QMPPM	0.01	41.1	29.1	176	29.4
	0.02	41.6	31.1	145	29.9
	0.03	42.8	34.6	144	8.9
Cloruro de quitosano	0.01	31.4	23.7	247	23.4
	0.02	31.4	26.3	302	25.2
	0.03	33.6	27.9	198	25.4

indican que las monocapas de quitosano-ácido esteárico, muestran más flexibilidad que la correspondiente con colesterol.

### **Mediciones de AFM.**

Las películas de Langmuir Blodgett colocadas sobre mica fueron obtenidas a 15 mN/m y a una temperatura de 20° C de la balanza de Langmuir y observadas por microscopia de fuerza atómica (AFM) las diferentes películas de quitosano, colesterol y ácido esteárico y sus respectivos complejos formados en la interfase agua-aire fueron obtenidos con diferentes soluciones de quitosano utilizados como subfase. En la Figura 27 se muestran las imágenes del QMPM, colesterol y los complejos colesterol-QMPM, para dos diferentes concentraciones de quitosano. En la Figura 27a se incluye una película de QMPM pura, la inspección de la micrografía de AFM revela la presencia de agregados grandes (30.1 nm altura promedio) con un grado de rugosidad (rms) de 12.3 nm. La monocapa del colesterol observada en la Figura 27b fue muy similar a la reportada por otros autores, con un rms de 0.4 nm y una altura promedio de 1.56 nm, este valor concuerda con los reportados por Kim y colaboradores (1.6 nm), (10). La película obtenida con colesterol-QMPM (0.03% w/w) en la interfase aire-agua son mostrados en la Figura 27c. En este caso, la superficie es más homogénea con un rms 7.03 y unas alturas promedios presentes de 34.66, pero nosotros observamos la presencia de algunos dominios de 1.58 nm de altura correspondiente a la altura promedio para el colesterol puro. La Figura 27d muestra imágenes de AFM del complejo a concentraciones bajas (0.01%). Las mediciones de rugosidad fueron más bajas (1.35 nm) y la altura promedio disminuyó a 4 nm, mostrando dominios de 1.6 nm de altura correspondiendo a la altura del colesterol. Estos resultados indican que la mezcla de quitosano-colesterol sobre la

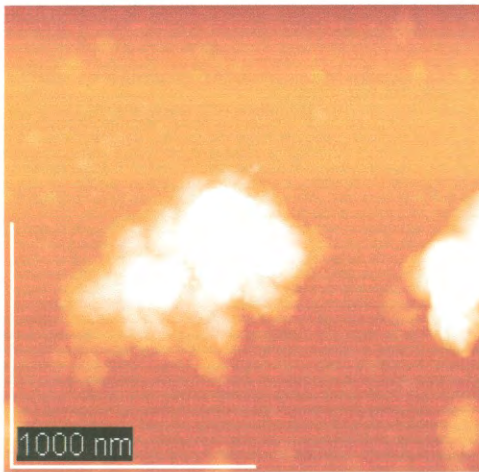


Fig. 27a

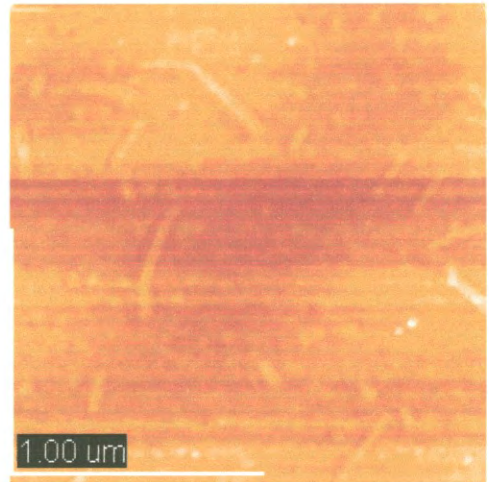


Fig. 27b

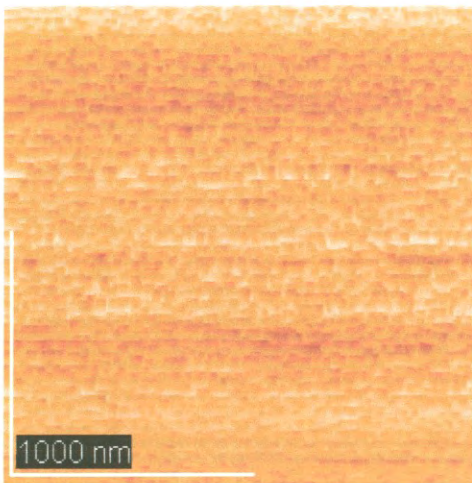


Fig. 27c

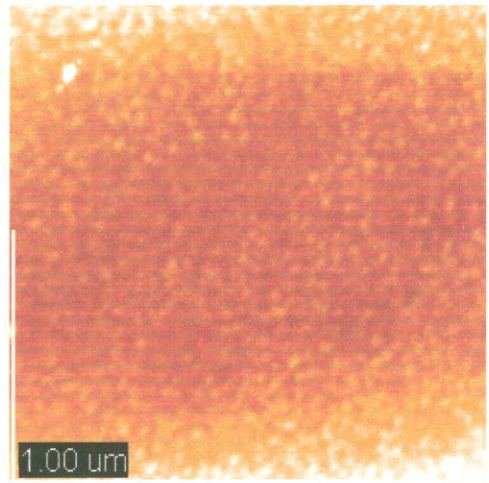


Fig. 27d

Figura 27. Imágenes de AFM de las mezclas de colesterol con QMPM para dos diferentes concentraciones. a) QMPM obtenido directamente de la solución, b) colesterol puro, c) colesterol-QMPM 0.03 w/w %, d) colesterol-QMPM 0.01 w/w %.



superficie de la mica es más homogénea que el quitosano puro debido a la interacción quitosano colesterol. El exceso de quitosano produce una superficie más rugosa intercalada con regiones de colesterol puro. Los picos altos de alturas en el histograma y el grado de rugosidad son mostrados en la Tabla 4 para todas las muestras y concentraciones analizadas.

El efecto de los diferentes tamaños de las moléculas de quitosano y la adición de cadenas hidrofóbicas sobre la molécula del quitosano son mostradas en la Figura 28. La película obtenida con la mezcla del QMH-colesterol mostraron un amplio rango de alturas, de dos o mas picos de 2.3 y 28 nm y rms de 8.71 nm. Como se observa en la Figura 28 a, la imagen mostró agregados mas pequeños correspondientes al QMH y colesterol. El correspondiente histograma de alturas es mostrado en la Figura 28b. La películas de quitosano de alto peso molecular-colesterol es mostrado en la Figura 28c y el correspondiente histograma de altura en la Figura 28d. Como se observa, la superficie mostrada es más homogénea con un grado de rugosidad de 1.83 nm. Las alturas promedio de ambos de quitosano (QHPM y QMPM con colesterol) presentan superficies muy similares de alrededor de (10 nm) y no hay evidencia de dominios aislados de colesterol, mostrando una mezcla más homogénea comparada con la mezcla de QMH.

Las películas obtenidas con ácido esteárico y los diferentes quitosanos son mostradas en la Figura 29. La Figura 29a corresponde a la película de ácido esteárico mostrando un grado de rugosidad de 9.6 nm probablemente debido la formación de cristales. La distribución de alturas muestran dos picos de 2 nm y 21.9 nm. El primer valor corresponde al tamaño de la monocapa de ácido esteárico sobre la mica y el otro valor a multicapas tales como las observadas en la presión de colapso por Valdés-Covarrubias y colaboradores (43).

Tabla 4 Picos de altura máxima y el grado de rugosidad (rms) de la micrografía de AFM de películas LB observados en el histograma de alturas para el ácido esteárico, colesterol, diferentes quitosanos y sus complejos obtenidos sobre mica.

Muestra	%Chitosano w/w	Picos Máximos nm	Rugosidad nm
Colesterol Ácido esteárico	0	1.13-1.45	0.4
		6.0-21.3	9.6
QMH	0.01	3.5-18.7	4.65
	0.03	34-42	5.67
QMH -colesterol QMH-Ácido esteárico	0.01	44.5-197 11.9-37.5	66 9.31
	0.03	2.3-28.0 4.3	8.71 2.74
QHPM	0.01	2.17-9.93	4.0
	0.03	0.8-5.7	2.87
QHPM-colesterol QHPM -Ácido esteárico	0.01	2.01-10.0 4.13-20.0	3.1 5.5
	0.03	10.39 2.2-16.7	1.83 7.2
QMPM	0.01	1.24-5.6	1.5
	0.03	31-45.6	12.3
QMPM -colesterol QMPM-Ácido esteárico	0.01	1.56-4 1.6-2.0	1.35 1.41
	0.03	1.6-10.8 2.2-6.6	7.7 6.1

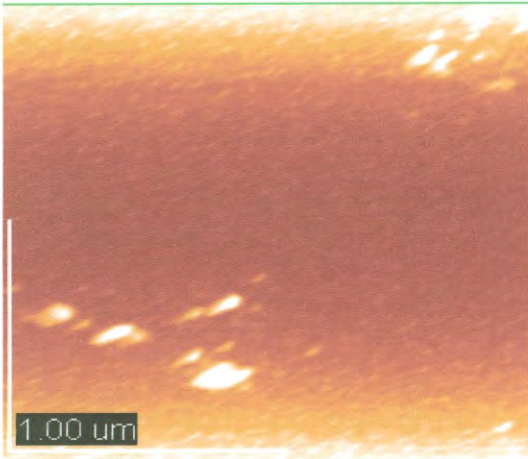


Fig. 28a

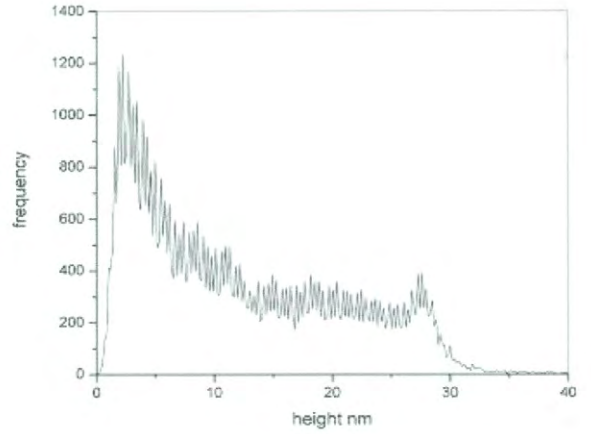


Fig.28b

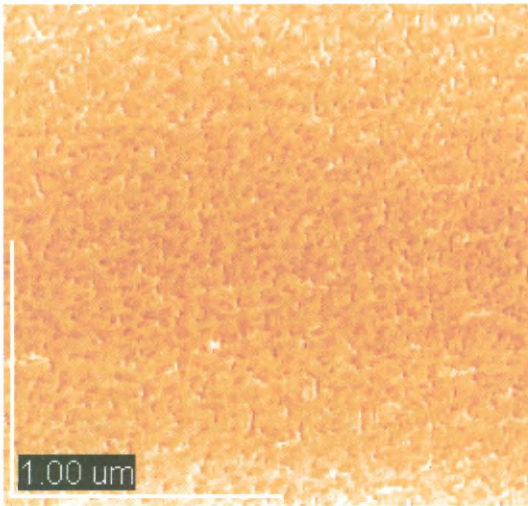


Fig. 28c

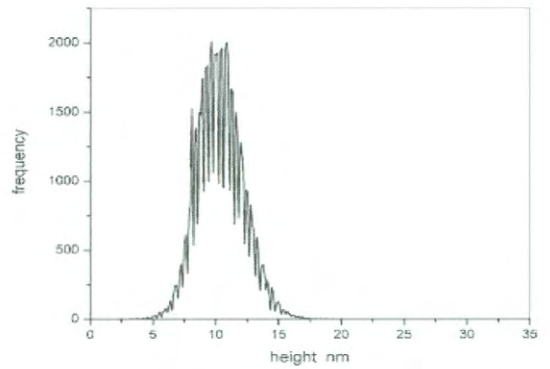


Fig. 28d

Figura 5.6. Imágenes de AFM para dos mezclas de diferentes quitosanos con colesterol obtenidos por la balanza de Langmuir. a) QMH 0.03% w/w con colesterol, b) Histograma de altura de a, c)QHPM 0.03% con colesterol, d) Histograma de alturas de c.

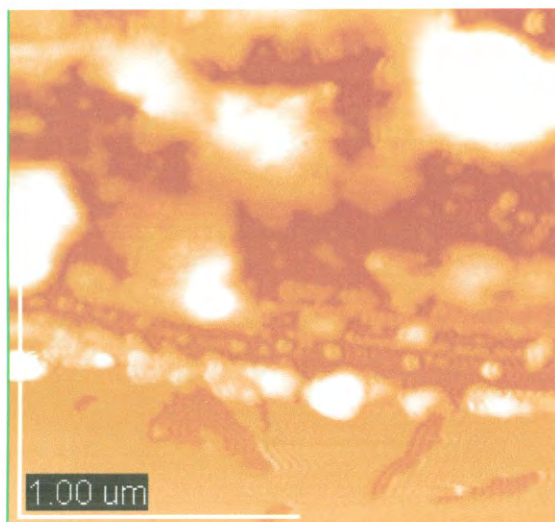


Fig. 29a

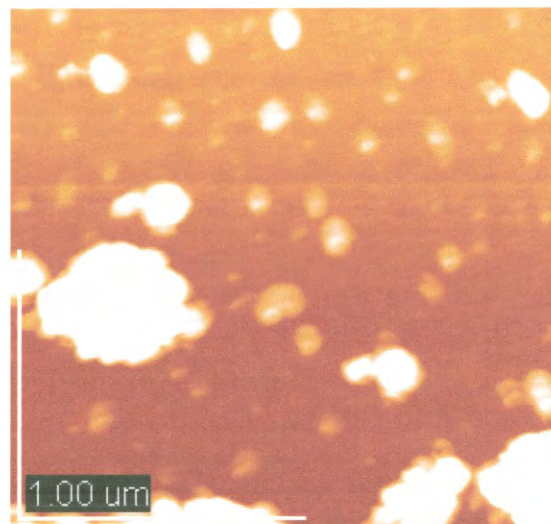


Fig. 29b

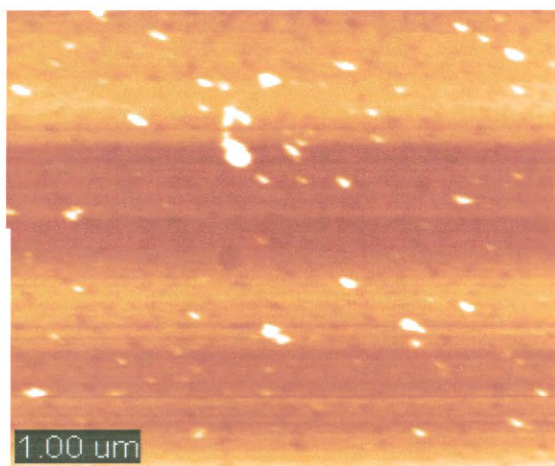


Fig. 29c

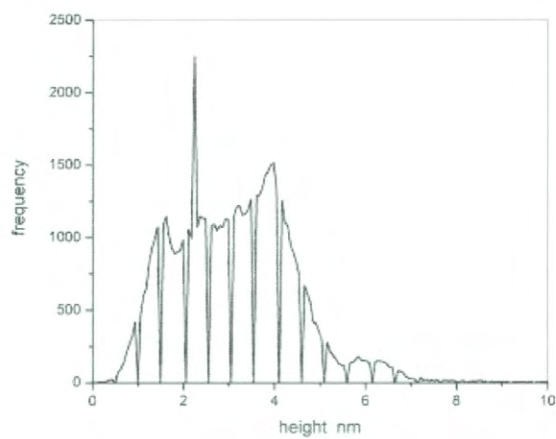


Fig.29d

Figura 29. Imágenes de AFM de las mezclas de QMPM con ácido esteárico para dos concentraciones diferentes de quitosano. a) Acido esteárico, b) QMPM 0.03% con ácido esteárico, c) QMPM 01% con ácido esteárico, d) Histograma de alturas de c.

En la película QMPM con ácido esteárico mostrada en la Figura 29b, se observan agregados más pequeños comparados con los encontrados con el QMPM puro. (Figura 27a). Algunos dominios de 2.3 nm de altura de los agregados del quitosano son también evidentes debido a la monocapa de ácido esteárico. El grado de rugosidad fue de 6.15 nm y la altura del pico de 6.6 nm corresponde a los agregados de quitosano. Obsérvese que la superficie es similar a el caso de colesterol, es más homogénea que la del quitosano puro.

Cuando la concentración fue disminuida, se obtuvo una altura promedio de 3.8 nm (Figura 29 d) y una grado de rugosidad bajo de 1.4 nm. De nuevo esto puede observarse en la Figura 29c, se observan zonas puras de ácido esteárico con alturas promedio de 2.3 nm. Si comparamos estas imágenes con las correspondientes usadas para el colesterol (Figura 27b) se observa una mayor proporción de dominios separados de ácido esteárico y quitosano de medio peso molecular. Las películas de ácido esteárico con diferentes quitosanos son mostradas en la figura 30. Como se observa en la Figura 30a la superficie de la mezcla de QMH con ácido esteárico parece ser más homogénea, comparada con la obtenida en las mismas condiciones para el quitosano con colesterol (Figura 28a) con una altura promedio de 4.3 nm (30b) y el grado de rugosidad de 2.7 nm.

En el caso contrario para el quitosano de alto peso molecular con ácido esteárico (Figura 30c y 30d) las imágenes muestran superficies más heterogéneas con un grado de rugosidad de 7.9 nm, similar a la obtenida con QMPM con ácido esteárico. La distribución de alturas se muestran en la Figura 30d, para las películas de QHPM con

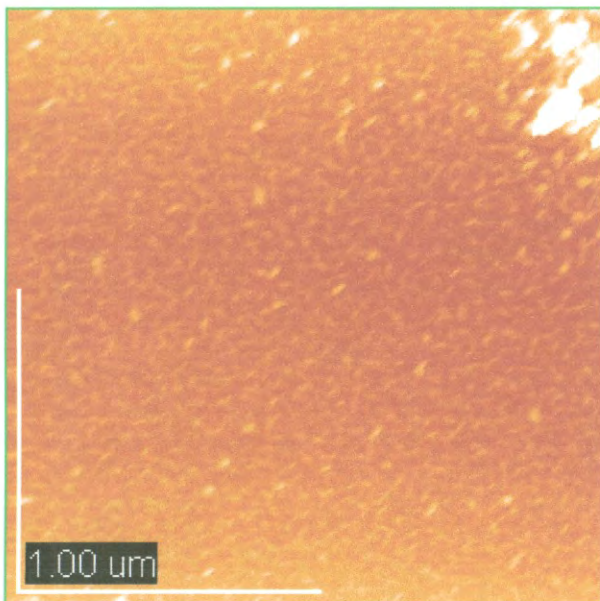


Fig.30a

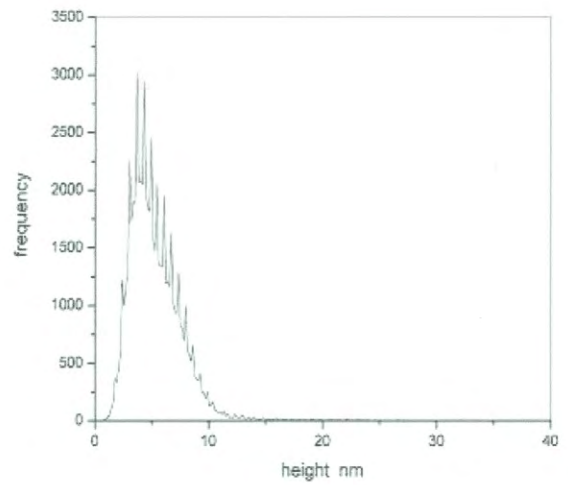


Fig. 30b

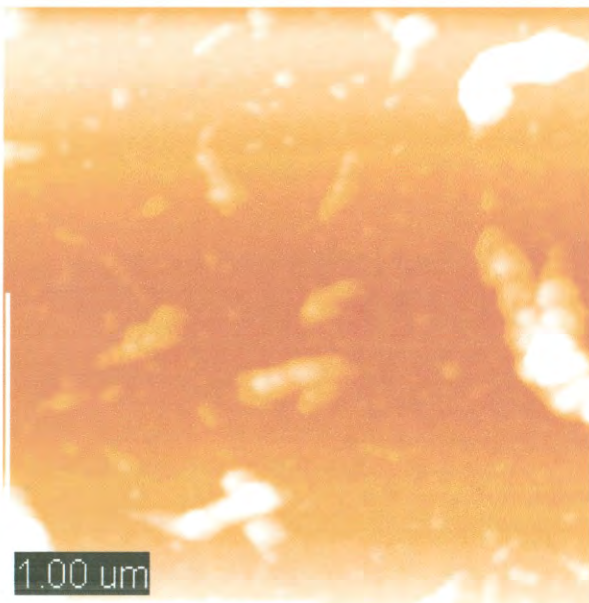


Fig 30c

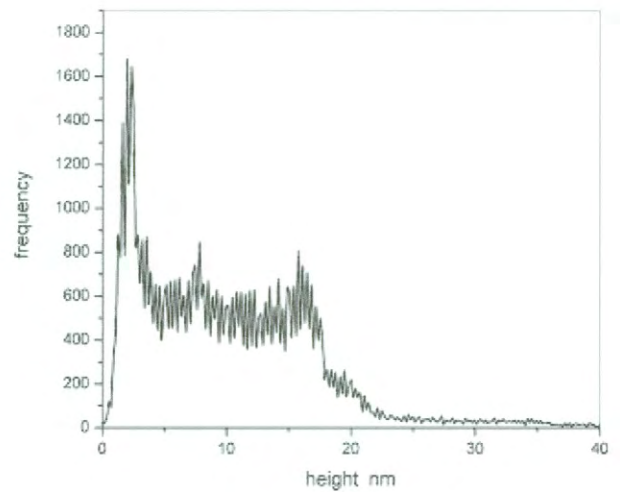


Fig 30d

Figura 30 Imágenes de AFM para dos quitosanos diferentes mezclados con ácido esteárico obtenidos de la balanza de Langmuir. a) QHM 0.03% con ácido esteárico, b) Histograma de altura del QHM con ácido esteárico, c) QHPM 0.03% con ácido esteárico d) Histograma de alturas de QHPM con ácido esteárico.

ácido esteárico presentan dos picos de 2.19 y 16 nm correspondientes a la monocapa de ácido esteárico y los agregados de quitosano respectivamente. El efecto del peso molecular del quitosano puede ser apreciado cuando comparamos la Figura 30c con la Figura 29b, donde el quitosano de medio peso molecular con ácido esteárico muestra una distribución de alturas con dos picos de 2.2 y 6.6 nm debido al ácido esteárico puro en la monocapa y agregados pequeños de quitosano de medio peso molecular.

### **Análisis de infrarrojo**

El análisis de la interacción del quitosano con ácido esteárico fue hecho por espectroscopia de infrarrojo. El espectro mostró las bandas características del quitosano a  $1639-1516\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al grupo  $\text{NH}_3$ , una banda a  $1095\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a anillo piranoso del quitosano. Las bandas correspondientes al ácido esteárico fueron observadas a  $1707\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a el grupo  $\text{COOH}$ . Otra banda característica fue observada a  $1618\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al grupo  $\text{COO}^-$ . Estos resultados están de acuerdo con los encontrados por Dermarger-Andre y colaboradores (44). En las muestras del quitosano con colesterol no muestran evidencias de cambios en el espectro como se observa en la Figura 31. El espectro del complejo quitosano colesterol presentan las mismas bandas que el quitosano puro (resultados no mostrados).

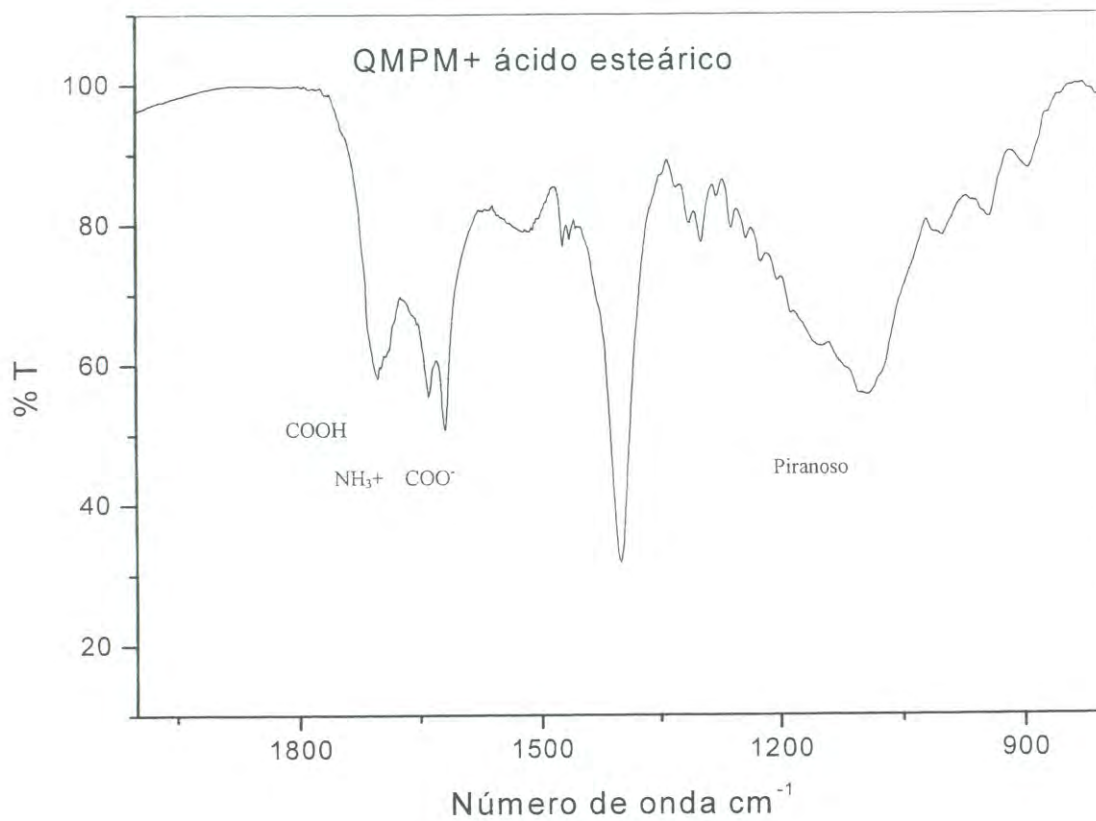


Figura 31. Espectro de IRFT del quitosano-ácido esteárico(KBr).



## **Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

Las mediciones de concentración del colesterol antes y después de mezclarse con los diferentes quitosanos nos muestran que el QMPM tuvo una mayor adsorción de colesterol comparada con las otras macromoléculas esto nos indica que el peso molecular del quitosano tiene un pequeño efecto y esto se puede deber a que quizás la macromolécula se encuentre mas extendida y puede expresar mas sitios de unión en la molécula para el quitosano. El quitosano modificado hidrofóticamente no presenta adsorción del colesterol y esto se lo atribuimos a la modificación del quitosano al cual se le redujo la cantidad de sitios de unión para el colesterol. Los valores obtenidos fueron mas bajos que los obtenido por Chio (46) y colaboradores utilizando ciclodextrinas en las cadenas de quitosano.

Tabla 5. Adsorción del colesterol por los diferentes quitosanos determinados por HPLC. Dos concentraciones de colesterol en cloroformo fueron utilizadas y se mezclaron 10 mL de solución de colesterol (5 y 3g/l) con 0.1g de cada muestra de quitosano (25°C).

Muestra	Concentración de colesterol inicial g/l	Colesterol adsorbido / quitosano g/g	% colesterol adsorbido
QMPPM	3	0.098	33
QHPPM	3	0.085	28
Cloruro de quitosano	3	0.039	13
QMH	3	0	0
QMPPM	5	0.127	42
QHPPM	5	0.115	38
Cloruro de quitosano	5	0.023	8
QMH	5	0.009	3

## Simulación molecular

El polímero de quitosano se construyó tomando en cuenta el grado de acetilación de los quitosanos involucrados (aproximadamente 20%). Primero se optimizó la unidad básica del polímero (monómero), el cual es formado por cuatro unidades de *D*-glucosamina y una unidad de *N*-acetilglucosamida utilizando el método PM3MM con la finalidad de llevar a cabo una buena optimización de los complejos quitosano-colesterol o quitosano-ácido esteárico. Una vez optimizado el complejo monomérico, se procedió a unir 4 unidades monoméricas para formar la estructura de un polímero representativo del complejo

El complejo quitosano-ácido esteárico se representa en la Figura 32, donde se puede apreciar que las moléculas de ácido esteárico se unen al quitosano, formando interacciones electrostáticas con el grupo  $-\text{NH}_3^+$ . La molécula fue modelada del quitosano en fase gaseosa y fue muy similar a la reportada por Kim y colaboradores (45) y se protonó a los grupos amino presentes a lo largo de toda la molécula del quitosano. Con respecto a la molécula quitosano-colesterol, el colesterol se une al quitosano de una manera similar que con ácido esteárico. Pero en este caso, la interacción se lleva a cabo entre los grupos OH (del colesterol) y  $-\text{NH}_3^+$  (del quitosano protonado) (Figura 33).

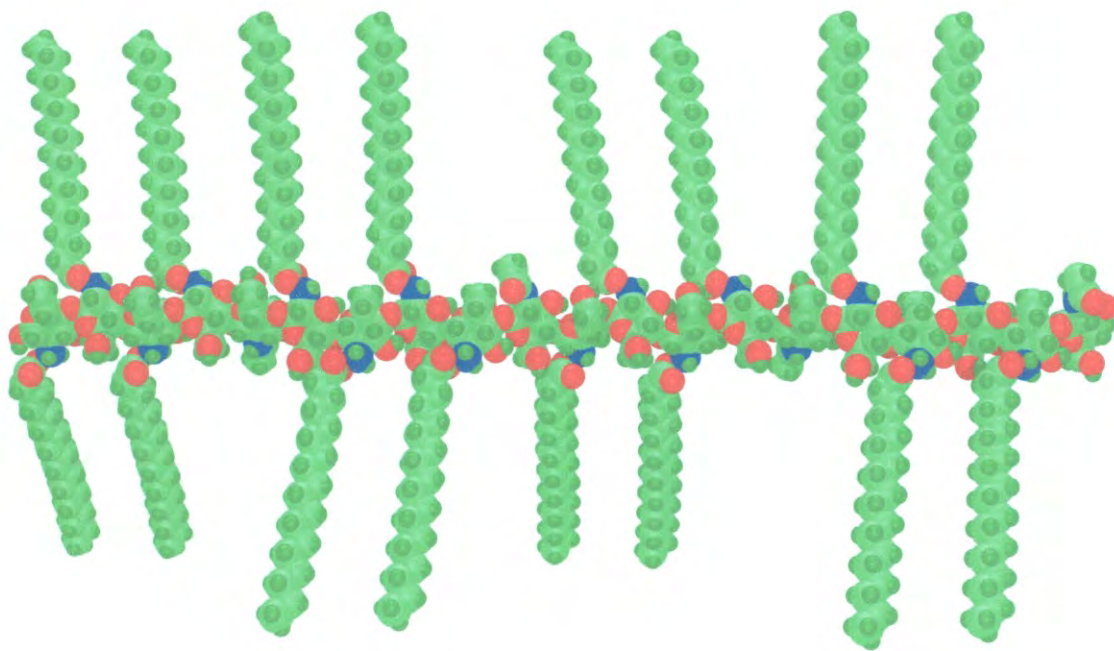


Figura 32. Estructura molecular quitosano-ácido esteárico calculada con Mecánica Molecular (UFF). El color rojo representa a los oxígenos(O) el azul al nitrógeno (N).

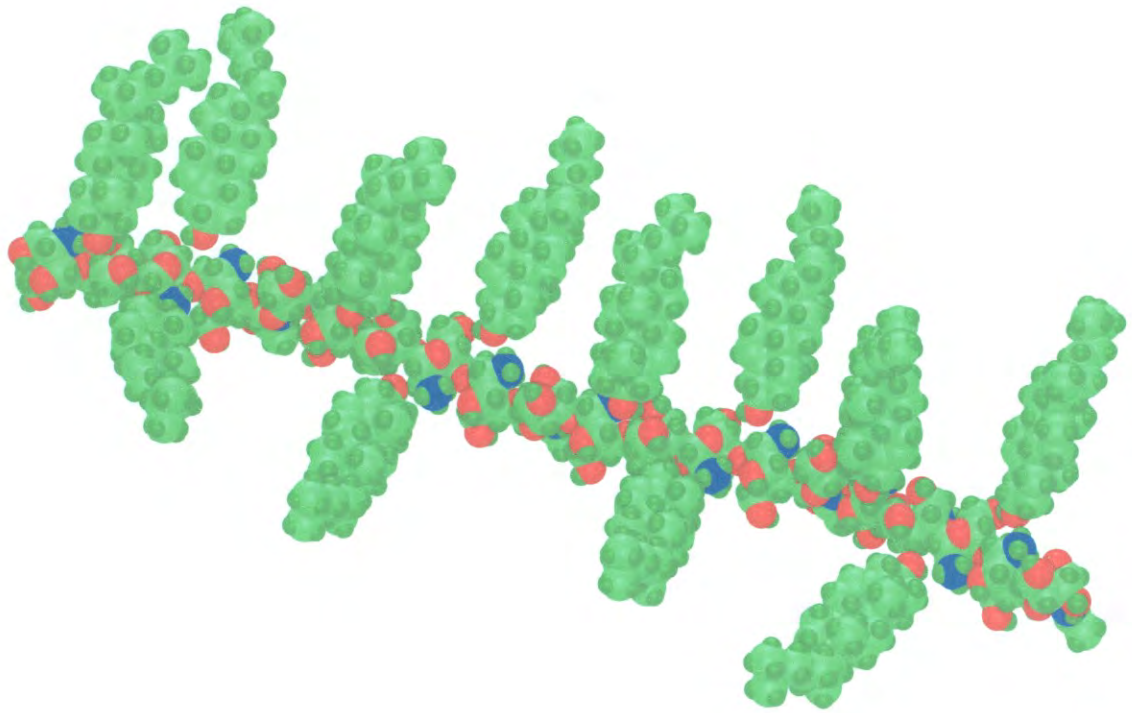


Figura 33. Estructura molecular quitosano-colesterol calculada por Mecánica Molecular (UFF).

## Conclusiones

En este trabajo investigamos la interacción de colesterol y ácido esteárico con diferentes quitosanos en la interfase aire-agua. Nuestros resultados muestran grandes modificaciones de las isothermas y una buena estabilidad de las monocapas de colesterol y ácido esteárico con las diferentes concentraciones de quitosanos en la subfase. De las mediciones del área extrapolada y el área límite de condensación de las diferentes muestras, nosotros concluimos que las moléculas de colesterol y ácido esteárico están unidas a sitios específicos de las moléculas de quitosano durante el ciclo de compresión de la isoterma, produciendo grandes espacios de colesterol y ácidos esteáricos modificando la monocapa de la fase sólida. La rigidez de la película de las monocapas para ambos colesterol y ácido esteárico, resultaron fuertemente afectados por la interacción del quitosano produciendo una película más flexible. Las mediciones de AFM de las muestras de Langmuir Blodgett de las mezclas de quitosano-colesterol y quitosano- ácido esteárico indican que el colesterol tiene una mejor afinidad con el QHPM y QMPM, pero no con QMH, estos resultados pueden ser correlacionados con la adsorción insignificante del colesterol por el polvo de QMH. Por el contrario el ácido esteárico de acuerdo con los experimentos de AFM, mostraron más afinidad con QMH comparados con los dominios separados que se observa para QHPM y QMPM. Finalmente, la simulación de los complejos quitosano-colesterol y quitosano-ácido esteárico en el bulto y sin tomar en cuenta otras condiciones, indicaron estar de acuerdo con los resultados de las isothermas, que las moléculas de colesterol están unidas a la molécula del quitosano en la interfase aire / agua.

## Bibliografía

- (1) Hwang, J. K.; Shin, H. H. *Korea-Australia Rheological Journal* 2000, V 12 No ¾, 175-179.
- (2) Arguelles – Monal, W.; Goycoolea, F. M.; Lizardi, J.; Peniche, C.; Higuera- Ciapara, I. in *ACS Symposium*; Bohidar, H. B.; Dubin, P. and Osada, Y., Eds. Series 833; Amer. Chem. Soc., Washington, D. C., 2003, pp 102-121.
- (3) Onsoyen, E.; *Proc. 5<sup>th</sup> Int. Conf. on Chitin and Chitosan*, Princeton, 1991, N J., 17-20.
- (4) Li, Q.; Dunn, E. T.; Grandmaison, E. W.; Goosen, M. F. A. In *Applications of chitin and chitosan*; Gossen, M. F. A.; Ed.; Technomic Publishing Co., Lancaster, 1997, 3-29.
- (5) Muzzarelli, R. A. A. ; Frega, N. ; Milani, M.; Muzzarelli, C. ; Cartolari, M. *Carbohydrate Polymers* 2000, 43, 263-268.
- (6) Fäldt, P.; Bergenstahl, B.; Claesson, P. M. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 1993, 71, 187-195.
- (7) Magdassi, S.; Bach, U.; Mumcuoglu, K. Y. *Journal of Microencapsulation* 1997, 14, 189-195.
- (8) Sathirakul, K. In *Advances in Chitin Science*; Chen, R. H.; Chen, H. C., Eds. Rita Adv.; Taiwan, 1999, Vol. 3, pp 469-474.
- (9) Okahata, Y.; Kobayashi, T.; Tanaka, K. *Langmuir* 1996, 12, 1326-1330.
- (10) Kim, K.; Kim, C.; Byun, Y. *Langmuir* 2001, 17, 5066-5070.
- (11) Wang, X.; He, Q.; Zheng, S.; Brezesinski, G.; Möhwald, H.; Li, J. J. *Phys. Chem. B.* 2004, 108, 14171-14177. )
- (12) *Quitina y quitosano obtención, caracterización y aplicaciones*, Ed. Pastor A, Pontificia Universidad Católica del Perú 2004.
- (13) N. Errington, S.E. Harding, K.M. Varum and L. Illum, *Hydrodynamic characterization of chitosans varying in degree of acetylation*, *Int. J. Biol. Macromol.* 1993 vol 15.113-117.
- (14) Cristobal Lares Velásquez, *algunos usos del quitosano en sistemas acuosos*, revista *Iberoamericana de Polimeros* vol 4 (2003)91-109.
- (15) Masatoshi Sugimoto, Minoru Morimoto, Hitoshi Sashiwa, Hiroyuki Saimoto, *preparation and characterization of water-soluble chitin and chitosan derivatives*, *Carbohydrate Polymers* 36(1998) 49-59.

- (16) Robert Gareth Langmuir –Blodgett films, Plenum press, New York and London 1990.
- (17) R.H. Tredgold, order in thin organic films, Cambridge University press New York 1994.
- (18) Abraham Ulman Ultrathin organic films academic press, San Diego, New York, Boston, London ,Sidney Tokyo Toronto 1991.
- (19) P. Martín and M. Szablewski, Nima technology operating manual 6<sup>th</sup> edition, England 2002.
- (20) George L. Gaines Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces, Interscience Publishers, New York, London, Sidney.
- (21) Ryley S, Chyla A. T. and Peterson I.R. 2000 Thin Solid Films 370 294.
- (22) Peterson I.R. 1992 Molecular Electronics Ashwell G.J Edt. 117.
- (23) Bilewicz R, Sawaguchi T, Chamberlain R. V. and Majda M. 1995 Langmuir 11 2256.
- (24) Nicolae C.A, Cantin-Riviere S., El Abed A, Peretti P,1997 Langmuir 13 5507.
- (25) Patrycja Dynarowicz-Latka, Colloids and Surfaces B 2004, 21-25
- (26) N.N. and Godovski Yu K. 2003 36 72 36. Brown, D. And London, E., 1998, J. Membr. Biol., 164,103.
- (27) Simons, K, and Ikonen, E.,2000, Science, 290,1721.
- (28) Guo, W., Morritet, J. DeBakey et al, 1963, Biochim. Biophys Acta, 75,65
- (29) JSPM-4210/TM-4210BU SCANNING PROBE MICROSCOPE JEOL
- (30) Skoog,D,A y Learly, J.,J(1994). Análisis Instrumental.4ta edición , editorial McGraw-Hill.España.
- (31) Karla Yezmil Herrera V. Tesis Síntesis de un nuevo Ligante Dioxotetraamina de Cadena Abierta Derivado de 1-Aminopireno y estudio espectroscópico de sus complejos metálicos, junio 2003
- (32) Andrea Westen, Phyllis R. HPLC and CE Principles and Practice, Ed. Academic Press, San Diego California 1997.
- (33) Gilbert W. Castellan, Addison Wesley, segunda ed. Ed. Addison Wesley, Mexico D.F 1987.
- (34) Desbrières, J.; Martinez C.; Rinaudo, M. International Journal of Biological Macromolecules, 1996, 19, 21-28.



- (35) M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. A. Montgomery, Jr., R. E. Stratmann, J. C. Burant, S. Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 1998.
- (36)(a) J. J. P. Stewart, *J. Comp. Chem.* **1989**, *10*, 209. (b) J. J. P. Stewart, *J. Comp. Chem.* 1989, *10*, 221. (c) E. Anders, R. Koch, and P. Freunsch, *J. Comp. Chem.* **1993**, *14*, 1301.
- (37) A. K. Rappé, C. J. Casewit, K. S. Colwell, W. A. Goddard III, and W. M. Skiff, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10024.
- (38) Soane, R.; Miñones, J.; Conde, O.; Miñones, Jr. J.; Casas, M.; Iribarnegaray, E. J. *Phys. Chem. B.* 2000, *104*, 7735-7744.
- (39) Sparr, E.; Ericksson, L.; Bouwstra, J. A.; Ekelund, K. *Langmuir* 2001, *17*, 164-172.
- (40) Rey Gómez-Serranillos, I.; Miñones, Jr., J.; Dynarowicz-Latka, P.; Miñones, J.; Iribarnegaray, E. *Langmuir* 2004, *20*, 928-933.
- (41) Li, X. M.; Smaby, J. M.; Momsen, M. M.; Brockman, H. L.; Brown, R. E. *Biophys J.* 2000, *78*(4), 1921-1931
- (42) Ybert C., Lu W. Möller G. and Knobler C. M. 2002, *J. Phys. Chem.* 106 2004.
- (43) Valdes-Covarrubias, M. A.; Cadena-Nava, R. D.; Vásquez-Martínez, E.; Valdez-Pérez, D.; Ruiz-García, J. J. *Phys: Condens. Matter* 2004, *16*, 2097-2107
- (44) Demarger, A.; Domard, A. *Carbohydrate Polymers* 1995, *27*, 101-107.
- (45) Kim, Y. H.; Gihm, S. H.; Park, C. R. *Bioconjugate Chem.* 2001, *12*, 932-938.
- (46) Chiu, S.; Chung, T.; Giridhar.; Wu, W. *Food Research International* 2004, *37*, 217-223.