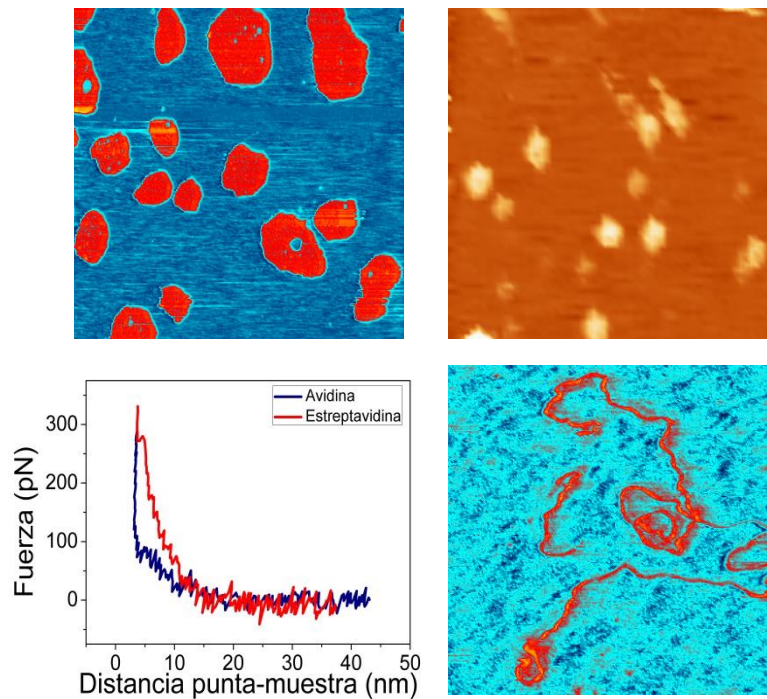


ESTUDIO DE INTERACCIONES ELECTROSTATICAS DE BIOMOLÉCULAS EN MEDIO LÍQUIDO POR MICROSCOPIA Y ESPECTROSCOPIA DE FUERZAS.



TESIS DOCTORAL

Septiembre 2014

Lisa Francisca Almonte García

Universidad Autónoma de Madrid

Consejo Superior de Investigación Científica-CSIC

ESTUDIO DE INTERACCIONES ELECTROSTATICAS DE BIOMOLÉCULAS EN MEDIO LÍQUIDO POR MICROSCOPIA Y ESPECTROSCOPIA DE FUERZAS.



Lisa Francisca Almonte García

TESIS DOCTORAL

Propuesta para optar al grado a

Doctor en Física

Por la Universidad Autónoma de Madrid

Directores

Dr. Arturo Baró

Dep. de Superficie y Recubrimiento del Instituto de Ciencia de materiales de Madrid

Consejo Superior de Investigación Científica

Dr. Jaime Colchero

Dep. de Física de la Materia Condensada del centro de investigaciones Ópticas y
Nanofísicas

Universidad de Murcia

Tutor

Julio Gómez Herrero

Dep. de Física de la materia condensada

Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid

Índice

Introducción	9
Capítulo 1. Membranas biológicas	13
1.1 Lípidos de membrana	14
1.2 Estructura de la membrana	17
1.3 Proteínas de membrana	19
1.4 Geometría de los lípidos	22
1.5 Bicapas lipídicas	24
1.5.1 Fluidez de la bicapa lipídica	25
1.5.2 Propiedades de la dinámicas	26
1.5.3 Formación de los soportes lipídicos	27
1.6 Referencia	31
Capítulo 2. El microscopio de Fuerzas Atómicas	39
2.1 Fundamento y componente de la microscopia de fuerzas atómicas.	40
2.1.1 Celda Líquida	41
2.1.2 La micropalanca y la punta	42
2.1.3 Calibración de la micropalanca	43
2.2 Fuerza de interacción punta muestra	45
2.2.1 Medida estática de la fuerza	45
2.2.2 Medida dinámica de la fuerza	46
2.3 Modos de operación	48
2.3.1 Modo contacto	48
2.3.2 Modo Jumping	49
2.3.3 Modo Dinámicos	50
2.3.4 Modo FSI	52
2.4 Fuerza en medio líquido	57
2.4.1 Fuerzas de Van der Waals	57
2.4.2 Fuerzas Electroestáticas de la doble capa y la teoría DLVO	57

2.5 Referencia	60
----------------	----

Capítulo 3. Diferenciación de carga superficial de Avidina y Estreptavidina por medio de AFM-FS

3.1 Motivación y objetivo	65
3.2 Introducción	66
3.3 Métodos experimentales	67
3.3.1 Preparación de la muestra	67
3.3.2 Detalles experimentales	69
3.4 Resultados	69
3.4.1 Adhesión de la bicapa lipídica al sustrato de mica	69
3.4.2 El modo de operación FSI aplicado a proteínas de estrept(avidina) ancladas a una bicapa biotinilada	71
3.4.3 Archivos FSI de avidina y estreptavidina	73
3.5 Discusión	77
3.6 Conclusiones	79
3.7 Referencia	81

Capítulo 4. La inversión de la carga de moléculas individuales en superficies

4.1 Motivación y objetivo	85
4.2 Preparación de la muestra	86
4.3 Resultados	87
4.5 Discusión	94
4.6 Conclusiones	96
4.7 Referencia	98

Capítulo 5. Aplicación del modo AC-DAFM al estudio de muestras con carga heterogénea evitando el contacto mecánico

5.1 Motivación y objetivo	101
5.2 Introducción	102
5.3 Métodos experimentales	104

5.3.1 Preparación de la muestra	104
5.3.2 Caracterización de la muestra por AFM	105
5.4 Resultados	106
5.4.1 Caracterización de la molécula de ADN	106
5.4.2 Visualización de una molécula de ADN en espectroscopia FSI dinámica	107
5.4.3 Caracterización de la bicapa lipídica en modo AC-DAFM	109
5.4.4 Caracterización de la bicapa lipídica en modo FC-DAFM	111
5.4.5 Análisis cuantitativo de la curva de la espectroscopia dinámica FSI	112
5.5 Conclusiones	114
5.6 Referencias	115
Conclusiones Generales	117
Agradecimientos	121

Introducción

En los últimos años la nanociencia se ha convertido en uno de los campos más desarrollados en la ciencia. Es ésta un área multidisciplinar que engloba, la investigación aplicada como fundamental, de muy diversas áreas, teniendo únicamente en común el hecho de que las investigaciones se realizan a escala nanométrica.

En particular, la biofísica es el campo que enlaza la forma y las funciones biológicas para comprender el funcionamiento de los mecanismos en los sistemas biológicos utilizando los principios de la física y la química que gobiernan dicho procesos.

La membrana biológica es un complejo supramolecular de lípidos, carbohidratos y proteínas, formado como resultado de interacciones no covalentes. Su base estructural es una bicapa lipídica, que posee una región hidrofóbica central separada de la fase acuosa por dos regiones polares. La estructura, dinámica y propiedades mecánicas de las biomembranas vienen determinadas principalmente por las propiedades físico-químicas de los lípidos. Éstos imponen un orden líquido-cristalino que se extiende también a las proteínas o péptidos insertados en la bicapa, pudiendo verse afectados en su estructura, orientación, dinámica y estado de agregación.

La electrostática de bicapas lipídicas cargadas ha sido discutida extensamente en un gran número de revisiones. Estas discusiones están relacionadas fundamentalmente con aspectos tales como, la distribución iónica, el potencial electrostático, la longitud de apantallamiento de Debye, la permitividad eléctrica, el grado de hidratación y la termodinámica. De estos estudios, se concluye que los lípidos cargados son el origen de fuerzas electrostáticas no específicas, capaces de afectar a la concentración de iones y pequeñas moléculas cargadas en la fase acuosa cercana a la superficie de la membrana.

Muchos procesos fisiológicos están condicionados por la distribución específica de cargas en las moléculas que en ellos intervienen. Por ejemplo, los lípidos aniónicos afectan al control celular de la coagulación de la sangre. Por otro lado, la interacción electrostática es una de las fuerzas de mayor importancia entre las que provocan la unión de péptidos catiónicos a membranas de procariotas y la desestabilización de estas últimas. Este tipo de interacción dirige los procesos de adsorción, orientación e internalización de proteínas, entre ellos los que se encuentra la avidina.

Las proteínas que se unen a la membrana alteran su composición y cambian el contexto físico-químico de la zona cercana a su interacción, pudiendo acabar afectando a la organización molecular de la propia membrana de acogida. Tales perturbaciones o deformaciones de la bicapa lipídica pueden relacionarse también con sus propiedades mecánicas y son de gran importancia para definir la estabilidad y estructura funcional del complejo bicapa-proteína. De esta forma, muchos de los procesos dinámicos que ocurren en las membranas biológicas son el resultado de la adaptación mutua entre lípidos y proteína. El funcionamiento de una célula depende no sólo de la proteína sino también de lípidos que contiene. Las membranas de las células están implicados en muchos procesos fisiológicos y estas reacciones son controladas por la superficie de las membranas, por la presencia de cargas en las superficies, la concentración de iones y el pH del medio ambiente, afectan tanto la conformación y como la función de las proteínas.

Existen muchas técnicas para la medición de estas propiedades en el nivel macroscópico, pero hace unos pocos años, con el auge de la Nanociencia, se abrió nuevo campo para entender el funcionamiento de las moléculas individuales en células con la ayuda de la AFM.

Microscopía de fuerza atómica es una técnica establecida para obtener imágenes de las superficies de los sistemas biológicos en su ambiente nativo en alta resolución y de la topografía de las proteínas nativas con una resolución hasta la escala nanométrica sub demostrar el poder de este microscopio y, recientemente se ha empleado para el estudio de propiedades físico químicos. EL AFM es sensible a las interacciones de corto y largo alcance en solución de electrolito proporcionando información cuantitativa y sobre sus propiedades mecánicas.

Las imágenes de cambios conformacionales y I mapear las flexibilidades de proteínas nativas a una resolución de nanómetros sugiere que la dinámica de superficies de las proteínas se pueden observar directamente y caracterizar usando este microscopio. Para comprender la actividad biológica de las proteínas en las membranas celulares, es importante para estudiar las proteínas que interactúan con lípidos.

La fuerza electrostática es una de las interacciones más importantes en una célula, determinadas de alguna manera como las moléculas interactúan con la membrana. Propiedad que afecta diversos procesos indispensables para la vida. Son varios los estudios de AFM es un instrumento capaz de generar imágenes de alta resolución ha permitido que seamos capaces de ver y estudiar las moléculas

biológicas en su ambiente a pH fisiológico y en los últimos años se ha desarrollado una técnica que permite obtener imágenes en los 3 sentidos ofreciendo oportunidades para el estudio de las moléculas que consiguen de forma individual sus propiedades fisicoquímicas, esta herramienta nos ayudará a entender mejor lo que sucede en el momento oportuno a nivel Nano. Estas condiciones son un requisito imprescindible para poder realizar estudios de integración de las proteínas, de su disposición en la bicapa y de su función biológica. La posibilidad de aplicar técnicas nanométricas, como la microscopía de fuerza atómica, al estudio del proceso de reconstitución de proteínas, puede permitir conocer el tipo de interacción molecular.

Con el fin de aportar información sobre estos aspectos, se plantearon las siguientes hipótesis de trabajo:

Las propiedades fisicoquímicas de los fosfolípidos (fluidez, carga electrostática, existencia de dominios, etc.) tienen influencia en la integración de las proteínas en las bicapas y eventualmente en su actividad biológica.

La unión de las proteínas en la membrana, puede estudiarse mediante métodos que permiten medir los cambios de potencial electrostático de la superficie y la fluidez de la bicapa.

La unión de las proteínas en la membrana biológica, puede visualizarse mediante la técnica nanométrica de microscopía de fuerza atómica.

El objetivo general de esta Tesis es el estudio de fuerzas electrostáticas en sistemas investigar la incorporación de proteínas de membrana en bicapas de fosfolípidos mediante la microscopía de fuerza atómica (AFM) para visualizar este fenómeno, y obtener mapas fuerzas a nivel molecular. Se escogieron dos composiciones lipídicas neutras: B-DPPE, DOPC (:1, mol:mol), dos cargadas: DPPC:DOTAP (3:1, mol:mol). Se eligieron dos proteínas la avidina y la estreptavidina y la molécula de DNA

Para ello se han planteado los siguientes objetivos específicos:

Caracterización de membranas lipídicas funcionalizadas preparadas con diversas técnicas.

Inmovilizar las proteínas de forma individual por medio del anclaje específico sobre la membrana.

Diferenciar las proteínas por espectroscopias de fuerza individualmente para estudiar sus propiedades físicas y químicas y generado mapa de fuerza.

Utilizamos el AFM en primer lugar para una caracterización de una bicapa vinculados e inmovilización de una sola proteína y realizando mapas de la fuerza con el modo FSI.

Estudiar propiedades electrostáticas, a partir de modos dinámicos de los sistemas de microscopias de fuerza atómica.

Capítulo 1. Membranas biológicas

En general, la célula se puede definir como la unidad de organización y de funcionamiento de todos los organismos vivos conocidos (Figura 1.1). La membrana celular constituye la envoltura de la célula delimitándola y, por tanto, separando el citoplasma y sus orgánulos del medio que los rodea. Este papel no es pasivo, ya que la membrana actúa como una barrera selectiva para el intercambio y el transporte de sustancias. La membrana está formada por una bicapa lipídica y proteínas que se adhieren o intercalan. La bicapa lipídica proporciona una estructura básica y actúa de barrera permeable y las proteínas intervienen en el resto de las funciones de membrana. De esta forma la bicapa lipídica se establece como base universal de la estructura de la membrana celular y sus propiedades son las responsables de las propiedades generales en una membrana biológica. [Robertson83; Harrison98] [Finean78; Quinn76].

La membrana está involucrada en casi todos los aspectos de la actividad celular, desde funciones mecánicas simples, tales como la movilidad, captura de alimentos y transporte, a procesos bioquímicos altamente específicos, tales como la transducción de energía, el reconocimiento inmunológico, la conducción nerviosa, y la biosíntesis. Otras funciones esenciales son la producción y control de gradientes electroquímicos, intercambio de señales entre el medio externo y el medio celular, división celular, inmunología celular, endocitosis y exocitosis.

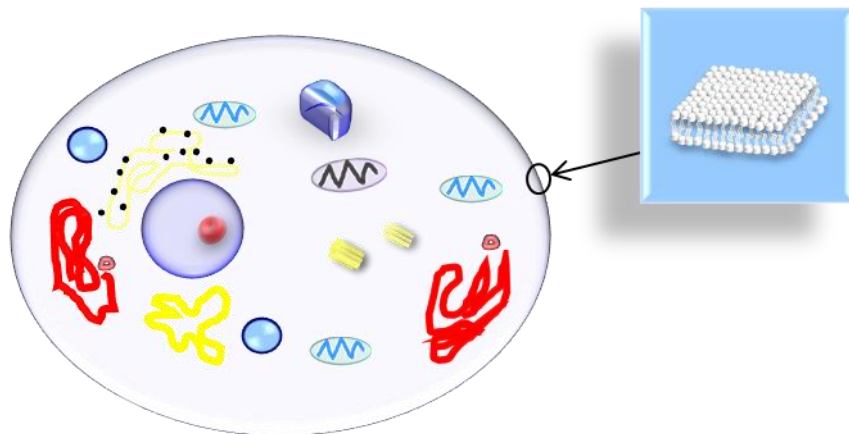


Figura 1.1- Esquema representativo de una célula y detalle de la membrana celular.

1.1 Lípidos de membrana

En la figura 1.2 se muestra la estructura de los lípidos. Estos están formados por una cabeza polar con carácter hidrofílico (miscible con el agua) y una cola apolar con carácter hidrofóbico (no miscible con el agua). Estas dos partes se encuentran unidas entre sí mediante un enlace covalente [Freedman03; Nelson04]. Toda molécula con propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas recibe el nombre de anfifílica.

Los lípidos de membrana presentes en mayor porcentaje en la célula se agrupan en tres clases de lípidos principalmente: fosfolípidos, glicolípidos y colesterol [Dowhan02]. Los fosfolípidos y glicolípidos pueden ser tanto glicerolípidos o esfingolípidos en función de los residuos de alcohol.

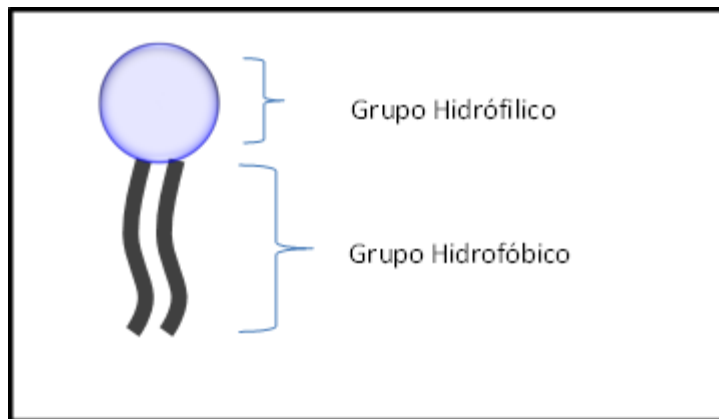


Figura 1.2 Representación esquemática de un lípido anfifílico

La carga del lípido viene determinada por la carga de la cabeza polar [Rosen78]. En función de la carga se pueden clasificar como aniónicos (cargados negativamente), catiónicos (cargados positivamente), zwitteriónicos (pudiendo tener tanto cargas positivas como negativas en función del medio) y no iónicos (sin cargas).

Los fosfolípidos cuya cabeza polar está compuesta por un grupo fosfato, constituyen el ácido fosfatídico. Poseen una molécula de glicerol, que es la unidad estructural de los fosfoglicéridos, y de la cual derivan los distintos tipos al unirse a alcoholes aminados como etanolamina, colina, serina. En general, la estructura de los fosfolípidos puede ser representada como muestra la figura 1.3, siendo R3 la cabeza polar que confiere la carga a los fosfolípidos. En la tabla 1.1 se muestran las moléculas

más frecuentes presentes en las cabezas polares, donde R1 y R2 representan las dos colas hidrofóbicas.

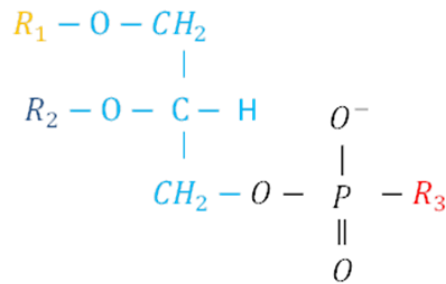


Figura 1.3 Estructura química de un Fosfolípido

Los glicolípidos normalmente son neutros, llamados así por presentar una cabeza polar formada por carbohidratos neutros [Alberts02], existiendo moléculas compuestas por un grupo fosfato y otro carbohidrato llamadas glicofosfolípidos.

El colesterol tiene una estructura distinta compuesta por pequeños y rígidos núcleos hidrofóbicos y un grupo hidroxilo que actúa de región polar. La función principal del colesterol es ocupar posiciones entre las cadenas de ácidos grasos, reduciendo la posibilidad de curvatura y aumentando así la rigidez en la membrana.

Región Polar	Nombre	Abrev.	Carga (pH=7.4)
$ \begin{array}{c} O \\ \\ O - P - OH \\ \\ O^- \end{array} $	Ácido fosfatídico	PA	Negativa
$ \begin{array}{c} O \\ \\ O - P - O - CH_2 - CH_2 - N^+ \begin{array}{l} / CH_3 \\ CH_3 \\ \backslash CH_3 \end{array} \\ \\ O^- \end{array} $	Fosfatidilcolina	PC	Zwiteriónico
$ \begin{array}{c} O \\ \\ O - P - O - CH_2 - CH_2 - NH_3^+ \\ \\ O^- \end{array} $	Fosfatidiletanolamina	PE	Zwiteriónico
$ \begin{array}{c} O \quad \quad H \\ \quad \quad \\ O - P - O - CH_2 - C - NH_3^+ \\ \quad \quad \\ O^- \quad \quad COO^- \end{array} $	Fosfatidilserina	PS	Negativa
$ \begin{array}{c} O \quad \quad OH \\ \quad \quad \\ O - P - O - CH_2 - CH - CH_2 - OH \\ \\ O^- \end{array} $	Fosfatidilglicerol	PG	Negativa
$ \begin{array}{c} OH \quad OH \\ \quad \\ O - P - O - \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ O^- \\ OH \quad OH \end{array} $	Fosfatidilinositol	PI	Negativa

Tabla 1.1 Nombres y estructuras de algunas cabezas polares típicas.

La carga superficial de los lípidos crea un campo eléctrico que afecta a la estructura de la bicapa, a su fluidez y al transporte de moléculas a través de la membrana [Cevc87]. Además la carga superficial juega un papel trascendental en la estabilidad de las membranas. Los procesos de agregación y fusión de liposomas están controlados, en gran parte, por la repulsión o atracción de sus superficies lipídicas. La carga superficial de las membranas biológicas depende de la composición de los lípidos de la bicapa.

Los ácidos grasos llamados de cola hidrofóbica están constituidos por cadenas hidrocarbonadas unidas a un grupo carboxilo (-COOH). Los ácidos grasos se clasifican de acuerdo a su longitud, aunque los ácidos grasos predominantes en las células tienen un número par de átomos, generalmente 14 y 20 átomos de carbono (Tabla 1.2). Los ácidos grasos a menudo son designados por las abreviaturas Cx:y, donde “x” es el número de carbono en la cadena e “y” es el número de enlaces dobles. Los ácidos grasos que contienen 12 o más átomos de carbono son casi insolubles en soluciones acuosas debido a sus largas cadenas hidrofóbicas de hidrocarburos.

Nombre Común	Átomos de carbono	Punto de Fusión (°C)	Fórmula Molecular
			Ácidos grasos saturados
Ácido Láurico	12:0	44,2	$C_{12}H_{24}O_2$
Mirístico	14:0	54,0	$C_{14}H_{28}O_2$
Palmítico	16:0	63,0	$C_{16}H_{32}O_2$
Esteárico	18:0	69,6	$C_{18}H_{36}O_2$
Araquídico	20:0	76,5	$C_{20}H_{40}O_2$
			Ácidos grasos insaturados
Palmitoleico	16:1	-0,5	$C_{16}H_{30}O_2$
Oleico	18:1	13,4	$C_{18}H_{34}O_2$
Linoleico	18:1	-3	$C_{18}H_{32}O_2$
Linolénico	18:2	-11	$C_{18}H_{32}O_2$
Araquidónico	20:4	-49,5	$C_{20}H_{32}O_2$

Tabla 1.2 Clasificación de las cadenas de ácidos grasos.

Los ácidos grasos se clasifican de acuerdo a su longitud y al grado de saturación de sus cadenas en saturados e insaturados. Los ácidos grasos sin dobles enlaces carbono-carbono se denominan saturados; aquellos con al menos un doble enlace son insaturados y si contienen más de un doble enlace se denominan poliinsaturados.

Los enlaces dobles de carbono (C=C) no presentan libre rotación por lo que dan lugar a la aparición de isómeros geométricos cis y trans, que se diferencian por la orientación de los átomos de hidrógeno con respecto al doble enlace: en el isómero cis se sitúan en el mismo lado lo que provoca un codo o curvatura en la cadena hidrocarbonada que impide el empaquetamiento compacto de las cadenas, disminuyendo así la temperatura de fusión y provocando un aumento en la fluidez de la membrana. En el isómero trans los hidrógenos se sitúan en lados opuestos, dando lugar a una conformación lineal (Figura 1.4). En general los sistemas biológicos contienen la configuración cis [Nacamura04].

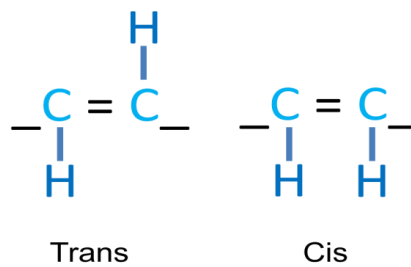


Figura 1.4 Isomería de las cadenas de ácidos grasos

Debido a su naturaleza anfifílica, la principal función de los fosfolípidos y glicolípidos es estructural, ya que hace posible la formación de la bicapa debido a sus interacciones hidrofóbicas. Algunos lípidos realizan funciones biológicas de señalización, adhesión o mantenimiento de las funciones enzimáticas.

1.2 Estructura de la membrana

Como se ha mencionado anteriormente, la membrana celular está formada por una bicapa lipídica, considerablemente fluida en la que se sitúan o intercalan una serie de proteínas. Los lípidos desempeñan un papel principalmente estructural y mientras que las proteínas realizan la mayor parte de las funciones. El modelo de la estructura de las membranas biológicas más acertado hasta la fecha ha sido el del mosaico fluido [Singer72]. En este modelo se propone que los fosfolípidos de las membranas se

organizan en una bicapa para formar una matriz fluida de cristal líquido (Figura 1.5). En la bicapa las moléculas individuales de lípido pueden moverse de manera lateral otorgándole fluidez, flexibilidad y alta resistencia eléctrica a la membrana, al mismo tiempo que proporcionan impermeabilidad relativa hacia moléculas altamente polares.

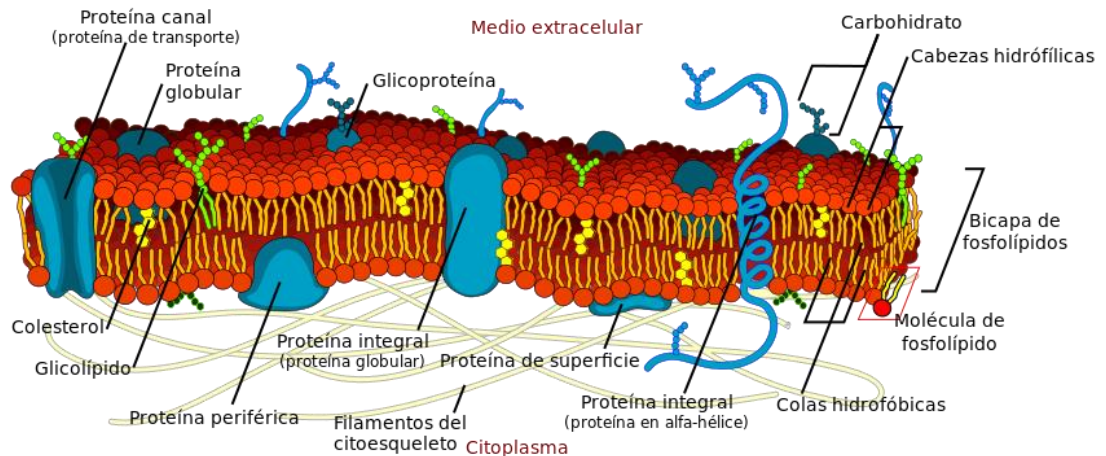


Figura 1.5 Modelo del mosaico fluido de Singer y Nicolson para la estructura de una membrana celular. Imagen obtenida de [Wikipedia].

La membrana celular comúnmente contiene 50 o más proteínas diferentes y lípidos (fosfolípidos y glicolípidos) con distintos grupos en la cabeza, números de cadena, longitud de la cadena y grados de saturación así como esteroides (colesterol) y otras moléculas anfifílicas. La constitución de la membrana depende del tipo de célula. En cualquier caso, las membranas celulares no son sistemas rígidos inalterables sino que están sometidas a cambios funcionales y adaptativos de renovación, desfiguración y reconstrucción. La estructura de la bicapa es mantenida por interacciones de Van der Waals entre las cadenas de lípidos, aunque el ambiente acuoso exterior puede variar ampliamente su fuerza iónica y su pH. Entre todos los tipos de interacciones moleculares que se producen en las membranas celulares, la interacción electrostática está siempre presente, ya que las proteínas y los lípidos están cargados en condiciones fisiológicas. La interacción electrostática es especialmente importante, ya que la dinámica de la membrana implica la difusión lateral de los lípidos cargados y la asociación electrostática de las proteínas. Por lo tanto, las fuerzas electrostáticas sobre la membrana son de fundamental importancia para el estudio cuantitativo de la dinámica de la membrana y las actividades celulares relacionadas. Existen distintos

estudios sobre la dinámica de la membrana y las interacciones electrostáticas con las proteínas de membrana. [Vance96; Anderson02; McConnell86; Jass00; White 1999].

1.3 Proteínas de membrana

Las proteínas son moléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos. Los aminoácidos tienen una estructura característica basada en un átomo de carbono α (C_α) situado en el centro unido a cuatro grupos químicos diferentes: un grupo amino (NH_2), un grupo carboxilo ($COOH$), un átomo de hidrógeno (H) y a una cadena lateral o grupo R variable que identifica y da propiedades características a cada uno de los aminoácidos (Figura 1.6). La estructura y función de las proteínas, están relacionadas con algunas de las propiedades de los aminoácidos, las cuales están determinadas por sus cadenas laterales. Las cadenas laterales de los diferentes aminoácidos varían en tamaño, forma, carga, hidrofobicidad y reactividad [Israelachvili92].

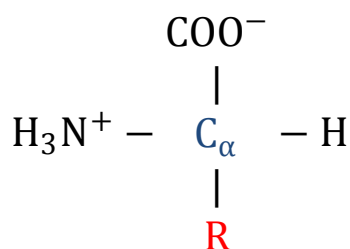


Figura 1.-6 Representación esquemática de un aminoácido

Los aminoácidos son compuestos anfóteros, lo que significa que pueden comportarse como un ácido o como una base dependiendo del pH del medio donde se encuentren. Éste es el caso de los aminoácidos que presentan tres formas de ionización: al tener un grupo carboxilo (COO^-) pueden desprender protones (H^+) por lo que tienen carácter ácido; por otra parte, al poseer un grupo amino (NH_3^+), son capaces de aceptar protones (H^+) y, por tanto, también tienen carácter básico. Al pH existente habitualmente en los medios biológicos, cercano a la neutralidad ($pH=7$) ambos grupos suelen estar ionizados y los aminoácidos aparecen como iones dobles (ión zwitterión).

La cadena lateral (R) puede tener grupos ionizables que participan en la carga eléctrica del aminoácido. El valor de pH para el cual un aminoácido tiene carga neta cero, es decir, donde posee tantas cargas positivas como negativas, se denomina

punto isoeléctrico. Cada aminoácido presenta un punto isoeléctrico diferente, ya que posee cadenas laterales distintas. El punto isoeléctrico (pI) de una molécula se puede calcular a partir de su constante de disociación pK.

$$pI = \frac{pK_{\text{ácido}} + pK_{\text{base}}}{2} \quad 1.1$$

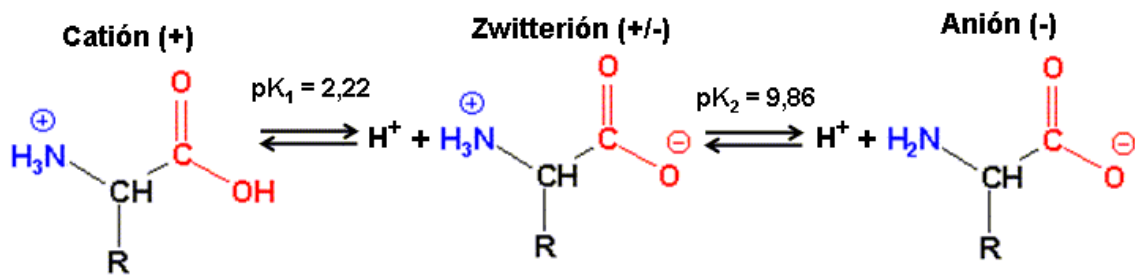


Figura 1.-7 Formas de ionización de un aminoácido

La mayoría de los aminoácidos en condiciones fisiológicas se encuentran ionizados, con excepción de la arginina y lisina, que están cargados positivamente y los ácidos aspártico y glutámico que están cargados negativamente. Estos cuatro aminoácidos son los principales contribuyentes de la carga global de una proteína. Un quinto aminoácido, histidina puede pasar de estar cargado positivamente a pequeños cambios de pH. Muchas de las actividades de las proteínas son moduladas por cambios en la acidez del medio a través de la protonación de las cadenas laterales.

Las proteínas se pliegan adquiriendo una forma única, estabilizada por interacciones no covalentes entre regiones de la secuencia lineal de aminoácidos. La estructura primaria determina la secuencia de la proteína, mientras que la estructura secundaria tiene en cuenta su composición en láminas y hélices. Las conformaciones tridimensionales de plegamiento de las proteínas se cree que están determinadas de forma única por la secuencia primaria de los grupos de aminoácidos. A diferencia de los lípidos, los cuales desempeñan un papel principalmente estructural, las proteínas son el componente activo de la membrana celular.

Las proteínas están diseñadas para unirse a moléculas, desde iones simples y metabolitos pequeños (azúcares, ácidos grasos) hasta grandes moléculas complejas así como otras proteínas y ácidos nucleicos. En efecto, la función de casi todas las proteínas depende de su habilidad para unirse a otras moléculas o ligandos, con un

alto grado de especificidad. La unión de ligando a menudo provoca un cambio en la forma de una proteína.

Para caracterizar las interacciones proteína-ligando se utilizan dos propiedades: la especificidad, que es la capacidad de una proteína de unirse preferentemente a una molécula; y la afinidad, que hace referencia a la fuerza de esta unión. La constante de disociación (k_D) para un complejo proteína-ligando (que es la inversa de la constante de equilibrio k_{eq} , para la reacción de unión) es la medida cuantitativa de afinidad más frecuente. Cuanto más fuerte sea la interacción entre una proteína y el ligando, más bajo será el valor de k_D . Tanto la especificidad como la afinidad de una proteína por un ligando dependen de la estructura del sitio de unión del ligando.

Las proteínas de membrana son las principales herramientas de comunicación entre el interior y el exterior de la célula, gracias a ellas se produce el intercambio de las moléculas constituyentes de nutrientes o productos de desecho, así como la recepción de señales externas. En la figura 1.5 se pueden observar las proteínas en una membrana. Dependiendo de su forma de unión, las proteínas de membrana se suelen clasificar en:

Proteínas periféricas (extrínsecas): Situadas en la región polar de la bicapa, ya sea interna o externa. Estas proteínas se encuentran unidas a la membrana mediante fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno o enlaces iónicos. Generalmente, las proteínas periféricas presentan carga neta positiva, siendo necesaria la presencia de lípidos cargados negativamente en la membrana para dar lugar a un anclaje de tipo electrostático [Vance96].

Proteínas integrales (intrínsecas): Son aquellas proteínas que están integradas en la membrana y se pueden encontrar, por tanto, a ambos lados de la bicapa. Las proteínas que no atraviesan totalmente la bicapa, sino que penetran hasta un cierto nivel (core) de la membrana son llamadas proteínas integrales parciales mientras que las proteínas que son capaces de atravesar totalmente la bicapa lipídica son proteínas integrales totales. Estas proteínas son también denominadas proteínas de transmembrana, un caso especial de proteínas integrales totales son las proteínas politópicas, que atraviesan varias veces la bicapa, generalmente en forma de zig-zag.

Las proteínas de membrana se pueden diferenciar, además de por su disposición en la bicapa, por su función en la misma. Así, se puede distinguir entre:

- Formadoras de canales: Proteínas integrales dispuestas en la membrana de tal manera que dan lugar a la formación de un poro o canal, habitualmente hidrofílico. Por estos poros o canales se permite la entrada y salida de determinadas sustancias de la célula.
- Transportadoras: Proteínas, generalmente integrales, cuya función es el transporte de moléculas a través de la membrana.
- Receptores: Proteínas, generalmente integrales, que reconocen determinadas moléculas a las cuales se unen para dar lugar a una determinada función o señal.
- Enzimas: Proteínas, tanto integrales como periféricas, capaces de realizar una determinada reacción en la superficie de la membrana.
- Anclajes del citoesqueleto: Proteínas periféricas situadas en la región citoplasmática de la membrana y que sirven de punto de unión o anclaje para los filamentos del citoesqueleto.
- Marcadores de identidad de la célula: Glucolípidos y glucoproteínas característicos de cada individuo y que sirven de reconocimiento para células procedentes de otro individuo. Las cadenas de carbohidratos procedentes, tanto de los glucolípidos, como de las glucoproteínas dan lugar a una especie de cubierta denominada glucocálix.

1.4 Geometría de los lípidos⁴

Cuando una suspensión de fosfolípidos se dispersa mecánicamente en una solución acuosa, estos pueden autoorganizarse en distintas formas esféricas, como micelas, liposomas o bien formando láminas de bicapas [Israelachvili85]. Al llegar a cierta concentración de fosfolípidos, llamada concentración micelar crítica (CMC) se origina la formación de micelas. Las micelas son esferas que generalmente constan de un número pequeño de lípidos [Nelson04]. En un régimen más concentrado, algunos de estos sistemas presentan estructuras en las cuales se forma una bicapa continua que se divide en dominios [Maldonado96].

Las características geométricas de los lípidos, incluyendo la longitud y número de cadenas de ácidos grasos, el grado de insaturación y la temperatura, determinará el tipo de estructura alcanzada [Lodish07].

A la hora de modelar el tipo de agregación y el empaquetamiento de las moléculas anfifílicas, se suele definir el parámetro de empaquetamiento crítico p_c como [Israelachvili92]:

$$p_c = v/a_0 l_c \quad 1.2$$

siendo v el volumen ocupado por las colas hidrocarbonadas, a_0 el área crítica de la cabeza polar y l_c la longitud crítica de las cadenas hidrocarbonadas. Para lípidos de una sola cola hidrofóbica, la cabeza polar es relativamente grande comparada con la cola ($v < a_0 l_c$) y se agregan en forma de micelas esféricas si $p_c < \frac{1}{3}$ o micelas de rodillo si $\frac{1}{3} < P_c < \frac{1}{2}$. Los lípidos de doble cadena, al tener una estructura geométrica similar a un tubo cilíndrico, cumple la relación $v \sim a_0 l_c$, es decir, $\frac{1}{2} < P_c < 1$ se autoagregan en forma de lamelas, micelas de disco o liposomas. Existen algunos lípidos de doble cadena que debido a su estructura tienen un área de la cabeza polar pequeña comparado con la sección de las colas y cumplen que ($v > a_0 l_c$) y $P_c > 1$. Estos lípidos suelen formar estructuras de micelas inversas. La figura 1.8 resume las distintas estructuras que pueden formar las moléculas anfifílicas dependiendo de su parámetro de empaquetamiento [Cevc84; Keough79; Marsh96]

Aunque por medio del parámetro de empaquetamiento se puede tener una idea muy acertada acerca del tipo de estructura que se puede obtener en un sistema lipídico de dimensiones v , a_0 y l_c conocidas, la estructura final formada puede verse afectada por diversos factores.

Del empaquetamiento de los fosfolípidos en la membrana depende en gran parte la fluidez y la permeabilidad de los liposomas. El empaquetamiento de una membrana compuesta de mezcla de fosfolípidos también puede facilitar la existencia de poros o canales de agua a través de la membrana.

Cierta configuración de fosfolípidos o de mezclas de lípidos pueden obligar a los liposomas a formarse de manera espontánea en determinados tamaños para provocar que el empaquetamiento en la membrana sea el que minimice las fuerzas hidrofóbicas de las colas de los fosfolípidos.

A su vez, el empaquetamiento de los fosfolípidos depende fuertemente de la temperatura y de las transiciones de fase de la membrana de los liposomas. En la fase rígida (gel-cristalina) la membrana es más compacta y el área por lípido es mucho más pequeña que en la fase fluida (gel-líquido) donde desaparecen muchas de las interacciones entre las colas de los fosfolípidos, el área por lípido aumenta y la membrana tiene mayor fluidez.

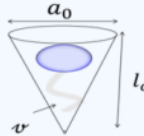


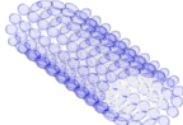

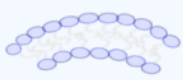
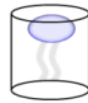
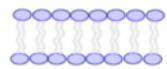


Lípidos	Parámetro de empaquetamiento	Forma de empaquetado	Estructura
SDS, bajas concentraciones de iones	$< \frac{1}{3}$		
SDS Y CTAB altas concentraciones de iones	$\frac{1}{3} - \frac{1}{2}$		
PC PS PI PA SM	$\frac{1}{2} - 1$		
PE PS + Ca ²⁺	~1		
PE + Ca ²⁺ PA + Ca ²⁺ Colesterol Cardiolipina + Ca ²⁺	>1		

Figura 1.8 Relación entre la fase que forman los lípidos, curvatura y forma molecular.

1.5 Bicapas lipídica

Las interacciones de pequeños agregados de moléculas, como es el caso de las micelas, bicapas, vesículas y membranas biológicas se forman de manera espontánea debido a su característica de anfifílicas, transformándose en otras estructuras cambiando las condiciones como la concentración de lípidos, electrolitos, pH o temperatura.

Las fuerzas que mantienen estas moléculas unidas en formas de vesículas o bicapas son fuerzas de Van der Waals, hidrofóbicas, puentes de hidrogeno y apantallamiento de las interacciones electrostáticas. Estas moléculas estas cargadas en determinada concentración de iones o a diferente pH. Esto no sólo afecta a los complejos agregados, sino también modifica las fuerzas entre moléculas cambiando el tamaño y la forma de la estructura.

Las fuerzas que gobiernan el auto-ensamblado de los lípidos para mantener estructuras definidas, como en el caso de vesículas y bicapas, surgen de las interacciones hidrofóbicas. En primera instancia estas moléculas tenderán a encontrarse en la interfase aire-agua. Las cabezas hidrofílicas estarán en contacto con el agua, mientras que las colas hidrofóbicas evitarán el contacto con la misma y se encontrarán apuntando hacia el aire. (Figura 1.8) [Nelson04]. Estas dos interacciones compiten para producir fuerzas opuestas [Tanford80], las interacciones atractivas surgen principalmente de la atracción hidrofóbica o fuerza de tensión actuando en la relación cadena-cadena.

Las bicapas de fosfolípidos se conforman, en función de su lipofilidad, en una bicapa continua de aproximadamente 5 nm de ancho, además se consideran como sistemas modelo de las membranas celulares ya que preservan su fluidez bidimensional y pueden ser modificadas con proteínas de membrana, canales iónicos, receptores, transportadores y se pueden emplear en numerosas aplicaciones en el campo de la biotecnología [Martin07; Chan07]. La estructura y la dinámica de los fosfolípidos pueden ser controladas completamente, de modo que suelen tomarse como modelos para estudios in vitro de las propiedades y estructura de las membranas celulares [Sessa68; Lipowsk98].

1.5.1 Fluidez de la bicapa lipídica

La capacidad de los lípidos para difundirse lateralmente en una bicapa indica que pueden comportarse como un fluido. El grado de fluidez de una bicapa lipídica depende de su composición fosfolipídica, principalmente de la naturaleza de sus cadenas de ácidos grasos y de la temperatura.

Los lípidos de las membranas pueden encontrarse, en función de la temperatura, en fases diferentes: en la fase de gel, las cadenas hidrocarbonadas del lípido están rígidas, mientras que en la fase fluida o de cristal-líquido las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos están móviles (Figura 1.9). La temperatura a la cual se produce el cambio de estado de gel a cristal-líquido se denomina temperatura de transición. Los lípidos se encuentran en fase gel a temperatura por debajo de la temperatura de transición y en fase fluida a temperaturas superiores a la temperatura de transición [Keogh79; Bergethon88].

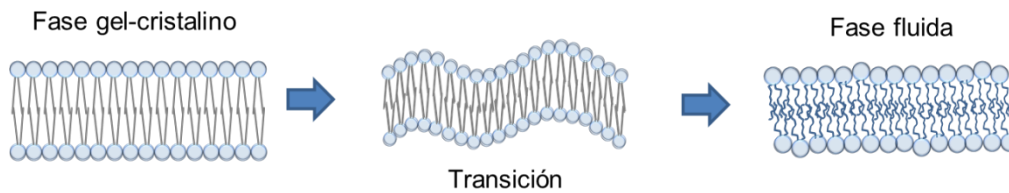


Figura 1.9 Representación de la transición de la fase gel-cristalina a la fluida.

La cooperatividad de la transición indica el número de moléculas que cambian de un estado a otro simultáneamente durante la transición. En el caso de fosfolípidos puros, la temperatura de transición está bien definida y presenta una alta cooperatividad. En los sistemas biológicos se encuentran mezclas lipídicas complejas, formadas por más de un tipo de lípido. La transición se produce en un intervalo de temperaturas donde existe baja cooperatividad [Bergethon88].

La temperatura de transición depende de las colas de ácidos grasos de los lípidos, pues afectan a su empaquetamiento en la bicapa, su longitud y su grado de saturación. Una longitud menor de las cadenas reduce la tendencia de las colas de ácidos grasos para interactuar entre sí, de forma que aumenta la fluidez de la bicapa y disminuye la interacción, produciendo un descenso en la temperatura de transición, como es el caso de las cadenas cortas o insaturadas. Por otra parte, la presencia de fosfolípidos saturados en la bicapa aumenta la temperatura de transición, debido a que estos presentan una elevada capacidad de agrupación y baja movilidad [Alberts02]. De la fluidez de las membranas dependen importantes funciones, como el transporte, la adhesión celular y el reconocimiento de antígenos.

1.5.2 Propiedades dinámicas

Como hemos visto, la fluidez de la membrana depende de las cadenas de ácidos grasos (saturados o insaturados) y de las moléculas que se incorporan en la membrana. Los procesos dinámicos más importantes que ocurren en la membrana biológica se pueden clasificar (Figura 1.10) [Shinitzty93; Bergethon88]:

Difusión lateral: Se produce al cambiar de lugar con fosfolípidos vecinos, dentro de la misma monocapa, es el movimiento más común en los lípidos de membrana y ocurre a una velocidad alta. En efecto, su coeficiente de difusión es de $10^{-8} \text{ Cm}^2/\text{Seg}^2$. Es decir que se difunde en toda la longitud de la membrana en unos pocos segundos.

Rotación: Movimiento de rotación de los lípidos de la membrana alrededor de sí mismas. La difusión rotacional puede darse de dos formas, mediante rotación alrededor de un eje móvil o alrededor de un eje fijo.

Flip-Flop: Permite el traspaso de los lípidos de una capa a la otra de la bicapa. Es un proceso muy lento y poco habitual, ya que las cabezas polares de los fosfolípidos deben atravesar un medio apolar, lo cual requiere un gran consumo energético.

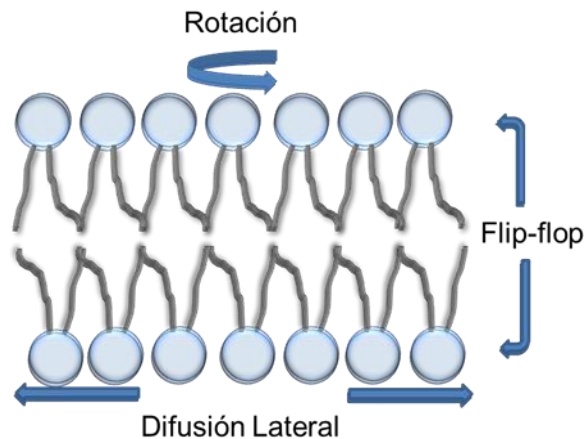


Figura 1.10 Movimientos dinámicos de una membrana celular

1.5.3 Formación de los soportes lipídicos

Las bicapas planas extendidas (Supported Phospholipid Bilayers, SPB) son un soporte plano. La formación de las bicapa lipídicas puede realizarse a partir tanto de liposomas como de proteoliposomas. Existen distintos métodos para inmovilizar fosfolípidos sobre sustratos sólidos para obtener una bicapa soportada [Martin07; Sackmann96; Kiessling08].

- Películas de Langmuir-Blodgett: se puede definir como una o más monocapas de material depositado sobre un sustrato sólido por inmersión del sustrato a través de una monocapa flotante a una densidad molecular constante. Las películas obtenidas pueden ser muy organizadas que van desde una monocapa a estructuras multicapas formadas por cientos de monocapas [Singh90].

- Black Lipid Membrane (BLM): Es un método para la formación de una bicapa lipídica que se realiza con un agujero de aproximadamente $0,4 \text{ mm}^2$ situado entre dos compartimentos de teflón [Benz78; Benz 85].
- Método por Fusión de Vesícula: Formación de una bicapa plana por ruptura y extensión de vesículas lipídicas sobre un soporte plano [McConnell86].

El método más empleado para la formación de una SPB es el Método por Fusión de Vesícula, en el cual las vesículas difunden desde la solución próxima a la superficie, con un coeficiente de difusión que se puede aproximar por el modelo de Stokes-Einstein [Einstein05]. Al entrar en contacto con la superficie comienza la adsorción y continúa hasta alcanzar una concentración crítica de vesículas adheridas. Este proceso refleja la deformación de las vesículas debido a la adsorción y las interacciones estéricas entre ellas. La disminución del radio de curvatura en los bordes de la zona de adhesión inicia un mecanismo de formación de poros que se propagan por la acción “catalítica” de los extremos hidrofóbicos provocando la unión de vesículas vecinas o bien la apertura de las mismas. En el proceso por el cual se produce la ruptura de las vesículas [Zhdanov01], la difusión cerca de la superficie y su coeficiente de difusión ya no se puede aproximar por el modelo de Stokes-Einstein puesto que se ve afectado por las fuerzas atractivas de la superficie. Finalmente las islas de bicapas difunden lateralmente para minimizar la exposición de bordes hidrofóbicos. De esta manera tienden a absorberse la mayor cantidad de vesículas con el fin de cubrir por completo la superficie, formándose regiones lipídicas dinámicas [McConnell86; Jass00; Muresan01]. Para la formación de bicapas es necesaria una concentración crítica, por debajo de la cual las vesículas permanecen intactas [Keller00]. Este efecto es independiente del tamaño de las vesículas y está más bien relacionado con la interacción estérica (empaquetamiento de vesículas) que promueven su deformación [Reimhult03]. Una vez superado este valor crítico, la cinética de la fusión dependerá de la naturaleza del fosfolípido o la mezcla de fosfolípidos si es el caso, siendo la temperatura y la presión osmótica los factores que más afectarán a la velocidad del proceso [Reimhult03]. Durante la fusión pueden ocurrir fenómenos de redistribución de las moléculas de fosfolípidos, pero en general, la mayor parte de las moléculas presentes en la superficie externa de la bicapa soportada son aquellas que se encontraban en la capa interna de la vesícula [Johnson02]. La formación de la bicapa lipídica depende de múltiples factores como pueden ser: la composición lipídica, la temperatura, la fuerza iónica del medio o la presencia de cationes divalentes, entre otros. La presencia de cationes Ca^{+2} en

solución favorece la formación de la SPB, tanto en el proceso de adsorción de las vesículas sobre el soporte, como en la fusión entre las mismas [Reviankine00]. El soporte sólido es el más debatido en la literatura, por su importancia en la determinación de la eficacia para la formación de las bicapas. El soporte puede ser hidrofílico o hidrofóbico [Kalb92; Nollert95; Puu97]. Diferentes trabajos señalan que la hidrofiliidad es necesaria [Richter06] pero no una condición suficiente para favorecer la ruptura de la vesícula. Entre los sustratos más empleados se encuentran la mica y los materiales derivados del silicio como el vidrio, Si_3N_4 o SiO_2 [Richter06]. El estado de hidroxilación de las superficies de SiO_2 varía considerablemente en función del tratamiento de la superficie tal como la exposición a altas temperaturas o a soluciones básicas, influyendo la carga y otras propiedades fisicoquímicas del soporte, así como también creando heterogeneidades locales que se transmiten a la bicapa soportada [Richter06]. Respecto a la rugosidad de la superficie, además de la formación sobre superficies atómicamente planas como la mica, es notable la formación de bicapas sobre sustratos de extrema rugosidad y porosidad en la nanoescala [Cunin07; Roiter09].

Los complejos lípido-proteína en medio fisiológico incluyen, además, fuerzas electrostáticas o interacciones específicas entre las cabezas hidrófilas y los residuos expuestos de los aminoácidos de las proteínas. Tales interacciones en los complejos proteína-lípido a menudo resultan en una agrupación preferencial de lípidos específicos entorno a la proteína-lípido favoreciendo el acoplamiento de la proteína o la interacción específica con él. Dado que la mayoría de los lípidos están cargados negativamente, los dos grupos de aminoácidos sobre las superficies de las proteínas que interactúan electrostáticamente con los lípidos de la bicapa son la lisina y arginina que a pH fisiológico están cargados positivamente

Se han realizado múltiples estudios para comprender las transiciones de fase y los dominios de lípidos en bicapas. En las biomembranas, sin embargo, las fuerzas entre las proteínas son más complejas y realmente debemos pensar en ellas como sistemas de tres dimensiones, donde tanto fuerzas atractivas como repulsivas pueden ocurrir entre los diversos componentes de la membrana en profundidades y ubicaciones laterales diferentes. Tal es el caso de las fuerzas repulsivas que existen entre dos proteínas cargadas y de las fuerzas atractivas que surgen cuando la solución tampón apantalla las cargas entre ellas, disminuyendo las fuerzas repulsivas hasta tal punto que llegan a unirse entre sí. Muchas de las uniones entre lípidos y proteínas surgen de las diferencias de carga electrostática provocando una fuerte atracción [Sternberg93].

1.6 Referencias

- [Alberts02] Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4^a Edición. Garland Science Pub. Nueva York (USA).
- [Anderson02] Anderson, R.G.W. y Jacobson, K. (2002). A Role for Lipid Shells in Targeting Proteins to Caveolae, Rafts, and Other Lipid Domains. *Science*, 296, 1821-1825.
- [Benz78] Benz, R.; Janko, K.; Boos, W.; Lauger, P. (1978). Formation of large, ion-permeable membrane channels by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 511, 305-319.
- [Benz85] Benz, R.; Schmid, A.; Hancock, R.E.W. (1985). Ion selectivity of Gram-negative bacterial porins. *J. Bacteriol.*, 162, 722-727.
- [Bergethon98] Bergethon, P.R. (1998). *The Physical Basis of Biochemistry. The Foundations of Molecular Biophysics*. Ed. Springer. Nueva York (USA).
- [Brown98] Brown, D.A. y London, E. (1998). Structure and Origin of Ordered Lipid Domains in Biological Membranes. *J. Mem. Biol.*, 164, 103-114.
- [Cevc87] Cevc G. and Marsh D., *Phospholipid Bilayers. Physical Principles and Models*, John Wiley, New York, 1987.
- [Cevc93] Cevc, G., *Phospholipid Handbook*. 1993, New York: Dekker. 988.
- [Chan07] Chan, Y.-H. M.; Boxer, S. G. (2007) Model membrane systems and their applications, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11, 581-587

- [Cho05] Cho W. and Stahelin R. V., Membrane-protein interactions in cell signaling and membrane trafficking, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 34 (2005), pp. 119–151.
- [Cunin07] Cunin, F.; Milhiet, P.-E.; Anglin, E.; Sailor, M. J.; Espenel, C.; Le Grimellec, C.; Brunel, D.; Devoisselle, J.-M. (2007) Continuous planar phospholipid bilayer supported on porous silicon thin film reflector, *Ultramicroscopy* 107, 1048-1052
- [Dowhan02] Dowhan W. y Bogdanov M., 2002, en D. E. Vanee y J. F. Vanee, eds., *Biochemistry of trprds, Lipoproteins, and Membranes*, Elsevier.
- [Edidin03] Edidin M. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers . 2003. *Nature reviews in molecular and cell biology*. 4:414-418.
- [Einstein95] Einstein, A. (1905) Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen, *Ann. Phys.* 322, 549-560-.
- [Finean78] Finean, J. B., Coleman, R., Mitchell, R. H. (1978). *Membranes and their cellular Functions*. 2nd ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- [Harrison80] Harrison, R., and Lunt, G.G (1980). *Biological Membranes*. 2nd ed., Halsted Press, Wiley, New York.
- [Honig86] Honig B. H., Hubbell W. L., and Flewelling R. F., Electrostatic interactions in membranes and proteins, *Annu. Rev. Biophys. Chem.*, 15 (1986), pp. 163–193.
- [Hui95] Hui, S.W.; Viswanathan, R.; Zasadzinski, J.A.; Israelachvili, J.N. (1995). The structure and stability of phospholipid bilayers by atomic force microscopy. *Biophys. J.*, 68, 171-178.

- [Israelachvili92] Israelachvili, J., Intermolecular & Surface Forces. Second ed. 1992, San Diego, California: Academic Press.
- [Jass00] Jass, J.; Tjärnhage, T.; Puu, G. (2000). From Liposomes to Supported, Planar Bilayer Structures on Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces: An Atomic Force Microscopy Study. *Biophys. J.*, 79, 3153-3163.
- [Johnson02] Johnson, J. M.; Ha, T.; Chu, S.; Boxer, S. G. (2002) Early Steps of Supported Bilayer Formation Probed by Single Vesicle Fluorescence Assays, *Biophys. J.*83, 3371-3379.
- [Kalb92] Kalb, E.; Frey, S.; Tamm, L.K. (1992). Formation of supported planar bilayers by fusion of vesicles to supported phospholipid monolayers. *Biochim. Biophys. Acta*,1103, 307-312.
- [Keller00] Keller, C. A.; Glasmästar, K.; Zhdanov, V. P.; Kasemo, B. (2000) Formation of Supported Membranes from Vesicles, *Phys.Rev. Lett.*84, 5443-5443.
- [Keough79] Keough, K.M. W., and P. J. Davis.1979. Gel to liquid-crystalline phase transitions in water dispersions of saturated mixed-acidphosphatidylcholines. *Biochemistry.* 18:1453-1459
- [Kiessling08] Kiessling, V.; Domanska, M. K.; Murray, D.; Wan, C.; Tamm, L. K. (2008) Supported Lipid Bilayers: Development and Applications in Chemical Biology, in *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology Vol. 4*(Begley, T. P., Ed.), John Wiley & Sons, Inc.
- [Lipowsky98] Lipowsky, R. (1998) Vesicles and Biomembranes, *Encycl. Appl. Phys.*23, 199-222.

- [Lodish07] Lodish, H.; Berk, A.; Kaiser, C. A.; Krieger, M.; Scott, M. P.; Bretscher, A.; Ploegh, H.; Matsudaira, P. (2007) Molecular Cell Biology, 6th ed., W. H. Freeman.
- [Maldonado07] Maldonado, A., Urbach, W., Ober R., Langevin, D., Swelling behavior and local topology of an L3 (sponge) phase. Physical Review E, 1996. 54(2): p. 1774-1778.
- [Marsh96] Marsh D. Intrinsic curvature in normal and inverted lipid structures and in membranes. Biophys J. 1996 May; 70(5): 2248–2255.
- [Martin 07] Martin, D. K. (2007) The Significance of Biomimetic Membrane Nanobiotechnology to Biomedical Applications, in Nanobiotechnology of Biomimetic Membranes (Martin, D. K., Ed.), Springer, New York.
- [Mathews03] Mathews, Bioquímica. Segunda ed. 2003: Freeman.
- [McConnell86] McConnell, H.M.; Watts, T.H.; Weis, R.M.; Brian, A.A. (1986). Supported planar membranes in studies of cell-cell recognition in the immune system. Biochim. Biophys. Acta, 864, 95-106.
- [McLaughlin05] McLaughlin S. and Murray D., Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics, Nature, 438 (2005), pp. 605–611.
- [Muresan01] Muresan, A.S. y Lee, K.Y.C. (2001). Shape Evolution of Lipid Bilayer Patches Adsorbed on Mica: an Atomic Force Microscopy Study. J. Phys. Chem. B, 105, 852-855
- [Murray01] Murray D., McLaughlin S., and Honig B., The role of electrostatic interactions in the regulation of the membrane association of G protein beta gamma heterodimers, J.

Biol.Chem., 276 (2001), pp. 45153–45159

- [Nakamura04] Nakamura MT, Nara TY. Structure, function, and dietary regulation of delta 6, delta 5, and delta 9 desaturases. *Annu Rev Nutr* 2004; 24: 345-376.
- [Nelson04] Nelson, P., *Biological Physics, Energy, Information, Life*. 2004, Houndmills: Freeman. 598.
- [Nollert97] Nollert, P.; Kiefer, H.; Jähnig, F. (1995). Lipid vesicle adsorption versus formation of planar bilayers solid surfaces. *Biophys. J.*, 69, 1447-1455. Puu y Gustafson, 1997
- [Payens95] Payens, T. A. J. (1955). Ionized monolayers. *Philips Research Reports*, 10, 425–481
- [Puu97] Puu, G. and Gustafson, I. (1997). Planar lipid bilayers on solid supports from liposomes –factors of importance for kinetics and stability. *Biochim. Biophys. Acta*, 1327, 149-161.
- [Quinn76] Quinn, P.J (1976). *The Molecular Biology of Cell Membranes*. Macmillan Press, London and Basingstoke
- [Reimhult03] Reimhult, E.; Höök, F.; Kasemo, B. (2003) Intact Vesicle Adsorption and Supported Biomembrane Formation from Vesicles in Solution: Influence of Surface Chemistry, Vesicle Size, Temperature, and Osmotic Pressure†, *Langmuir* 19, 1681-1691
- [Reviakine00] Reviakine, I., and A. Brisson. 2000. Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy. *Langmuir*. 16:1806–1815
- [Richter06] Richter, R. P.; Bérat, R.; Brisson, A. R. (2006) Formation of Solid-Supported Lipid Bilayers: An Integrated View, *Langmuir* 22, 3497-3505.

- [Robertson83] Robertson, R. N. (1983). *The Lively Membranes*. Cambridge Univ. Press, London and New York.
- [Roiter09] Roiter, Y.; Ornatska, M.; Rammohan, A. R.; Balakrishnan, J.; Heine, D. R.; Minko, S. (2009) Interaction of Lipid Membrane with Nanostructured Surfaces, *Langmuir*25, 6287-6299
- [Sackmann96] Sackmann, E. (1996) Supported Membranes: Scientific and Practical Applications, *Science*271, 43-48
- [Sessa68] Sessa, G.; Weissmann, G. (1968) Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes, *J. Lipid Res.*9, 310-318.
- [Shinitzky93] Shinitzky, M. (1993). *Biomembranes. Physical Aspects*. Balaban Publishers. Weinheim (Alemania).
- [Simons97] Simons, K. e Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387, 569-572.
- [Singer72] Singer S. J., Garth L. Nicolson, the Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes, *Science* 18 February 1972
- [Singh90] Singh, S. y Keller, D.J. (1990). Atomic force microscopy of supported planar membrane bilayers. *Biophys. J.*, 60, 1401-1410.
- [Tanford80] Tanford, C. (1980). *The hydrophobic effect*. New York: John Wiley & Sons.
- [Tokumasu03] Tokumasu, F.; Jin, A.J.; Feigenson, G.W.; Dvorak, J.A. (2003). Atomic force microscopy of nanometric liposome adsorption and nanoscope membrane domain formation. *Ultramicroscopy*, 97, 217-227.
- [Vance96] Vance, D.E. y Vance, J. (1996). *Biochemistry of Lipids*,

Lipoproteins and Membranes. Ed. Elsevier Science.
Amsterdam (Holanda)

- [White99] White S. H. and Wimley W. C., Membrane protein folding and stability: Physical principles, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 28 (1999), pp. 319–365.
- [Wikipedia] http://en.wikipedia.org/wiki/Cell_membrane, Wikipedia: The Free Encyclopedia.
- [Zhdanov01] Zhdanov, V.P. y Kasemo, B. (2001). Comments on Rupture of Adsorbed Vesicles. *Langmuir*, 17, 3518-3521
- [Zourab01] Zourab, S., Phase Behavior of Tetradecyldimethylaminoxide in the Presence Perfluorooctanol and HCl. *J. Dispersion Science and Technology*, 2001. 22(5): p. 431-442.

Capítulo 2. El Microscopio de Fuerzas Atómicas

Desde su invención a finales del siglo XVI los microscopios ópticos, de los más sencillos hasta los más modernos y complejos, han sido instrumentos ampliamente utilizados en Ciencias Biológicas, gracias a su poder magnificador, ya que nos permiten observar especímenes que resultan invisibles a simple vista. En este tipo de microscopía la imagen se forma iluminando la muestra y haciendo pasar la luz transmitida o reflejada por ésta a través de un sistema de lentes.

En los años 80 se desarrolla la microscopía de campo cercano o de sonda local (SPM – Scanning Probe Microscope) que presenta resolución atómica, y a diferencia de los microscopios ópticos, no está limitada por difracción. Todas las técnicas de SPM se basan en el barrido de la superficie de la muestra por una micropalanca o fleje en la que se encuentra acoplada una sonda, generalmente en forma de punta, que se desplaza sobre la muestra. Los cambios de la posición de esta punta debido a su interacción con la muestra proporcionan información de las propiedades de la superficie dando lugar así a la adquisición de las imágenes.

El primero de estos microscopios de campo cercano, el microscopio de efecto túnel (STM Scanning Probe Microscope) fue desarrollado en 1981 por Binnig y Rohrer. En 1986, a partir del STM Binnig y colaboradores desarrollaron el primer microscopio de fuerzas atómicas (AFM - Atomic Force Microscope)[Binning86]. El AFM es por tanto miembro de la familia de los microscopios de campo cercano y basa su funcionamiento en una modificación del microscopio de efecto túnel, que en lugar de detectar una señal de diferencia de potencial eléctrico, la punta del AFM detecta las fuerzas de interacción con la muestra. Ambas técnicas poseen resolución atómica, pero el AFM puede ser utilizado para observar muestras no conductoras o inmersas en medio líquido, como las biológicas.

La microscopía de fuerzas atómicas empezó a utilizarse en las Ciencias Biológicas en 1988 [Worcester88], aunque debido a las dificultades observadas en la manipulación y observación de este tipo de muestras, no fue hasta 1992 cuando se estableció su uso en biología [Bustamante92]. A diferencia de otros microscopios de elevada resolución, el AFM permite la visualización de muestras en medio fisiológico, en tiempo real y permite la variación de la disolución in situ. De forma similar a otras microscopías, la muestra debe encontrarse fijada sobre un soporte sólido y plano. La adhesión de la muestra al sustrato se produce, en general, por fuerzas de tipo electrostático o van der Waals.

2.1 Fundamento y componentes de la microscopía de fuerzas atómicas

El AFM es una técnica que se basa en la detección de la variación de fuerzas en el rango de los piconewtons entre una afilada punta de tamaño micrométrico y la muestra.

Para realizar esta detección el AFM se compone de un haz láser que incide sobre la superficie del cantiléver, en cuyo extremo libre se encuentra la punta. El haz reflejado por la micropalanca llega a un detector óptico llamado fotodiodo. Las deflexiones del cantiléver, producidas por la interacción entre la punta y muestra, son detectadas por éste [Meyer88; Alexander89], mediante la variación del ángulo de reflexión del láser. La señal recibida por el fotodiodo es utilizada para controlar la fuerza aplicada sobre la superficie, mediante un sistema piezoeléctrico capaz de regular el movimiento de la muestra en la posición vertical. En la figura 2.1 se presenta un esquema del funcionamiento de un microscopio de fuerzas atómicas. El barrido de la muestra en el plano xy con respecto a la punta da lugar a la obtención de imágenes topográficas tridimensionales de alta resolución, tanto lateral (x, y) como vertical (z), derivadas del movimiento del piezoeléctrico. Además de imágenes topográficas, el AFM permite obtener información de diferentes propiedades de la muestra, tales como adhesión, dureza, visco-elasticidad o fricción.

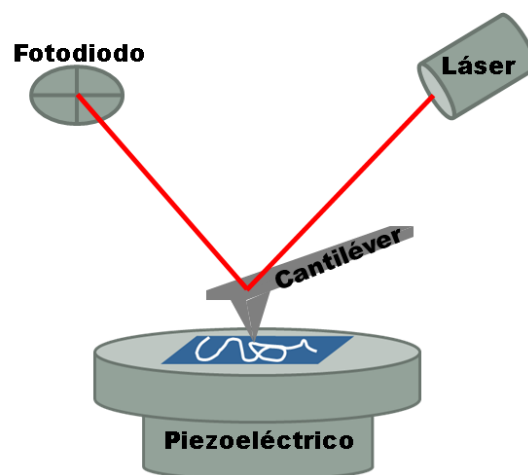


Figura 2.1 Representación esquemática del AFM

Para la adquisición de los datos se utiliza una tarjeta de procesamiento digital de señales (DSP) conectada a la unidad electrónica del microscopio y controlada desde un ordenador, por medio de un programa informático adecuado. El DSP procesa la señal recibida del fotodiodo y por medio de un sistema de realimentación

o feedback, controla el movimiento del piezoeléctrico. Durante la realización de esta tesis se ha utilizado un sistema comercial de la empresa Nanotec Electronica S.L. [Nanotec] así como su programa de adquisición WSxM [Horcas07], con el que además se han procesado gran parte de las imágenes.

2.1.1 Celda Líquida

Una característica fundamental del AFM que lo diferencia de otros tipos de microscopias es su capacidad para operar en líquidos. Para ello se necesita una celda líquida. Todas las celdas de líquido, con independencia de su diseño, básicamente realizan tres funciones: contener la punta y la muestra, contener el líquido en el que se realiza la medida y permitir la trayectoria óptica necesaria para que el haz del láser se refleje en la micropalanca.

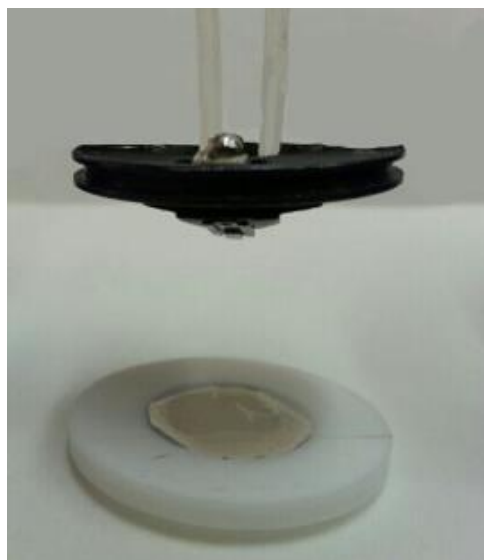


Figura 2.2 Representación de sistema abierto de celda líquida (superior). Imagen de la celda líquida y el portamuestras utilizado (inferior)

Uno de los principales inconvenientes al medir en líquidos, es que muchas de las celdas comerciales están diseñadas en un sistema abierto. Un diseño general de una celda líquida se muestra Fig. 2.2, donde se puede ver el portapuntas y el portamuestras.

A lo largo de esta investigación se ha observado, que los sistemas abiertos de celda líquida, tienen algunas desventajas que pueden ser solucionadas con la incorporación de un sistema cerrado, hemos utilizados 2 o-ring entre el soporte de la muestra (piscina) y el soporte de la punta (celda), para el sellado utilizamos una cinta de teflón o PTFE. Las celdas cerradas evitan la evaporación del líquido y la contaminación; permiten el flujo de líquido a través de la celda durante el

experimento, y por consiguiente permiten el estudio de eventos dinámicos en función del medio.



Figura 2.3 a) Representación esquemática de un sistema cerrado de celda líquida, con los componentes que la forman b) Imagen del sistema cerrado utilizado durante este trabajo

2.1.2 La micropalanca y la punta

La micropalanca es un elemento fundamental del AFM y una elección adecuada para cada aplicación concreta es decisiva, ya que sus propiedades mecánicas son en gran parte responsables de la fuerza que se aplica sobre la muestra y por tanto de la calidad de los resultados obtenidos. Dependiendo de la aplicación y el modo de medida, se pueden utilizar micropalancas con diferentes longitudes que varían entre 9 y 200 μm . Las micropalancas comerciales se hacen típicamente de silicio o nitruro de silicio, ambos cubiertos con una capa de óxido nativo de 1 a 2 nm de espesor. Las propiedades mecánicas del cantiléver se caracterizan por la constante de fuerza k y la frecuencia de resonancia ω_0 . Ambas pueden ser, en principio, calculadas a partir de las propiedades de los materiales y dimensiones del cantiléver. Para un cantiléver rectangular la constante de fuerza es

$$k = \frac{F}{\delta_c} = \frac{Ewt^3}{4L^3} \quad 2.1$$

Donde F es la fuerza, δ_c es el desplazamiento del cantiléver, E es el módulo de Young, w es el ancho, t es espesor y L la longitud. Para obtener una alta sensibilidad en el desplazamiento de la micropalanca, ésta, debe tener baja constante de fuerza o baja relación entre el espesor y el largo, por lo tanto el cantiléver debe ser largo y delgado. Otros factores que influyen en el cantiléver son:

Las vibraciones externas, tales como las vibraciones del edificio, la mesa, o el ruido, que son por lo general de baja frecuencia, se transmiten a la micropalanca, cuando la frecuencia de resonancia de ésta es baja [Sarin91; Chen94]. Para ser capaz de escanear rápidamente, es necesaria una alta frecuencia de resonancia, ya que ésta limita la resolución [Albrecht90; Butt93].

Para optimizar la sensibilidad óptica de las micropalanca se recubre la cara superior con un material reflectante, en la mayoría de los casos se utiliza una capa de oro [Boisen96]. Por lo tanto, cualquier cambio de temperatura conduce a una flexión del fleje. Además, la adsorción de sustancias o reacciones electroquímicas en medio líquido cambia ligeramente la tensión de superficie de las caras del fleje. Estos cambios en la tensión superficial en general, no son iguales en la parte inferior y la parte superior. Cualquier diferencia de estrés superficial dará lugar a una flexión de la micropalanca [Thundat94, Butt96]. Prácticamente, estos cambios en la tensión superficial conducen a una deriva impredecible de la desviación de la micropalanca que perturba las mediciones de la fuerza.

Dependiendo de la aplicación se eligen las dimensiones y los materiales adecuados. Por lo general son $L = 50\text{-}200$ mm de largo, $w = 20\text{-}50$ mm de ancho y $t = 0,5\text{-}1$ mm de espesor, y frecuencias de resonancia típicas de 20-200 kHz en aire [Sader95]. La resolución de la imagen depende del radio de curvatura de la punta, siendo elaboradas mediante procesos de micro fabricación utilizando diversas técnicas como son la litografía de superficie, grabados reactivos de plasma de iones y deposiciones de vapor, pudiéndose obtener puntas con radios de curvatura de entre 1 y 10 nm. Generalmente están fabricadas de silicio, nitruro de silicio o diamante, pudiendo ser conductoras o no.

2.1.3 Calibración de la micropalanca

La micropalanca de acuerdo a sus características geométricas y a su espesor posee una constante de fuerza k . La calibración de la constante de fuerza de las micropalanca ha de ser calculada experimentalmente, ya que los valores nominales proporcionados por los fabricantes son valores aproximados en función de su espesor y la longitud. La importancia de conocer dicha constante de fuerza ha quedado demostrada en los experimentos de espectroscopia [Florin94]. Existen muchos métodos tanto teóricos como experimentales para calibrar las puntas.

En esta tesis hemos utilizados dos métodos para obtener la constante de fuerza de las micropalanca empleadas en los experimentos realizados.

Método de Sader

Este método permite calcular la constante de fuerza de la micropalanca a partir de sus dimensiones y de su frecuencia de resonancia, conociendo la densidad y viscosidad del medio circundante. La ecuación básica para la constante es

$$K_f = 7.5 \rho \cdot w^2 \cdot L \cdot Q \cdot \omega_0^2 \cdot \Gamma_i (R_e) \quad 2.2$$

Donde w y L son el ancho y el largo obtenidos de la información del fabricante, ω_0 es la frecuencia de resonancia y Q el factor de calidad, mientras que ρ representa la densidad del medio. Por último Γ_i es la componente imaginaria de la función hidrodinámica que depende del número de Reynolds, R_e .

Ruido térmico

La frecuencia de resonancia de un oscilador armónico simple puede determinarse por la ecuación

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}} \quad 2.3$$

Donde k es la constante de fuerza del fleje y m es la masa. La masa de la micropalanca no es un punto simple de masa, ya que el peso está distribuido a lo largo de todo el fleje, por lo que la ecuación necesita ser modificada usando la masa efectiva, m^* . La constante de fuerza puede ser determinada con mayor precisión, por cambios en la frecuencia de resonancia del fleje (ω) al incorporarles pequeñas masas (m_0), usando la formula [Cleavend 93]

$$\omega^2 = \frac{k}{m^* + m_0} \quad \text{donde} \quad f = \omega/2\pi \quad 2.4$$

Una representación gráfica de la masa agregada m_0 frente a ω^2 origina una recta de cuya pendiente (x) se puede obtener k ($k = 4\pi x$). Las medidas descritas por Cleavend y colaboradores [Cleavend93] proporciona una ecuación que permite calcular k con una precisión razonable, con sólo medir la resonancia del fleje y asumiendo correcta la longitud y la anchura.

$$k = 2w(\pi l f_r)^3 \sqrt{\frac{\rho^3}{E}} \quad 2.5$$

Donde l es la longitud del fleje, w es la anchura, ρ es la densidad del material del fleje E es el módulo de Young del fleje y f_r es la medida de la frecuencia de resonancia. Esta ecuación es muy útil ya que la longitud y anchura son altamente controladas debido al proceso de fabricación pero el espesor puede variar significativamente.

2.2 Fuerza de interacción punta-muestra

2.2.1 Medida estática de la fuerza

La interacción entre la punta del AFM y la muestra es una función que depende de las propiedades de ambas, así como de la distancia entre ellas, por tanto esta interacción es a menudo utilizada para investigar las propiedades de la muestra, la punta o el medio en que están inmersas. Cuando se aproximan la punta del AFM y la superficie de la muestra, el sistema experimenta una suma de fuerzas, que pueden ser repulsivas de corto alcance, como consecuencia de la interacción entre las nubes electrónicas de los átomos de la punta y la muestra; y de largo alcance, que son provocadas por fuerzas de Van der Waals, fuerzas eléctricas y/o fuerzas magnéticas (atractivas o repulsivas). Estas fuerzas son intrínsecas de la muestra, permitiendo determinar cualitativamente la composición de la muestra analizada (topografía) y otras propiedades (eléctricas, mecánicas, magnéticas) susceptibles de ser registradas mediante AFM. La adquisición de la fuerza entre la punta y la muestra se lleva a cabo por medio de las llamadas curvas fuerza-distancia, en las cuales se registra el desplazamiento vertical de la muestra, producido por el sistema piezoeléctrico y la deflexión del fleje, durante el acercamiento y alejamiento entre ambas.

La fuerza (F) viene dada por la ley de Hooke, donde (δ_c) es el desplazamiento del fleje y k la constante de fuerza.

$$F = k \cdot \delta_c \quad 2.6$$

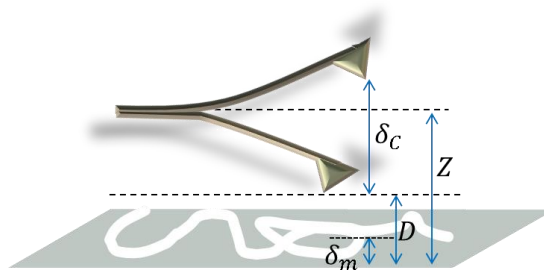


Figura 2.4 Vista lateral esquemática del desplazamiento del fleje por la interacción con la muestra. Z es la posición de equilibrio del fleje, δ_c es el desplazamiento del fleje debido a la interacción y D es la distancia real entre punta y muestra

La separación entre la punta y la muestra (D) se obtiene sumando el desplazamiento del fleje (δ_c) y la posición del piezoeléctrico (Z),

$$D = \delta_c + Z \quad 2.7$$

2.2.2 Medida dinámica de la fuerza

Para muchas aplicaciones es importante conocer las propiedades dinámicas del fleje. En este caso, la deflexión depende del tiempo y el enfoque más simple, es comenzar con la ecuación del movimiento de Newton

$$m^* \frac{d^2\delta_c(t)}{dt^2} + \gamma_D \frac{d\delta_c(t)}{dt} + k_c \delta_c(t) = F(t) \quad 2.8$$

Donde

$$m^* = 0.2427m_c + m_t \quad 2.9$$

m^* es la masa efectiva de la micropalanca, donde $m_c = wt_c L \rho \frac{1}{4}$ es la masa real del fleje w, t_c, L y ρ y m_t es la masa de la punta. El coeficiente de amortiguamiento γ_D y k_c la constante de fuerza, son independientes del tiempo. F corresponde al conjunto de las fuerzas en la dirección normal que actúan sobre el sistema. Una aplicación importante de la ecuación (2.8) es describir excitaciones periódicas, $F = F_0 \sin \omega t$ ya que constituyen la base de medida para los modos dinámicos [Tamayo 96, Winkler96; Garcia02]

Para analizar la respuesta del cantiléver a una excitación periódica introducimos $F = F_0 \sin \omega t$ en la ecuación (2.8). Luego, en el estado de equilibrio, la ecuación. (2-8) se resuelve por [Ducker90]

$$\delta_c(t) = A_0 \sin(\omega t - \varphi) \quad 2.10$$

Con

$$A_0(\omega) = \frac{F_0}{\sqrt{(k_c - m^* \omega^2)^2 + \gamma_D^2 \omega^2}} = \frac{F_0/m^*}{\sqrt{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + (\omega \omega_0/Q)^2}} \quad 2.11$$

Y

$$\tan \varphi = \frac{\gamma_D \omega}{k_c - m^* \omega^2} \quad 2.12$$

Aquí, la frecuencia de resonancia angular $\omega_0 = 2\pi\nu_0 = \sqrt{k_c/m^*}$ y el factor de calidad $Q = \omega_0/\gamma_D$ son introducidos. La amplitud A_0 y la fase φ dependen del la

frecuencia angular ω . A baja frecuencia la amplitud viene dada por $A_0 = F_0/k_C$. La amplitud aumenta hasta que alcanza un máximo.

$$A_0(\omega_{\max}) = \frac{F_0 Q}{k_C \sqrt{1 - 1/4Q^2}} = \frac{F_0}{\gamma_D \sqrt{k_C m^* - (m^* \gamma_D / 2)^2}} \quad 2.13$$

$$\text{En} \quad \omega_{\max} = \sqrt{\frac{k_C}{m^*} - \frac{\gamma_D^2}{2m^{*2}}} \quad 2.14$$

Por encima de ω_{\max} la amplitud decrece y va a cero para $\omega \rightarrow \infty$. La fase es cero para frecuencias bajas, $\varphi = 90^\circ$ en ω_{\max} y va a 180° para $\omega \rightarrow \infty$. El factor de calidad está relacionado con las pérdidas de energía del sistema por periodo y es equivalente a la frecuencia de resonancia dividida por la anchura a media altura del pico de amplitud en resonancia.

En medio gaseo o vacío la frecuencia de resonancia viene dada por ω_{\max} porque el coeficiente de amortiguación es relativamente baja. El factor de calidad a presión normal se reduce fuertemente en comparación con las condiciones de vacío. En el vacío un factor de calidad típico varía en el rango de 10^4 a 10^8 , en aire se reduce aproximadamente a 100 y en medio líquido está entorno a 2. Además en líquido los valores medidos de ω_{\max} son significativamente más bajos que ν_0 [Butt93]. Efectos hidrodinámicos provocan un aumento de la masa efectiva del cantiléver debido a que arrastra el líquido que le rodea [Chen94; Sader98; Elmer97]. Cuanto mayor sea la viscosidad del medio líquido que la rodea, más baja será la frecuencia de resonancia de la micropalanca. Este efecto puede incluso ser utilizado para medir la viscosidad de líquidos [Bergaud00].

A cierta distancia la punta y la muestra no presentan interacción, sin embargo cuando se acercan comienzan a interaccionar, entonces, el movimiento del fleje no es libre y la interacción conduce a un cambio de la frecuencia de resonancia. Para una fuerza de atracción la frecuencia de resonancia se reduce mientras que para una fuerza repulsiva se incrementa. Esta modificación de la curva de resonancia se puede utilizar para analizar las fuerzas de superficie [Ducker90].

Si conociéramos la interacción podríamos, en principio, añadir esta fuerza como un término en la ecuación. (2-8), resolviendo la ecuación diferencial, encontrar la respuesta de la curva y compararla con los resultados experimentales. Desafortunadamente, no existe un proceso inverso. Es decir, no podemos calcular la fuerza frente a la distancia a partir de una medida de la distancia frente a la frecuencia de resonancia. Se requiere una información adicional o un modelo

razonable para la interacción. Sin embargo, bajo ciertas suposiciones y para ciertas aproximaciones existen relaciones relativamente directas entre la fuerza y la frecuencia de resonancia.

Los cambios de frecuencia de resonancia ocurren de acuerdo con

$$\omega_0'^2 = \frac{k_c}{m^*} \pm \frac{1}{m^*} \left| \frac{dF}{dD} \right| \quad 2.15$$

siendo $D = Z + \delta_c$ la distancia punta-muestra

En la ecuación 2-15 el signo positivo es para las fuerzas repulsivas, mientras que el signo negativo es para las fuerzas atractivas. El desplazamiento se determina mediante el gradiente de la fuerza y del desplazamiento medido de la frecuencia de resonancia se puede calcular el gradiente de fuerza [Martin87].

Las fuerzas de interacción causan un desplazamiento de fase entre la excitación y la respuesta del fleje. Este desfase se mide frente a la distancia. Un problema es que el análisis teórico no es sencillo y el método no se utiliza realmente para medidas cuantitativas de las fuerzas de superficie pero se utiliza principalmente para imágenes en el modo de no contacto [Giessibl95; Okajima03]. Un planteamiento prometedor y técnicamente más simple es utilizar el ruido térmico para excitar el fleje. Para flejes con baja constante de fuerza el ruido térmico es suficiente para producir una señal detectable. Esto permite obtener mayor resolución ya que al no introducir una excitación forzada, el sistema punta-muestra puede trabajar a menor distancia, lo que minimiza la interacción

2.3 Modos de operación

La clasificación más conocida de los modos de operación en la microscopia de fuerza, consiste en diferenciar en modos estáticos y dinámicos. En los modos estáticos, como el modo contacto y el modo de salto o jumping, la punta no oscila mientras que en los modos dinámicos, la punta es forzada a oscilar a su frecuencia de resonancia.

2.3.1 Modo Contacto

En el modo de contacto [Meyer04], la punta se encuentra permanentemente en contacto físico con la superficie de la muestra. La fuerza aplicada sobre ésta da lugar a una deflexión del fleje, cuya magnitud, regida por la ley de elasticidad de Hooke, depende tanto de la magnitud de la fuerza aplicada como de la constante de fuerza de la micropalanca. En este modo de medida se mantiene constante la fuerza

aplicada sobre la muestra, por lo que se toma esta magnitud como señal del sistema de realimentación. De este modo, los ajustes de la posición vertical del piezoeléctrico durante el barrido para mantener constante el valor de la deflexión y por tanto de la fuerza, darán lugar a la imagen topográfica de la superficie.

El contacto permanente entre punta y muestra convierte a este modo de medida en un método muy invasivo, haciendo que muestras deformables resulten fácilmente dañadas y/o arrastradas por la punta. Para minimizar estos daños se emplean micropalancas con valores de constante de fuerza muy bajos que oscilan por lo general entre 0.01-0.05 N/m (las constantes de fuerza interatómicas/intermoleculares en sólidos se encuentran entre 10-100 N/m, llegando a ser tan pequeñas como 0.01 N/m en muestras biológicas).

2.3.2 Modo Jumping

El modo Jumping (JM-AFM) [Pablo98] fue desarrollado para minimizar la fuerza lateral ejercida sobre la muestra y controlar la fuerza normal aplicada durante la imagen, cuando la punta está en contacto. En este modo se realiza una curva fuerza-distancia (FZ) para cada pixel de la imagen, La curva fuerza distancia se realiza acercando la punta desde una distancia en que no interacciona con la muestra hasta que se produce el contacto mecánico, entonces se alcanza el valor de fuerza fijado en el experimento para realizar la realimentación y posteriormente se separan hasta perder el contacto mecánico. Este modo de medida consiste en la repetición de este ciclo para cada punto de la imagen, produciéndose el desplazamiento lateral de la punta en la posición más alejada de la muestra, con el fin de evitar dañarla. En la figura 2.6 se puede ver la representación de una curva FZ estándar en aire La histéresis observada en la fuerza normal entre la curva de acercamiento (azul) y de alejamiento (roja) es debida a las fuerzas de adhesión que impiden que la punta se separe de la muestra una vez que esta ha contactado con la superficie.

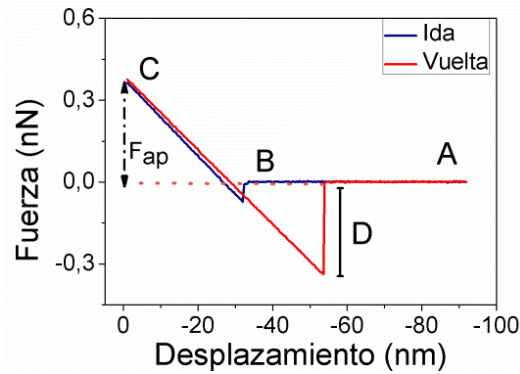


Figura 2.5 Representación de una curva FZ, medida en aire. La curva azul corresponde a la aproximación entre la micropalanca y la muestra y la curva roja representa la el alejamiento de ambas. A) El punto de interacción cero entre punta y muestra. B) El salto al contacto. C) La zona de contacto, que aumenta hasta el punto el setpoint donde se realiza el feedback. D) Punto donde la punta y la muestra pierden el contacto mecánico.

2.3.3 Modos Dinámicos

Para evitar los efectos invasivos del modo de contacto se desarrollaron los modos dinámicos [Martin87], en los que, o bien no existe contacto o existe un contacto discontinuo o intermitente entre punta y muestra. Con esto se consigue eliminar las fuerzas laterales presentes en el modo contacto lo que redundaría en un aumento de la resolución, así como minimizar las fuerzas verticales, reduciendo así el daño sobre la muestra. Al ser un modo poco invasivo, es posible estudiar pequeños objetos levemente adheridos al sustrato (p.ej. moléculas o pequeñas partículas), algo que resulta prácticamente imposible en modo contacto, sin modificar la muestra. En estos modos es necesario excitar la micropalanca a su frecuencia de resonancia (típicamente entre 20 y 300 KHz), lo cual puede realizarse por medio de diversas técnicas, como pueden ser la excitación térmica, electrostática o magnética. Sin embargo durante esta tesis, se ha empleado una de las más comunes, que consiste en acoplar la micropalanca a un actuador piezoeléctrico, que por medio de la aplicación de un campo eléctrico hace oscilar el fleje a su frecuencia de resonancia. La interacción de la punta con la muestra modifica las características de oscilación del fleje (amplitud, fase y frecuencia de resonancia) que pueden ser empleadas para la formación de imágenes que proporcionan información sobre diversas propiedades de la muestra.

En función de la señal que se utilice para realizar el sistema de realimentación, se puede distinguir entre dos métodos de operación diferenciados. El modo de modulación de amplitud (AM-AFM) utiliza la amplitud de la oscilación como

señal de feedback, mientras que el modo de modulación de frecuencia (FM-AFM) emplea la frecuencia de oscilación de la micropalanca.

La amplitud de oscilación varían, generalmente, entre 10 y 100 nm. Si la amplitud de oscilación es mayor que la separación en el equilibrio entre punta y muestra, existe contacto mecánico entre ambas en el punto más bajo del recorrido oscilatorio. Para pequeñas amplitudes de oscilación y una distancia suficiente de la muestra es posible realizar medidas en modo de no-contacto

La amplitud de oscilación de la micropalanca disminuye cuando la punta interacciona con la muestra, lo que provoca una pérdida de energía en el fleje. En este modo se trabaja fijando el punto de realimentación en un valor de la amplitud ligeramente por debajo de la amplitud de oscilación libre.

El régimen de trabajo será atractivo o repulsivo dependiendo de la fuerza neta que actúa sobre la punta en una oscilación completa. Cuando las muestras son muy frágiles, se suele trabajar con amplitudes que sean tan próximas como sea posible a la amplitud que tendría la micropalanca en el caso de una oscilación libre (es decir, con la punta alejada de la muestra). Con esto se consigue trabajar en el régimen atractivo, minimizando la fuerza de interacción entre punta y muestra. La interacción punta-muestra provoca por lo general un desfase entre la señal periódica que alimenta al fleje y la oscilación real de éste. Este desfase depende en gran medida de ciertas propiedades de la muestra, de modo que en superficies heterogéneas, bien porque estén compuestas de diferentes materiales o porque alguna de sus características varíe localmente, el contraste de las imágenes de fase refleja dicha heterogeneidad. Así, las imágenes de fase permiten detectar, por lo general de manera cualitativa, variaciones en la composición química, adhesión, u otras propiedades de superficie de la muestra que no se manifiestan necesariamente en imágenes topográficas. La detección de cambios en la fase es un elemento esencial en determinadas variantes del SPM, por ejemplo, en microscopía de fuerza magnética (MFM, Magnetic Force Microscopy) y de fuerza electrostática (EFM, Electrostatic Force Microscopy).

El modo FM-AFM fue desarrollado con el objetivo de mejorar la sensibilidad del AFM ya que permite alcanzar resolución atómica verdadera de manera rutinaria cuando se opera en vacío. La denominación “no-contacto” se debe a que la distancia entre punta y muestra es lo suficientemente elevada como para que solo se establezcan fuerzas atractivas. En este modo, se miden los cambios en la frecuencia de oscilación del cantiléver, Δf , inducidos por la interacción punta-muestra

que se requieren para mantener la amplitud de oscilación constante en todo momento. El valor de Δf se utiliza como señal de realimentación para la formación de imágenes topográficas. La amplitud típica de operación en este modo varía entre 0.25-40 nm, valores considerablemente menores que los empleados en condiciones de contacto intermitente.

2.3.4 Modo FSI

A mediados de 1990, se introdujo la idea de la recopilación de datos de curvas fuerza-distancia obtenidas desde muchos puntos de una muestra, para producir con eficacia un mapa de las interacciones superficiales entre la punta y la muestra [Rotsch 97; Radmacher94]. Durante el barrido de la superficie en el plano xy de la muestra se registran y almacenan las curvas de fuerza frente a la distancia para cada punto de la imagen, lo que permite estudiar las propiedades de la superficie. Esta adquisición de datos permite producir una imagen bidimensional de la matriz sobre la información extraída de las curvas, como puede ser la adhesión, la dureza, la fuerza electrostática y la deformación plástica que experimenta la muestra al estar sometido a una fuerza. Este modo de medida realiza el mismo procedimiento que el modo jumping, con la diferencia de que el modo FSI trabaja con una mayor cantidad de información por el hecho de almacenar las curvas de fuerza.

Dado que no se conoce de antemano las deflexiones que va a sufrir el fleje y las deformaciones sobre la muestra, la única distancia que se puede controlar es el desplazamiento del piezoeléctrico (Z). Por lo tanto, la curva experimental obtenida por AFM debería llamarse "curva de fuerza-desplazamiento" en lugar de "curva de fuerza-distancia". Este último término se debe emplear sólo para las curvas en las que la fuerza se representa en función de la distancia punta-muestra real, que ha sido previamente calculada a partir de la curva experimental.

Muchas interacciones interesantes radican en la curva fuerza-distancia. La fuerza es efectiva entre el grupo de átomos en la punta y la muestra. Esto puede explicarse simplemente por la curva de potencial de Lennard-Jones, que es la naturaleza de la curva obtenida debido a la interacción.

Como vemos a la derecha de la curva en el régimen atractivo, la fuerza es negativa lo que da explicación de la ley de la inversa del cuadrado de las fuerzas. En caso de AFM está en la región donde la punta el cantiléver se lleva desde cierto

punto donde d es igual a cero (arbitraria elegido) y llega hasta el régimen de atractivo debido a la fuerza de adhesión. A cierta distancia de la superficie de la muestra, la punta de la micropalanca salta al contacto. Es el caso cuando la fuerza de adhesión es mucho más grande que la fuerza debida a cantiléver. El fenómeno inverso se produce durante la retracción del cantiléver. Esta región se explica por la conocida constante Hamaker, la fuerza Van der Waals, etc y lo interesante de la física se encuentra aquí. La fuerza de adhesión puede ser debido a la fuerza de Van der Wal (causado debido a la polarización) o fuerza capilar (debido a condiciones ambientales) y otros.

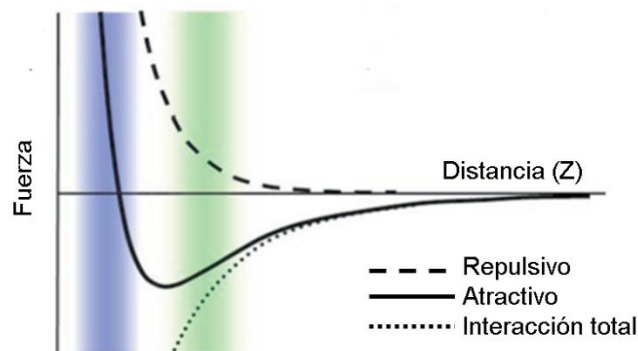


Figura 2.6 Curva de potencial Lennard-Jones.

La magnitud de estas fuerzas depende del área de contacto real y la naturaleza de las fuerzas de atracción que sostienen la superficie [Rosoff02]. El análisis básico de medición de fuerza se puede hacer desde diferentes teorías aplicadas como JKR, DMT, Maugis [Maugis92], Carpick, Ogletree y Salmerón (COS), etc. [Carpick99] Considerando que en el régimen repulsivo explica acerca de la elasticidad y la inelasticidad de la muestra para la medición AFM

Curva de distancia fuerza puede presentar momento de histéresis. Cuando, la histéresis se produce debido a la formación de cuellos de la propia muestra blanda como se puede ver en el modelo de interacción JKR. Por lo tanto la interacción JKR se llama la interacción disipativa donde hay pérdida neta de energía. Considerando que el tipo de DMT de la interacción se llama la interacción conservadora como la fuerza depende de la distancia entre la punta y la muestra.

Para una expresión analítica para las curvas de fuerza-desplazamiento, el sistema de punta-muestra puede ser descrita por medio de un potencial U_{total} que es la suma de tres potenciales.

$$U_{\text{total}} = U_{\text{cm}}(D) + U_{\text{c}}(\delta_{\text{c}}) + U_{\text{m}}(U_{\text{m}}) \quad 2.16$$

Donde $U_{\text{cm}}(D)$ es el potencial de interacción entre la punta y la muestra, por ejemplo, el potencial de Lennard-Jones, $U_{\text{c}}(\delta_{\text{c}})$ es potencial elástico de Hooke del cantiléver y $U_{\text{m}}(U_{\text{m}})$ es el potencial que describe la deformación de la muestra.

$$U_{\text{c}}(\delta_{\text{c}}) = \frac{1}{2} k_{\text{c}} (\delta_{\text{c}})^2 \quad 2.17$$

$$U_{\text{m}}(\delta_{\text{cm}}) = \frac{1}{2} k_{\text{m}} (\delta_{\text{m}})^2 \quad 2.18$$

Donde la k_{c} y k_{m} son la constante elástica del cantiléver y de la muestra respectivamente. Usualmente la fuerza de interacción puede ser descrita

$$F = -\frac{\partial U_{\text{cm}}}{\partial D} = -\frac{C}{D^n} \quad 2.19$$

Donde C y n dependen del tipo de fuerza que actúe entre la punta y la muestra la fuerza expresada de esta manera toma en cuenta solo la interacción atractiva es decir, sólo la interacción antes de la contacto.

La relación entre Z y δ_{c} puede ser obtenido por obligando al sistema a ser estacionario

$$\frac{\partial U_{\text{total}}}{\partial (\delta_{\text{m}})} = \frac{\partial U_{\text{total}}}{\partial (\delta_{\text{c}})} = 0 \quad 2.20$$

Ya que $\frac{\partial U_{\text{cm}}}{\partial (\delta_{\text{m}})} = -\partial U_{\text{cm}}/\partial (D)$, se obtiene

$$\delta_{\text{m}} = \frac{k_{\text{c}}}{k_{\text{m}}} \delta_{\text{c}} \quad 2.21$$

$$k_{\text{c}} \delta_{\text{c}} = \frac{C}{(Z - \delta_{\text{c}} - \delta_{\text{m}})^n} \quad 2.22$$

Por lo tanto

$$k_{\text{c}} \delta_{\text{c}} = \frac{C}{(Z - \beta \delta_{\text{c}})^n} \quad 2.23$$

Donde $\beta = (1 + k_c/k_m)$, para ecuaciones 2.25 y 2.26 donde k_m y Z puede ser determinado a partir de la valor medido de δ_c como funciones de las constantes elásticas k_c y k_m . Por lo tanto la curva de desplazamiento se puede convertir en la curva de fuerza-distancia real incorporado las ecuaciones 2.20, 2.21 y 2.22

Para obtener una curva de fuerza frente a distancia se debe transformar la señal fotodiodo y la posición vertical piezoeléctrico Z , que es lo que se adquiere de una curva experimental. [Senden01]

Por lo tanto tres parámetros deben ser conocidos que se pueden deducir de la propia curva experimental.

El punto en el que se establece contacto entre la punta y la muestra se conoce como punto de contacto, cuando se presiona la muestra contra la micropalanca de la punta está en contacto con la muestra y $D = 0$.

Sensibilidad de deflexión, para obtener la sensibilidad de deflexión $\Delta\delta_c/\Delta I_{FD}$ se debe convertir la señal del fotodiodo, I_{FD} en términos de deflexión del cantiléver δ_c , donde $\delta_c = I_{FD} \cdot \Delta\delta_c/\Delta I_{FD}$. Cuando una fuerza es aplicada en en la punta del cantiléver sobre una superficie dura, el cantiléver se flexiona y el haz reflejado produce un incremento en la deflexión del cantiléver $\Delta\delta_c$ que es igual a la distancia recorrida por la muestra ΔZ , lo que permite obtener la sensibilidad del sistema que relaciona la distancia recorrida con el aumento de la señal del fotodiodo ΔI_{FD} . Conociendo la constante de fuerza del cantiléver la señal del fotodiodo puede convertirse en una fuerza $F = k_c \delta_c$.

La zona de no interacción entre punta y muestra, línea de cero. Se obtienen cuando la punta es muy separadas de la muestra y la desviación de la micropalanca es casi cero $\delta_c = 0$

Materiales infinitamente duros, no hay fuerzas de superficie.

Si no hay fuerzas de largo alcance actuando, la punta y la muestra son infinitamente duras, entonces la curva de señal de desplazamiento del fotodiodo versus piezo consta de dos partes lineal: El régimen no contacto, (fuerza cero) y el régimen contacto, donde la fuerza varía linealmente con el desplazamiento de la muestra. Donde las dos partes lineales se cruzan se le asigna un valor cero que concuerda con el punto de contacto.

Materiales infinitamente duros con fuerza superficial

Se introduce una fuerza entre la punta y la muestra, como por ejemplo las fuerzas repulsivas de largo alcance. La zona de contacto y no contacto son fácilmente distinguibles. El punto de cero deflexión es determinada a partir de la zona no contacto a una distancia donde las fuerzas de superficie son insignificante. El punto de contacto es $Z_p \equiv 0$, está se extrapola de los dos regímenes lineales. Para obtener una alta con precisión es necesario registrar las curvas de fuerza a una gran distancia y aplicar una fuerza relativamente alta. El grado de extrapolación determina el error en la distancia cero.

Materiales deformables sin fuerzas en la superficie

En realidad todos los materiales sólidos se deforman y no son infinitamente rígidos. En primer lugar, ignoramos las fuerzas de superficie. Como resultado, la parte sin contacto de la curva de fuerza se describe por $D = Z_p$ porque $\delta_c = 0 = 0$. Más difícil es la descripción de la parte de contacto. Si la punta y / o de la muestra deforman la parte de contacto de la curva de fuerza no lineal.

Para el caso de una punta perfectamente elástica con un extremo esférico y una muestra plana del mismo material se describe por el modelo de Hertz $F = \delta^{3/2} 2E \sqrt{R} / 3(1 - \nu^2)$. Donde δ , es la indentación, E es el modulo de Young, R es el radio de la punta y ν , es el radio de Poisson. Prácticamente, para muchos sólidos inorgánicos, tales como lamina de silicio o vidrio, no tienen una alta constantes de fuerza por lo que la indentación es pequeña $\delta \ll \delta_c$.

Entonces, para cargas relativamente altas un cambio adicional en la carga ΔF produce un cambio correspondiente desviación del cantiléver, $\Delta \delta_c \approx \Delta F / k_c \Rightarrow \Delta \delta \ll \Delta \delta_c$.

Para materiales deformables el punto de distancia cero es difícil de distinguir. En estos casos la indentación y el área de contacto continúan cambiando con la carga. Por esta razón, es más apropiado utilizar indentación en lugar de distancia una vez que ha establecido contacto. Como resultado, el eje de abscisas mostraría dos parámetros: Distancia antes de contacto y indentación una vez que se ha establecido contacto.

Materiales deformables con las fuerzas en la superficie.

Para superficies deformables la presencia de las fuerzas de superficie puede ser un problema si conducen a una deformación significativa incluso antes de

establecer contacto. Este es ciertamente el caso de materiales muy suaves. Incluso para materiales relativamente duros, las fuerzas de atracción y adhesión pueden causar un error y es prácticamente difícil determinar con precisión dónde se establece el contacto.

Cuando la punta se aproxima a una superficie sólida y que es atraído por ejemplo por las fuerzas de van der Waals a cierta distancia el gradiente de la atracción podría exceder la constante de fuerza y la punta salta sobre la superficie. Las fuerzas de adhesión se añaden a la fuerza del cantiléver y pueden causar una indentación en la muestra. Por consiguiente, la distancia total de salto es la suma del salto inicial debido a la inestabilidad causada por la fuerzas atractivo las de superficie, además de la indentación debido a la adherencia y la capacidad de deformación de la punta y muestra [Pethica88]. En este caso, es prácticamente imposible determinar la distancia cero y uno sólo puede asumir que la indentación causada por la adhesión es insignificante.

2.4 Fuerza en medio liquido

Los sistemas biológicos conservan su estructura y su función en medio fisiológica, que consisten en una solución electrolítica. En medio liquido el AFM es sensible a fuerzas como las de Van der Waals, la doble capa eléctrica, la de solvatación e hidratación, estéricas y las fuerzas de adhesión.

2.4.1 Fuerzas de Van der Waals

La interacción de van der Waals siempre está presente en cualquier tipo de molécula, teniendo diversas contribuciones, dentro de ella se encuentran las interacciones repulsivas de muy corto alcance que se originan por la repulsión entre orbitales electrónicos y de largo alcance que pueden ser tanto atractivas como repulsivas, dentro de las más importante se encuentra por la induccion los dipolos temporales entre moléculas y/o superficie.

2.4.2 Fuerza Electrostática de la doble capa y la teoría DLVO

Al final del siglo 19 que es bien sabido que muchos coloides en medio acuoso coagulan después de la adición de sal. Incluso se sabe que los iones di-o trivalentes son mucho más eficientes en dispersiones desestabilizadores que los iones monovalentes. La explicación de este comportamiento fue eventualmente dado de forma cuantitativa con la teoría DLVO, el nombre de Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek [Derjaguin41; Verwey48]. En la teoría DLVO de la interacción

entre dos partículas se supone que constará de dos contribuciones: La atracción de van der Waals y una repulsión electrostática de doble capa. A baja concentración de sal de la repulsión de doble capa es lo suficientemente fuerte como para mantener las partículas coloidales separadas. Con el aumento de la concentración de sal de la repulsión electrostática es más y más apantallado. En una cierta concentración de la atracción de van der Waals supera la barrera electrostática repulsiva y se produce una coagulación.

La fuerza de doble capa electrostática surge a causa de cargas superficiales en las interfaces. El agua tiene una alta constante dieléctrica. Por lo tanto, la disociación de superficie o la adsorción de una especie cargada en el agua son muy comunes. La carga superficial se equilibra con contraiones disueltos que son atraídas a la superficie por el campo eléctrico, pero se extienden lejos de la superficie para aumentar la entropía. Juntos, los iones y superficie cargada se conocen como la doble capa eléctrica. Cuando se acerca otra superficie, la doble capa es perturbada, y la fuerza resultante se conoce como la fuerza de doble capa. Cuando las cargas superficiales que se acercan tienen el mismo signo, la concentración de iones entre las superficies siempre aumenta. Esto resulta en una fuerza de repulsión. A grandes distancias, esta fuerza de doble capa electrostática decae casi exponencialmente. La longitud de la caries es la llamada longitud de Debye. Para una sal monovalente es

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon\epsilon_0 k_B T}{e^2 \sum_i c_{oi} z_i^2}} \quad 2-.24$$

La longitud de debye λ_D es determinada por la concentración de sal; c_i es la concentración de sal de tipo de ion (i).

La fuerza de doble capa electrostática se puede calcular utilizando la teoría de Gouy, Chapman [Gouy 1910] [Chapman 1913], Debye, y Huckel [Debye 1923] para dobles capas eléctricas.

Por lo tanto, primero se debe calcular la distribución potencial entre las dos superficies se calcula [Israelachvili92; Hunter95; Butt03] a partir de la ecuación de Poisson-Boltzmann, que es una ecuación diferencial de segundo orden.

Para resolver esta ecuación se asumen dos condiciones que se utilizan a menudo: O bien se supone que al aproximarse las cargas superficiales se mantienen constantes (carga constante) o que los potenciales superficiales se mantienen constantes (potencial constante).

Estas condiciones tienen una fuerte influencia en la fuerza electrostática a distancias más o menos por debajo de $2\lambda_D$.

Dos superficies con carga constante de igual signo siempre se repelen entre sí para $D \rightarrow 0$. Dos superficies con potencial constante se sienten atraídos por $D \rightarrow 0$ incluso cuando los potenciales superficiales tienen el mismo signo (excepto en el caso hipotético de que los potenciales son precisamente iguales en magnitud y signo) [Barouch97]. La fuerza entre una punta de AFM con un extremo parabólica de radio de curvatura R y una superficie plana [Hogg38; Butt92] está dado por

$$F_{el}^{cp} = \frac{2\pi R \epsilon \epsilon_0}{\lambda_D} [2\psi_S \varphi_T e^{-D/\lambda_D} - (\psi_S^2 + \psi_T^2) e^{-2D/\lambda_D}] \quad 2.25$$

Asumiendo los potenciales constantes de la muestra ψ_S y la punta φ_T . Para condiciones de carga constante la fuerza de doble capa electrostática es [Butt92] [Parsegian72]

$$F_{el}^{cc} = \frac{2\pi R \lambda_D}{\epsilon \epsilon_0} [2\sigma_S \sigma_T e^{-D/\lambda_D} + (\sigma_S^2 + \sigma_T^2) e^{-2D/\lambda_D}] \quad 2.26$$

Donde σ_S y σ_T son las densidades de carga de la superficie de la muestra y la punta respectivamente. En ambos casos se asume que los potenciales de superficie son bajos ($\psi_S, \psi_T \leq 50\text{mV}$).

Además de que los potenciales deberían ser bajos hay dos limitaciones más: El Radio de curvatura tiene que ser grande ($R \gg \lambda_D$) y las ecuaciones. (2.28) y (2.29) son válidas para $D \geq \lambda_D$. Para muy distancias grandes ($D \gg \lambda_D$) la ecuación es aún más simple y la diferencia entre la constante potencial de superficie y carga superficial constante es insignificante:

$$F_{el} = \frac{4\pi R \sigma_S \sigma_T \lambda_D}{\epsilon \epsilon_0} e^{-D/\lambda_D} = \frac{4\pi R \epsilon \epsilon_0 \psi_S \psi_T}{\lambda_D} e^{-D/\lambda_D} \quad 2.27$$

2.5 Referencias

- [Albrecht90] Albrecht T.R., Akamine S., Carver T.E., Quate C.F., J. Vac. Sci. Technol. A 8 (1990) 3386.
- [Albrecht91] Albrecht T.R., Grutter P., Horne D., Rugar D., J. Appl. Phys. 69 (1991) 668.
- [Alexander89] Alexander, S., Hellemans, L., Marti, O., Schneir, J., Ellings, V., Hansma, P. K., Longmire, M., and Gurleey, J.(1989). An atomic-resolution atomic-force microscope implemented using an optical lever. J. Appl. Phys.65, 164–167.
- [Barouch85] Barouch, E. Matijevic E., J. Chem. Soc., Faraday Trans. I 81 (1985)
- [Bergaud00] Bergaud C., Nicu L., Rev. Sci. Instrum. 71 (2000) 2487.
- [Binnig86] Binnig G.; Quate C. F.; Gerber C. (1986) Atomic Force Microscope, Phys.Rev. Lett. 56 (9):930-933.
- [Boisen96] Boisen, A., Hansen, O., & Bouwstra, S. (1996). AFM probes with directly fabricated tips. J. Micromech. Microeng., 6, 58-62.
- [Bustamante92] Bustamante C, Vesenka J, Tang C L, Rees W, Guthold M, Keller R. 1992. Circular DNA molecules imaged in air by scanning force microscopy. *Biochemistry*, 31, 22–26.
- [Butt03] Butt H.-J., Graf K., Kappl M., Physics and Chemistry of Interfaces, Wiley/VCH, Berlin, 2003.
- [Butt96] Butt H.-J., J. Colloid Interf. Sci. 180 (1996) 251.
- [Butt92] Butt H.-J., Nanotechnology 3 (1992) 60.
- [Butt93] Butt H.-J., Siedle P., Seifert K., Fendler K., Seeger T., Bamberg E., Weisenhorn A.L., Goldie K., Engel A., J. Microsc.169 (1993) 75.
- [Cappella99] Cappella B., Dietler G., 1999. Force-distance curves by atomic force microscopy Dietler/Surface Science Reports 34
- [Carpick99] Carpick R. W., Ogletree D. F. and Salmeron M., 1999. J. Colloid Interf. Sci. 211, 395 400

- [Chapman94] Chapman D.L., Phil. Mag. (London) 25 (1913) 475.
- [Chen94] Chen G.Y., Warmack R.J, Thundat T., Allison D.P., Huang A., Rev. Sci. Instrum. 65 (1994) 2532.
- [Cleveland93] Cleveland J.P., Manne S., Bocek D., Hansma P.K., (1993). A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy Rev
- [Cleveland95] Cleveland J.P., Schaffer T.E., Hansma P.K., Phys. Rev. B 52 (1995) 8692.
- [dePablo98] de Pablo P. J., Colchero J., Gómez-Herrero J., Baró A. M. (1998) Jumping mode scanning force microscopy. Applied physics letters 73, 3300.
- [Debye23] Debye P., Huckel E., Physikalische Zeitschrift 24 (1923) 185
- [Derjaguin41] Derjaguin B.V., Landau L., Acta Physicochim. URSS 14 (1941) 633.
- [Ducker90] Ducker W.A., Cook R.F., Appl. Phys. Lett. 56 (1990) 2408.
- [Dufrêne00] Dufrêne, Y.F., Lee, G.U. (2000). Advances in the characterization of supported lipid films with the atomic force microscope. Biochim. Biophys. Acta, 1509, 14-41.
- [Durig86] Durig U., Gimzewski J.K., Pohl D.W., Schlittler R., Force Sensing in Scanning Tunneling Microscopy, IBM, Ruschlikon, 1986, p. 1.
- [Elmer97] Elmer F.J., Dreier M., J. Appl. Phys. 81 (1997) 7709.
- [Firtel95] Firtel, M.; Beveridge, T.J. (1995). Scanning Force Microscopy in Microbiology. Micron, 26, 347-362.
- [Florin94] Florin E.L., Moy V.T., Gaub H.E. (1994) Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs, 5157, 415-417.
- [Friedenberg96] Friedenber M.C., Mate C.M., Langmuir 12 (1996) 6138.
- [Garcia02] Garcia R., Perez R., Surf. Sci. Rep. 47 (2002) 197.
- [Giessibl95] Giessibl F., Science 267 (1995) 68.
- [Gouy10] Gouy M., J. Phys. (Paris) 9 (1910) 457.

- [Heinz 00] Heinz W.F., Antonik M.D., Hoh J.H., J. Phys. Chem. 104 (2000) 622.
- [Hogg38] Hogg R., Healy T.W., Fuerstenau D.W., Trans. Faraday Soc. 62 (1966) 1638.
- [Horcas07] Horcas I., Fernandez R., Gomez-Rodriguez J.M., Colchero J., Gomez-Herrero J., and Baro A. M., (2007) WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. Rev. Sci. Instrum. 78, 013705.
- [Hunter95] Hunter R.J., Foundations of Colloid Science i and ii, Clarendon Press, Oxford, 1995.
- [Israelachvili92] Israelachvili J.N., Intermolecular and Surface Forces, Academic Press, London, 1992.
- [Lantz94] Lantz M.A., O'Shea S.J., Welland M.E, Appl. Phys. Lett. 65 (1994) 409.
- [Martin87] Martin Y., Williams C.C., Wickramasinghe H.K., J. Appl. Phys. 61 (1987) 4723.
- [Martin87] Martin, Y. and Wickramasinghe, H.K. (1987) Magnetic imaging by force microscopy with 1000-Å resolution. Appl. Phys. Lett., 50 (20), 1455–1457
- [Maugis92] Maugis D., 1992. J. Colloid Interf. Sci. 150, 243–269.
- [Meyer04] Meyer E., Hug J.H., Bennewitz.,(2004). Scanning Probe Microscopy: The Lab on a Tip. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- [Meyer88] Meyer, G., and Amer, N. (1988). Novel optical approach to atomic force microscopy. Appl. Phys. Lett. 53, 1054.
- [Miyatani97] Miyatani T., Horii M., Rosa A., Fujihira M., Marti O., Appl. Phys. Lett. 71 (1997) 2632.
- [Nanotec]
- [Okajima03] Okajima T., Sekiguchi H., Arakawa H., Ikai A, Appl. Surf. Sci. 210 (2003) 68.
- [Parsegian72] Parsegian V.A., Gingell D., Biophys. J. 12 (1972) 1192.
- [Pethica88] Pethica J.B., Sutton A.P., J. Vac. Sci. Technol. A 6 (1988) 2490.

- [Radmacher94] Radmacher M., Cleveland J.P., Fritz M., H.G.
- [Hansma94] Hansma,P.K. Hansma, Biophys. J. 66 (1994) 2159
- [Rosa96] Rosa A., Polym. Prepr. Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem. 37 (1996) 616.
- [Rosoff02] Rosoff M. (ed), 2002. Nano surface Chemistry, Marcel Dekker Inc NY, USA.
- [Roters96] Roters A., Johannsmann D., J. Phys.: Condens. Matter 8 (1996) 7561
- [Rotsch97] Rotsch, C., and M. Radmacher. 1997. Mapping local electrostatic forces with the atomic force microscope. Langmuir. 13:2825–2832.
- [Sader98] Sader J.E., J. Appl. Phys. 84 (1998) 64.
- [Sader95] Sader J.E., Rev. Sci. Instrum. 66 (1995) 4583.
- [Sarid91] Sarid D., Scanning Force Microscopy, Oxford University Press, New York, 1991.
- [Sasaki94] Sasaki M.,. Hane K, Okuma S,. Bessho Y, Rev. Sci. Instrum. 65 (1994) 1930.
Sci. Instrum., 64, 403–405
- [Senden01] Senden T.J., Curr. Opin. Colloid Interf. Sci. 6 (2001) 95.
- [Tamayo96] Tamayo J., Garcia R., Langmuir 12 (1996) 4430.
- [Thundat94] Thundat T., Warmack R.J., Chen G.Y.,. Allison D.P, Appl. Phys. Lett. 64 (1994) 2894.
- [Ueyama98] Ueyama H.,. Sugawara Y,. Morita S, Appl. Phys. A 66 (1998) S295.
- [Van94] Van der Werf K.O., Putman C.A.J., de Groth B.G., Greve J., Appl. Phys. Lett. 65 (1994) 1195.
- [Verwey48] Verwey E.J.W., Overbeek J.T.G., Theory of the Stability of Lyophobic Colloids, Elsevier Publishing Inc., New York, 1948.
- [Winkler96] Winkler R.G.,. Spatz J.P, Sheiko S., Moller Reineker M., P., Marti O., Phys. Rev. B 54 (1996) 8908.
- [Worcester88] Worcester, D. L., R. G. Miller, And P. J. Bryant. 1988. Atomic Force microscopy of purple membranes. J. Micros. (Oxf).152:817-821.

Capítulo 3. Diferenciación de carga superficial de Avidina y Estreptavidina por medio de AFM-FS

3.1 Motivación y objetivo

El análisis químico de la materia consiste en la determinación de su composición elemental o molecular. Algunas investigaciones muestran la importancia y el interés continuo en la determinación del impacto de la electrostática en el reconocimiento molecular. La cantidad de material necesario para la realización de un análisis químico ha disminuido continuamente a medida que ha aumentado la sensibilidad de análisis de las herramientas disponibles. Desde la invención del Microscopio de Efecto Túnel (STM – *Scanning Tunneling Microscope*) y posteriormente las Microscopías de Campo Cercano (SPM – *Scanning Probe Microscopy*), que permiten obtener imágenes a nivel atómico [Binnig87], ha aumentado la esperanza de poder determinar la composición química con resolución a escala sub-nanométrica. En el STM el reconocimiento molecular se obtiene por medio de los diferentes estados electrónicos de la muestra. Sin embargo, esta técnica no se puede emplear en muestras no conductoras o en material biológico que requiere realizar las medidas en condiciones fisiológicas y por tanto en medio líquido. Una de las grandes ventajas de la microscopía de fuerzas es que permite obtener información química con resolución atómica o molecular incluso en medio líquido [Asakawa09; Ferber11]. Por tanto el AFM es una herramienta indispensable para realizar estudios de muestras biológicas a escala nanométrica debido a su capacidad de medir fuerzas en tiempo real y en medio fisiológico. El AFM permite realizar análisis químico por medio de la Espectroscopía de Fuerzas (FS), la cual se basa en la medida de curvas fuerza-distancia $F(D)$ en el rango de los pN, donde F es la fuerza de interacción entre la punta y la muestra en función de la distancia que las separa, en el rango de los nm.

El objetivo de este trabajo es demostrar que moléculas individuales de avidina y estreptavidina ancladas a una bicapa lipídica biotinilada, se pueden diferenciar por AFM, a pesar de que ambas proteínas, por presentar una estructura prácticamente idéntica, resultan indistinguibles topográficamente. En adelante se empleará la abreviatura estrept(avidina) para hacer referencia a una u otra indistintamente. El sistema biotina-estrept(avidina) se ha convertido en uno de los principales pilares en el análisis bioquímico y tiene aplicaciones en biotecnología, en la industria y en la medicina clínica. El principio que se ha empleado para su reconocimiento consiste en la diferencia de carga superficial que presentan ambas proteínas y se basa en medir la

interacción electrostática de las dos moléculas con la punta del AFM. De hecho, a pH 7 la avidina es una glicoproteína básica, $pI = 10,5$, de manera que está cargada positivamente [Savage94], mientras que la estreptavidina es una proteína no glicosilada con un pI casi neutro.

Aunque este trabajo se he realizado exclusivamente con AFM, cabe mencionar que hay otras posibilidades interesantes, las cuales combinan el AFM con técnicas ópticas como la microscopía de fluorescencia, la microscopía confocal, la microscopía de fluorescencia por reflexión total interna (TIRFM), la espectroscopía infrarroja (IS) y la microscopía óptica de campo cercano (SNOM) entre otras [[Jung98]].

3.2. Introducción

Toda superficie inmersa en un líquido presenta una determinada carga superficial, esta carga se ve compensada por una región de iones de carga opuesta o contraiones. Esta región recibe el nombre de doble capa eléctrica (EDL, del inglés *Electrical Double Layer*) [Israelachvili91] y está formada por dos zonas: una primera zona más compacta y cercana a la superficie constituye la llamada capa de Helmholtz o de Stern, en la cual algunas moléculas del solvente se encuentran adsorbidas en la superficie. A continuación, la segunda zona denominada capa difusa corresponde a una nube de iones en continuo intercambio con el solvente debido a la agitación térmica. Cuando dos superficies se aproximan entre sí, se origina una fuerza de interacción debida a la superposición de sus correspondientes dobles capas eléctricas.

La física básica viene descrita por la teoría DLVO, llamada así por sus autores: Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeck. La teoría DLVO consta de dos contribuciones: la fuerza de van der Waals y la fuerza de EDL. A grandes distancias, la fuerza EDL decae exponencialmente y la longitud de decaimiento es la llamada longitud de Debye

$$\lambda_D = \left(\frac{\varepsilon_0 k_B T}{e^2 \sum_i c_i z_i^2} \right)^{1/2} \quad 3-1$$

donde ε es la constante dieléctrica del líquido, $k_B T$ es el factor de Boltzmann, c_i y z_i son la concentración y la valencia del tipo de iones presentes en la solución respectivamente.

Según el modelo continuo de Poisson-Boltzmann, la distribución del potencial es una ecuación de segundo orden diferencial. La fuerza entre una superficie plana y una punta de AFM (con forma parabólica en su extremo y radio de curvatura R) se puede obtener para unas condiciones de carga constante [Butt05]. Esta ecuación se puede aproximar a una de mayor sencillez, siempre bajo ciertos supuestos, como pequeños potenciales superficiales, separaciones punta-muestra D mayores que la longitud de Debye λ_D (3-1), y radios de punta mayores que la separación, $R \gg D \geq \lambda_D$, dan como resultado la siguiente expresión

$$F_{EDL}(D) = \frac{4\pi R \sigma_{tip} \sigma_{sample} \lambda_D}{\epsilon_0} \exp\left(-\frac{D}{\lambda_D}\right) \quad 3-2$$

Donde R es el radio de la punta y σ_{punta} y $\sigma_{muestra}$ son las densidades de carga superficiales de la punta y la muestra respectivamente. La ecuación (2) permite determinar la $\sigma_{muestra}$ midiendo las curvas de fuerza de la doble capa eléctrica en función de la distancia D. Por lo tanto, midiendo $F_{EDL}(D)$ para la avidina y la estreptavidina se puede obtener la carga superficial de ambas proteínas. De hecho, este es un caso particular de análisis químico de estreptavidina y avidina ya que la carga superficial está relacionada con la composición de cada proteína.

3.3 Métodos experimentales

3.3.1 Preparación de la muestra

La muestra está formada por un sustrato de mica sobre el que se adhiere, a modo de sustrato biológico, una bicapa lipídica biotinilada a la que se anclan específicamente la avidina y la estreptavidina. La avidina es una proteína presente en la clara de huevo, mientras que la estreptavidina es una proteína bacteriana producida por *Streptomyces avidinii*. Ambas están compuestas por cuatro subunidades idénticas, cada una de ellas reactiva a la unión con una molécula de biotina.

Como ya se ha mencionado en el capítulo 1, las bicapas lipídicas se emplean actualmente como anclaje de biomoléculas, ya que constituyen un modelo de membrana biológica y por tanto permiten estudiar la unión proteína-membrana así

como la inserción de proteínas a través de la membrana [Desmeules02]. Las propiedades de las bicapas lipídicas y complejos proteína-membrana han sido de gran interés y objeto de numerosos estudios debido a su importancia física y biológica y las aplicaciones potenciales. En estudios previos [Weisenhorn92; Scheuring99; Qiu95] se utilizó el AFM para investigar la reacción de reconocimiento específico entre la estrept (avidina) y una bicapa biotinilada. Incluso después de la transferencia de la bicapa biotinilada a un soporte sólido (como la mica en nuestro caso), el receptor de biotina se mantuvo accesible y reactivo a la estrept (avidina).

Como soporte lipídico para las proteínas se ha utilizado una bicapa biotinilada formada por DOPC (1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina) y b-DPPE (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3 phospho-ethanolamine-N-(biotinyl)). Para la formación de la bicapa se ha empleado el método de fusión de vesículas [Mingeot-Leclercq08] cuyos pasos se pueden ver en la figura 3.1 y se detallan a continuación: La mezcla de ambos lípidos DOPC/B-DPPE (9.9:0.1 (mol:mol)) se disuelve en cloroformo para dar una concentración final de 0.7 mg/ml. Esta solución se seca con un flujo de nitrógeno, obteniéndose una película en el interior del vial. Esta película lipídica se hidrata con una solución tampón de PBS (*Phosphate buffered saline*) que contiene PO_4^{3-} [10 mM], NaCl [137 mM] y KCl [27 mM] con pH 7.4 a temperatura ambiente. Entonces el vial se somete a varios ciclos de agitación vortex para desprender la película y posteriormente se hace pasar repetidamente el tampón con el lípido a través de unas membranas de policarbonato con un tamaño de poro de 200 nm para obtener vesículas unilamelares no mayores de este tamaño. Finalmente se incubaba la solución con las vesículas durante dos horas en un sustrato de mica recién exfoliada. Tras el periodo de incubación, en que las vesículas presentes en la disolución se van rompiendo y formando la bicapa sobre la mica, la muestra se aclara con la solución tampón descrita anteriormente. Una vez que la bicapa está formada, se incubaba la estrept(avidina) con una concentración de 1.25 $\mu\text{g} / \text{ml}$ a temperatura ambiente durante 45 minutos. Por último se lava para retirar las proteínas que no se han anclado al soporte biotinilado. Debido a la concentración empleada del 1% de lípido con biotina se obtiene una baja cobertura de proteínas, lo que hace posible el estudio de moléculas individuales. El agua utilizada en todos los experimentos ha sido agua desionizada con resistividad de $18\text{M}\Omega^3 \text{ cm}$.

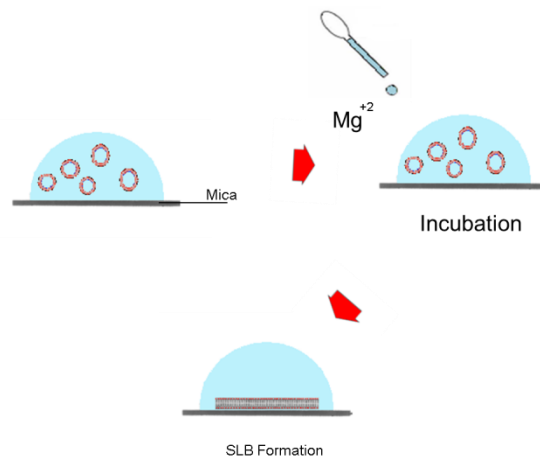


Figura 3-1 Esquema del proceso de formación de la bicapa lipídica por el método de vesículas.

3.3.2 Detalles experimentales

Las medidas de AFM realizadas durante este trabajo se han llevado a cabo en medio líquido y a temperatura ambiente con un sistema comercial [Nanotec] y el programa de control WSxM [Horcas07]. Se han empleado puntas de nitruro de silicio (OMLC-RC800PSA-W) con una constante de fuerza de 50 pN/nm [Olympus].

En este trabajo se ha aplicado el modo de espectroscopía de fuerzas FSI (*Force Spectroscopy Imaging*) con el fin de obtener las fuerzas EDL de dos proteínas individuales unidas a una bicapa biotinilada. El modo de funcionamiento FSI consiste en la adquisición simultánea de una curva de fuerza - distancia en cada píxel de una imagen topográfica, de tal manera que es posible obtener imágenes correlacionadas de topografía y fuerza [Sotres08]. Este método también es conocido como mapa de fuerzas o *force volume* [Laney97; Heinz99]. De las curvas FZ se obtiene información importante sobre las propiedades físicas locales y las fuerzas de interacción punta - muestra. Se pueden estudiar por tanto, las fuerzas de unión entre complejos receptor-ligando, el estiramiento de moléculas individuales, propiedades mecánicas, etc. Un paso más allá consiste en la espectroscopía de fuerzas de moléculas individuales (SFMS *Single Molecule Force Spectroscopy*), donde las fuerzas se miden a nivel de una sola molécula. El análisis de los archivos FSI se ha llevado a cabo por medio de la programación de código en Matlab [Mathworks] [Sotres10].

3.4 Resultados

3.4.1 Adhesión de la bicapa lipídica al sustrato de mica

De acuerdo con las imágenes de AFM mostradas en la figura 3.2, tanto el sustrato de mica como la bicapa biotinilada presentan una topografía totalmente plana, por lo que no es posible saber si la bicapa se ha formado o no en la parte superior de la superficie de la mica. Por lo tanto, es necesario un método para asegurar que la bicapa se ha depositado en el sustrato. Para esto se ha medido el espesor de la bicapa por varios métodos. Uno de ellos implica crear un surco raspando la película con la punta del AFM; a continuación, el espesor se determina mediante el barrido de la muestra a través del surco [Lobo99]. Este método no es recomendable para nuestro sistema, ya que hay que aplicar una fuerza mayor a la fuerza de ruptura de la bicapa, que de acuerdo con la figura 3-3 es de 2,7 nN, de forma que tanto la punta como la muestra se ven seriamente dañadas en el proceso.

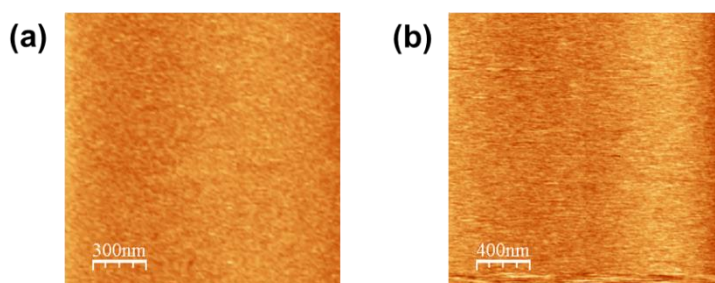


Figura 3.2 Imágenes de topografía de AFM en mica (a) y en la bicapa depositada sobre mica (b).

Otra manera consiste en medir la profundidad de penetración de la bicapa a partir del análisis de las curvas fuerza-distancia (Figura 3.3 (a)) [Choi04]. A suficiente distancia de la muestra la fuerza es cero, pero cuando esta distancia disminuye, la fuerza aumenta, primero lentamente, hasta que entra en contacto con la bicapa; en el momento en que comienza la indentación aparece una subida vertical de la fuerza mientras la distancia se mantiene constante. La muestra resiste la fuerza sin deformación hasta que se produce la rotura de la bicapa y la punta alcanza el sustrato de mica. Este salto en la curva de fuerza permite medir el espesor (~ 6 nm) y la fuerza de ruptura de la bicapa ($\sim 2,7$ nN). Para confirmar el espesor obtenido, medimos la altura de la bicapa a partir de una imagen de topografía en modo jumping [Pablo98] de un recubrimiento incompleto de lípido sobre mica (figura 3.3 (b)). En el perfil (figura 3.3(c)) se puede medir la altura de la bicapa de lípido y confirmar que coincide con el valor obtenido a partir de la curva en la figura 3.3 (a).

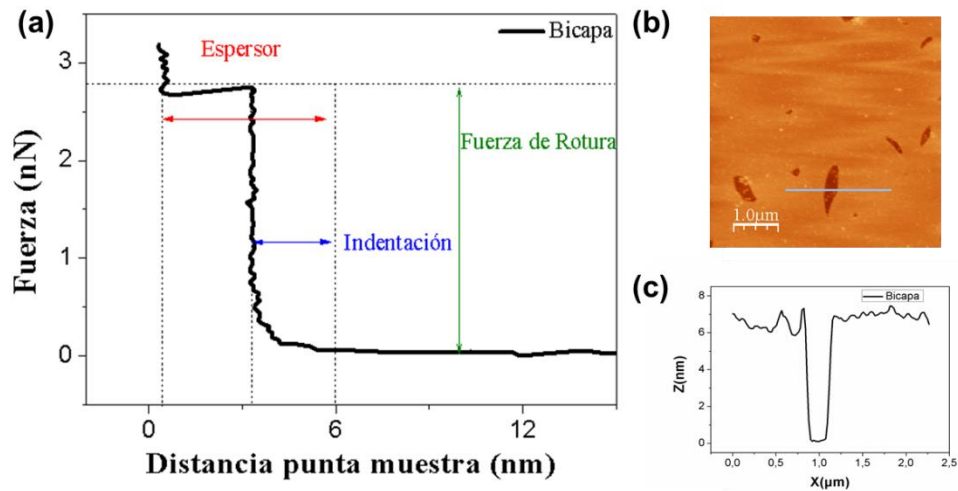


Figure 3.3 (a) Curva fuerza-distancia que muestra la indentación sobre la bicapa lipídica. La fuerza de ruptura se localiza a 2.7 nN y el espesor de la bicapa es de 6 nm. (b) Imagen de topografía de AFM de un recubrimiento incompleto de bicapa sobre mica. (c) Perfil de la bicapa en mica correspondiente a línea azul de la imagen (b). La altura del perfil se sitúa entorno a 6 nm, coincidiendo con el valor obtenido en (a)

3.4.2 El modo de operación FSI aplicado a proteínas de estrept(avidina) ancladas a una bicapa biotinilada

El método FSI se ha utilizado para obtener resolución de moléculas individuales. Los datos crudos obtenidos a partir de un archivo FSI incluyen una imagen topográfica y una curva de fuerza asociado a cada píxel de la superficie barrida. En este experimento cada archivo FSI contiene 64x64 píxeles. Las curvas FZ deben ser procesadas para poder representarlas en términos de fuerza frente a distancia punta-muestra real y no frente a desplazamiento del piezoeléctrico, por ello los datos deben ser sometidos a un proceso automático para su posterior análisis. En un trabajo reciente se propone un modelo simplificado para estudiar cuantitativamente las fuerzas EDL en moléculas individuales adsorbidas en una superficie [Egawa99]. Dentro de este modelo la fuerza EDL en la en la superficie del sustrato se puede describir por una función que decae exponencialmente con la distancia punta-sustrato d_{ps} , es decir,

$$F_{EDL}(d_{ps})=F_{T0} \cdot \exp(-d_{ps}/\lambda_D) \quad 3.3$$

donde F_{T0} es la amplitud de la fuerza total y λ_D es la longitud de Debye. El ajuste de las curvas de fuerza se lleva a cabo mediante un método de mínimos cuadrados. De los ajustes se obtienen la amplitud de la fuerza y la longitud de Debye.

Además, debido a la presencia de las moléculas, la distancia d_{ps} cambia; por lo tanto, es necesario transformar las curvas de fuerza sobre las proteínas en una representación de fuerza frente a distancia punta-molécula (d_{pm}) y no punta-sustrato (d_{ps}). Esto se realiza desplazando (el correspondiente valor de altura de la imagen de la topografía) el punto de contacto de las medidas experimentales de fuerza frente a distancia punta-muestra (suponiendo una altura cero para el sustrato). En otras palabras, en la parte superior de las moléculas de estrept(avidina) $d_{pm} = d_{ps} - h_m$, donde h_m es la altura de la molécula (figura 3.4)

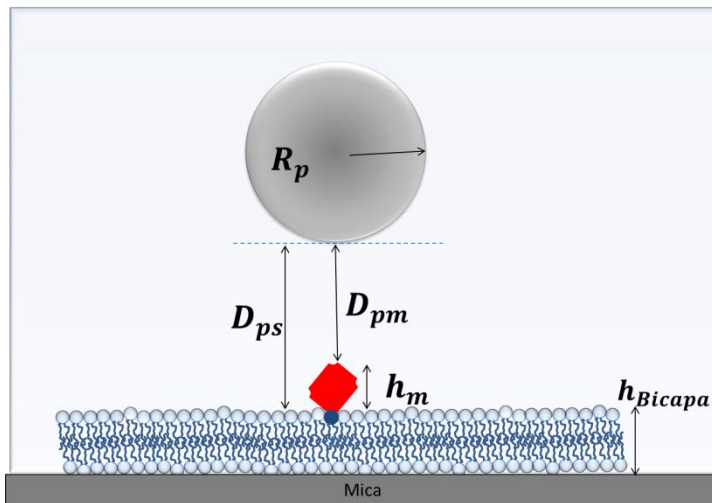


Figura 3.4. Representación esquemática de la muestra en la que se puede ver la molécula de estrept(avidina) anclada a la bicapa biotinilada formada sobre mica. Se muestran los principales parámetros geométricos empleados para la obtención de la fuerza EDL.

Si suponemos que la fuerza EDL domina la interacción punta-muestra, dos parámetros (F_{T0} y λ_D) se pueden obtener mediante el ajuste de las curvas $F(d_{ts})$ a las funciones exponenciales (ecuación (3.3)). En la parte superior del sustrato lipídico, las moléculas no contribuyen a la fuerza ejercida sobre la punta. Por lo tanto, en este caso la amplitud de la fuerza EDL, F_{T0} , es la misma que la de una interacción pura punta-sustrato F_{ts0} . En la parte superior de una molécula, sin embargo, F_{t0} es la suma de la amplitud de la fuerza punta-sustrato, F_{ts0} y un segundo término debido a la fuerza EDL entre la punta y la molécula, F_{tm0} , es decir, $F_{t0} = F_{ts0} + F_{tm0}$.

Además, de acuerdo con la ecuación (3.2), la amplitud de la fuerza es proporcional a las densidades de carga de la superficie de la sonda, σ_t , y de la molécula, σ_m . Por lo tanto, para separaciones similares punta-sustrato, las fuerzas EDL deberían ser más repulsivas cerca de una molécula que lejos de ella, si la molécula tiene la misma carga superficial que la sonda, mientras que si tiene signo opuesto, se debe observar una fuerza de atracción.

3.4.3 Archivos FSI en muestras de avidina y estreptavidina

Una vez que se ha confirmado la formación de la bicapa biotinilada, se han preparado dos tipos de muestras diferentes: la primera se ha incubado con una solución de avidina en una concentración de $1,25 \mu\text{g} / \text{ml}$ durante 45 minutos (muestra A), mientras que la segunda se ha incubado con estreptavidina en las mismas condiciones (muestra B), es decir, la primera incluye sólo avidina mientras que la segunda contiene sólo estreptavidina. En la figura 3 (a y b) se muestran las imágenes topográficas representativas de las muestras A y B respectivamente, obtenidas de un archivo FSI para el cual se ha obtenido la curva $F(D)$ para cada punto de la imagen (x,y) . Para un píxel específico (x_0,y_0) , el punto de contacto, D_0 , corresponde a $F(D_0) = F_{\text{referencia}}$, lo que equivale a la topografía de la muestra. Las proteínas se pueden identificar porque aparecen como protuberancias simétricas de $\sim 4\text{-}5 \text{ nm}$ de altura, aunque la anchura es mayor debido a la convolución de la punta [Butt05].

En la figura 3 (c y d) se muestran dos curvas fuerza-distancia ($F(d_{ts})$) representativas de las muestras A y B respectivamente. La curva azul ha sido adquirida sobre una molécula de avidina, mientras que la curva roja corresponde a una molécula de estreptavidina. Las curvas negras, en cada caso, corresponden a la $F(d_{ts})$ sobre el sustrato lipídico. Además, se puede observar que las curvas azul y roja se encuentran desplazadas con respecto a las curvas negras la distancia equivalente a la altura de las proteínas $h_m \sim 4.5 \text{ nm}$, ya que tal como ya se ha mencionado anteriormente $d_{ts} = d_{tm} + h_m$. Del proceso de ajuste de estas curvas (descrito en el apartado anterior) a la función exponencial $F(d_{ts})$, se ha obtenido $F_{T0} = (77 \pm 14) \text{ pN}$ y $\lambda_D = (3.4 \pm 0.9) \text{ nm}$ para avidina, mientras que para la estreptavidina los valores obtenidos son: $F_{T0} = (292 \pm 33) \text{ pN}$ y $\lambda_D = (2.9 \pm 0.5) \text{ nm}$. A lo largo del texto, estas magnitudes se obtienen a partir de los valores medios calculados mediante un promedio de los valores obtenidos en varias curvas realizadas en posiciones similares (tanto en la parte superior de la bicapa lipídica como en la parte superior de cada proteína).

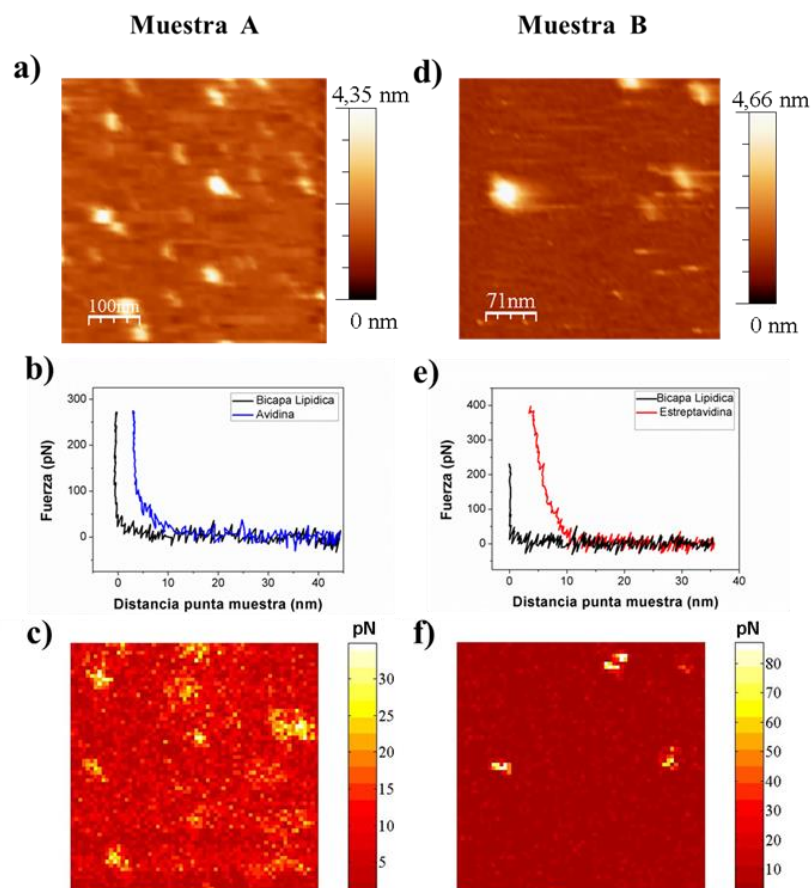


Figura 3.3 (a) y (b) Imágenes de topografía obtenidas en el modo FSI de las muestras A: avidina y B: estreptavidina, respectivamente. Las moléculas están unidas específicamente a la bicapa biotinilada. c) y d) Curvas fuerza-distancia obtenidas del mismo FSI de las imágenes (a) y (b). Las curvas se han adquirido sobre la superficie del lípido (curvas negras) y sobre moléculas de avidina (curva azul) y estreptavidina (curva roja). (e) y (f) Mapas iso-distancia calculados del mismo fichero FSI. Estos mapas representan las fuerzas aplicadas sobre la punta del AFM a una distancia de 7 nm de la superficie de la muestra de lípido con avidina (e) y lípido con estreptavidina (f). Las medidas se han realizado en PBS 10mM a pH 7.4.

Los mapas iso-distancia son una forma ilustrativa de obtener la distribución de las fuerzas EDL en la superficie de las muestras a una determinada distancia. El mapa se forma a partir de los valores de fuerza normal, para cada punto de la muestra, a una distancia dada de un plano base asignado previamente. En el caso de moléculas adsorbidas generalmente se asigna este plano al que corresponde con el sustrato [Sotres10]. Los mapas iso-distancia de las figuras 3.3 (e) y (f) se han obtenido de los mismos archivos FSI que las figuras 3.3 (a) y (b). El mapa se ha realizado a una distancia $d_{is} = 7 \text{ nm}$, aunque se puede realizar el mapa a una

distancia diferente, hay que tener en cuenta, que a distancias mayores la fuerza es demasiado baja y ruidosa y a distancias menores la imagen FSI está demasiado cerca de la topografía, lo que puede dificultar la distinción de las dos proteínas por medio de su doble capa eléctrica, ya que las fuerzas electrostáticas y de van der Waals dominan la interacción no específica de largo alcance a distancias mayores de 2 nm [Leckband94]. A esta distancia de 7 nm del plano del sustrato, el mapa EDL de las proteínas (figuras 3.3 (e) y (f)) presenta un valor más claro que el sustrato lipídico, lo que corresponde con mayores valores de fuerza, tal como se observa también en las curvas $F(D)$ mostradas en las figuras 3.3 (c) y (d). Además las moléculas de estreptavidina en el mapa iso-distancia muestran un contraste mayor con el sustrato que las moléculas de avidina en las que el contraste es menor, ya que $F_{EDL}(avidina) < F_{EDL}(estreptavidina)$. Sin embargo se ha re-escalado el eje Z con el fin de tener el mismo brillo para ambas proteínas.

Se ha comprobado la reproducibilidad de los resultados mediante la adquisición de varias imágenes en el modo de FSI para cada proteína. En la figura 4 (a) se muestran las curvas $F(D)$ obtenidas para tres experimentos con avidina (muestra A) y tres experimentos con estreptavidina (muestra B). Al superponer las curvas de ambos experimentos, se puede apreciar claramente que la fuerza es menor sobre las moléculas de avidina que sobre las moléculas de estreptavidina. La figura 4 (b) muestra un histograma de los valores de fuerza F_{T0} , normalizados al radio de la punta, obtenidos en las distintas muestras, para avidina (columnas azul oscuro), estreptavidina (columnas rojas) y bicapa lipídica (columnas azul claro en las muestras A y amarillas en las muestras B).

Aunque las medidas se han realizado con el mismo tipo de puntas, los valores obtenidos de F_{T0} en cada experimento pueden variar en función del radio efectivo de cada punta. Con el fin de evitar las posibles variaciones provocadas por los diferentes radios de las puntas, en la figura 4 (b) se muestran los valores F_{T0} normalizados por el radio de la punta. Utilizando un modelo de dos esferas, nuestro radio efectivo estimado de la punta se puede calcular a partir de la anchura a media altura (FWHM) de un perfil de una imagen de estrept(avidina) en cada caso (ecuación (4)) [Engel97]

$$R_{tip} = \frac{FWHM^2 - 4R_{sample}^2}{8R_{sample}} \quad 3.4$$

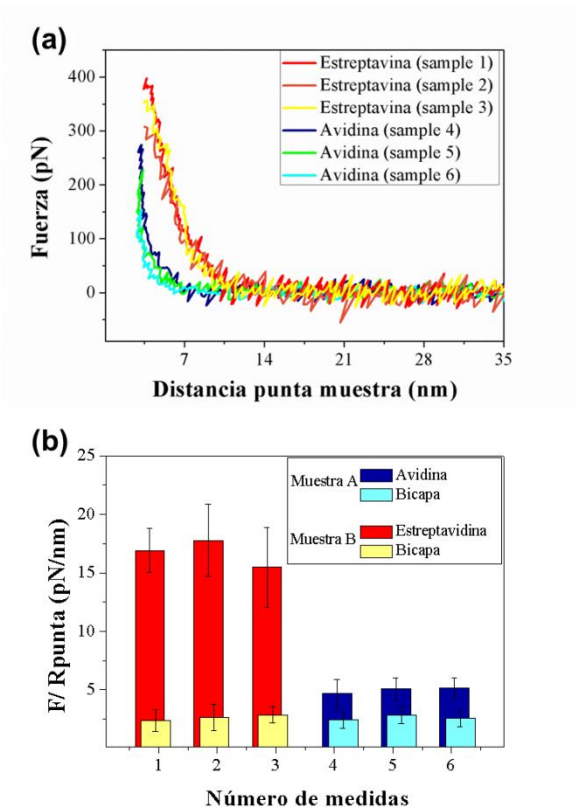


Figura 3.4 (a) Representación conjunta de las curvas de fuerza frente a la distancia punta-molécula sobre moléculas de avidina (curvas azules) y moléculas de estreptavidina (curvas amarilla, naranja y roja) obtenidas de seis diferentes archivos FSI. (b) Histograma de los valores de fuerza normalizados al radio de la punta, obtenidos de los mismos ficheros FSI de la figura (a). Las columnas azules muestran los valores obtenidos para avidina, las columnas rojas los valores para estreptavidina y las columnas cian y amarillas los valores para la bicapa lipídica en las muestras con avidina y con estreptavidina respectivamente. Las barras negras corresponden al error de las medidas en cada caso.

El valor de la fuerza EDL obtenido para la estreptavidina en cada columna de color rojo de la figura 3.4 (b), se ha calculado como el promedio de los valores de las curvas F_{T0} en las moléculas de estreptavidina para cada archivo FSI correspondiente (muestra 1, 2 y 3). Los valores medios obtenidos de F_{T0} sobre el lípido en estas mismas muestras se representan en las columnas de color amarillo. El mismo proceso se ha llevado a cabo para las muestras de avidina sobre lípido (muestras 4, 5 y 6). Los valores F_{T0} para avidina se muestran en las columnas azules, mientras que los valores F_{T0} para el lípido aparecen representados en las columnas de color cian. Se puede observar que los valores obtenidos para el lípido son similares en los experimentos de las muestras A y B. En las muestras de la figura 4 (b) los valores F_{T0} normalizados varían entre 15,5 y 17,8 pN / nm para estreptavidina, 4,7 y 5,2

pN/nm para avidina y entre 2,3 y 2,8 pN / nm para la bicapa lipídica. Estas variaciones en los valores pueden deberse a ligeros cambios en la densidad de carga de las puntas utilizadas, bien sean del proceso de fabricación o de posibles impurezas adheridas a la punta durante el proceso de medida.

3.5 Discusión

Es importante entender cómo la espectroscopía de fuerzas realizada con el AFM es capaz de discriminar avidina y estreptavidina. El concepto proviene del hecho de que cada superficie sumergida en un electrolito desarrolla una carga superficial y por lo tanto, una doble capa electrostática (EDL). Cuando dos superficies tienen una carga superficial diferente entonces pueden ser diferenciados. La fuerza es una magnitud muy sensible a esta variación ya que es proporcional a la densidad de carga superficial de la muestra. En la ecuación (3.2) se puede apreciar que la fuerza de interacción EDL entre la punta y la muestra es una función de su distancia D y es proporcional a las densidades de carga superficiales σ_{punta} y σ_{muestra} . La longitud de Debye (λ_D) es otra magnitud importante que depende, de acuerdo con la ecuación (3.1), de la concentración de iones, de su valencia y del pH de la solución tampón.

Las puntas de nitruro de silicio están ampliamente caracterizadas y se sabe que en solución a pH 7 están cargadas negativamente, ya que tienen un $pI < [Sokolov06]$. Puesto que los resultados muestran que las fuerzas EDL son repulsivas, tanto para ambas proteínas como para el sustrato lipídico (Figuras 3.3 (c) y (d)), se deduce que los tres especímenes están cargados negativamente. Además, teniendo en cuenta los valores obtenidos de la fuerza EDL para cada uno de ellos, las densidades de carga están relacionadas por las desigualdades: $|\sigma_{\text{lipido}}| < |\sigma_{\text{avidina}}| < |\sigma_{\text{estreptavidina}}|$. Esta desigualdad permite discriminar entre avidina y estreptavidina, como se muestra en la figura 3.4, a pesar de que ambas proteínas homólogas presenten el mismo signo de σ . Esto hace que la diferenciación sea más difícil y demuestra que este método basado en la medida de la fuerza EDL tiene una buena sensibilidad.

A continuación se dan algunos argumentos que podrían explicar el signo de la carga de los tres especímenes presentes en las muestras (avidina, estreptavidina y la bicapa). Comenzamos analizando el caso de los lípidos zwitterionicos (que son los que se han empleado en el experimento) ya que pensamos que tienen una influencia no despreciable en las propiedades eléctricas de las proteínas. Los lípidos

zwitterionicos deberían ser neutros a pH fisiológico, pero sin embargo los resultados obtenidos muestran que la bicapa de este tipo de lípidos está cargada. Asimismo, esperamos que los potenciales electrostáticos de membrana cambien la concentración local de iones y pequeñas moléculas [Cevc90].

La curva de fuerza sobre el lípido es ligeramente repulsiva (44 pN) lo que indica que la bicapa tiene una pequeña carga negativa. Un resultado similar se ha obtenido para membranas zwitterionicas de DOPC analizadas por AFM con una punta de nitruro de silicio [Yang08]. Las curvas de fuerza medidas fueron repulsivas lo que indica, que la membrana zwitterionica se carga negativamente. Estos autores atribuyen la interacción repulsiva a la unión de contraiones. Esto también podría aplicarse a nuestro caso, es decir, la membrana zwitterionica alcanza carga superficial negativa debido a la unión de contraiones (nuestra solución tampón contiene 137 mM de NaCl y 27 mM de KCl). Como una alternativa interesante proponen que la interacción repulsiva es debida a una huella o señal externa del gran campo electrostático interno asociados con el potencial de dipolo entre los grupos de las cabezas y las regiones hidrofóbicas de la membrana. Creemos, por tanto, que el potencial dipolar también podría ser el origen de la carga negativa de la bicapa biotinilada.

Ahora vamos a considerar el caso de las proteínas asociadas específicamente a la membrana por medio de la unión con la biotina que actúa de ligando. La fuerza de doble capa electrostática entre dos monocapas de estreptavidina ancladas a una bicapa biotinilada, se he medido con el aparato de fuerza superficial (SFA - *Surface Force Apparatus*) y se ha publicado la dependencia de la densidad de carga de la estreptavidina con el pH [28]. El punto isoeléctrico de 5.0 ± 0.5 medido directamente con este método para la estreptavidina unida a biotina, difiere del *pI* casi neutro de la proteína en disolución. Esto demuestra que las fuerzas electrostáticas reflejan la densidad de carga local de la superficie expuesta de la proteína. En el caso de la estreptavidina, el punto isoeléctrico medido aumenta la carga negativa para la unión con biotina a $\text{pH} = 7.4$, lo que explica cualitativamente la carga negativa observada para estreptavidina a pesar de que es un homólogo neutro de la avidina.

Las curvas sobre la avidina deberían ser atractivas, ya que ésta es positiva (*pI* = 10) y la punta negativa (*pI* < 6) a pH neutro. Sin embargo pensamos que en este caso también se produce la misma situación descrita anteriormente para la estreptavidina-biotina, y que la unión de la avidina con la biotina que tiene un *pI* = 3

hace que el conjunto presente una carga más negativa que la avidina sola, aunque no hemos encontrado ningún experimento al respecto reportado en la literatura. Por otro lado, suponiendo que el complejo avidina-biotina aún tuviera carga positiva ($pI > 7.4$) podría estar teniendo lugar un proceso de inversión de carga debido al apantallamiento de los iones negativos situados a su alrededor.

Por último, de la ecuación (3.2) se han obtenido de manera experimental la densidad de carga superficial de las moléculas y el lípido donde el valor F_{EDL} se ha calculado a partir de la ecuación (3.3). Los valores obtenidos para las proteínas son $\sigma_{estreptavidina} = -33 \pm 6.3 \text{ mC/m}^2$ y $\sigma_{avidin} = -6 \pm 0.3 \text{ mC/m}^2$, mientras que para el lípido es $\sigma_{SLB} = -4 \pm 1.4 \text{ mC/m}^2$. Estos valores son el promedio obtenido a partir de los tres experimentos que se muestran en la figura 3.4. En la referencia [Sivasankar98] obtuvieron un valor de $\sigma_{estreptavidina} = -19 \text{ mC/m}^2$ a $pH = 7.6$ y 6 mM de tampón fosfato. Este resultado está en consonancia con el valor obtenido en nuestros experimentos, ya que en nuestro caso la concentración de iones es mayor (10 mM) y por tanto es de esperar un valor de la densidad de carga superficial más negativo.

3.6 Conclusiones

En este capítulo se ha llevado a cabo por medio de espectroscopía de fuerzas (FS) la diferenciación de moléculas individuales tan similares morfológicamente que resultan indistinguibles topográficamente. Estas moléculas son avidina y estreptavidina que se encuentran ancladas a una bicapa lipídica biotinilada. El principio de diferenciación se basa en su distinta carga superficial. La avidina es una glicoproteína cargada positivamente, mientras que la estreptavidina es una proteína prácticamente neutra a $pH 7$. La diferencia de carga que presentan ambas moléculas se ha podido determinar con AFM adquiriendo las curvas de fuerzas frente a distancia (FZ) simultáneamente con la topografía de la muestra. Estas curvas de fuerza presentan notables diferencias cuando se miden sobre cada proteína, así como sobre el sustrato, debido a la interacción electrostática.

Los resultados obtenidos muestran que ambas proteínas están cargadas negativamente, aunque esperábamos que la avidina presentara carga positiva y la estreptavidina neutra. Atribuimos estos valores inesperados de la densidad superficial de carga de las proteínas a los iones presentes en la disolución y a la compleja interacción de las proteínas con la bicapa lipídica.

A pesar de que la avidina y la estreptavidina presentan el mismo signo en la densidad de carga superficial, ambas proteínas se pueden distinguir claramente, lo

cual muestra la gran sensibilidad del AFM para detectar pequeñas variaciones en la densidad de carga de moléculas individuales y por tanto pone de relieve la importancia del empleo de la espectroscopía de fuerzas para la caracterización de las propiedades electrostáticas locales de muestras biológicas en medio fisiológico.

3.7 Referencias

- [Asakawa09] H Asakawa. T, Fukuma., *Nanotechnology* **2009**, 20, 264008-264015.
- [Binnig87] G. Binnig, H., Rohrer *Rev. Mod. Phys.* **1987**, 59, 615-625.
- [Butt05] H. J. Butt, B. Cappella, M. Kappl, *Surface Sci. Rep.* **2005**, 59, 1-152.
- [Cevc90] G. Cevc, *Biochim. Biophys. Acta*, **1990**, 1031, 311-382.
- [Choi04] E. J. Choi, E. K. Dimitriadis, *Biophys. J.* **2004**, 87, 3234-324.
- [Desmeules02] P. Desmeules, M. Grandbois, V. A. Bondarenko, C. Salesse, *Biophys. J.* **2002**, 82, 3343-3350.
- [Engel97] A. Engel, C. A. Schoenenberger, D. J. Muller, *Curr. Opin, Struct, Biol.* **1997**, 7, 279-284.
- [Ferber11] Ferber U. M., Kaggwa G., Jarvis S. P., *Eur. Biophys. J.* **2011**, 40, 329-338.
- [Heinz99] W. F. Heinz, J. H. Ho, *Biophys. J.* **1999**, 76, 528-538.
- [Horcas07] I. Horcas, R. Fernandez, J.M. Gómez-Rodríguez, J. Colchero, J. Gómez-Herrero, A. M. Baró, *Rev Phys. Instrum.* **2007**, 78, 013705.
- [Israelachvili91] J. Israelachvili, *Intermolecular and surface forces, 2nd ed.*, Academic Press, London, **1991**.

- [Jung98] T. A. Jung, F. J. Himpsel, R. R. Schlittler , J. K. Gimzewski, *Scanning Probe Microscopy, Analytical methods*, Springer-Verlag, Berlin, **1998**.
- [Laney97] D. E. Laney, R. A. Garcia, S. M. Parsons, H. G. Hansma, *Biophys. J.* **1997**, 72, 806-813.
- [Leckband94] D.E. Leckband, F.J. Schmitt, J.N. Israelachvili, W. Knoll, *Biochemistry.* **1994**, 33, 4611-4624.
- [Lobo99] R. F. M. Lobo, M. A. Pereira-da-Silva, M. Raposo, R. M. Faria, Jr. O. N. Oliveira, *Nanotechnology* **1999**, 10, 389-393.
- [Egawa99] H. Egawa, K. Furusawa, *Langmuir.* **1999**, 15, 1660-1666.
- [Mathworks] <http://www.mathworks.es/>
- [Mingeot-Leclercq08] M. P. Mingeot-Leclercq, M. Deleu, R. Brasseur, Y. F. Dufrêne, *Nature Protocols.* **2008**, 3, 1654-1659.
- [Olympus] <http://probe.olympus-global.com/>
- [Pablo98] P. J. de Pablo, J. Colchero, J. Gómez-Herrero, A. M. Baró, *Appl. Phys. Lett.* **1998**, 73, 3300-2.
- [Qiu95] H. Qiu, Z. Liu, S. Sui, *Biophys. J.* **1995**, 68, 2493-2496.
- [Rief97] M. Rief, M. Gautel, F. Oesterheld, J. M. Fernández, H. E. Gaub, *Science* **1997**, 276, 1109-1112.
- [Savage94] M. D. Savage, G. Mattson, S. Desai, G. M. Nielander; S. Morgensen, E. J. Conklin, *Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook, 2nd ed*, Pierce, Rockford, **1994**.
- [Scheuring99] S. Scheuring, D. J. Müller, Ringler P, Heynmann J B, A.

Engel, *J. Micros.* **1999**, 193, 28-35.

[Sivasankar98] S. Sivasankar, S. Subramaniam, D. Leckband, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1998**, 95, 12961-12966.

[Sokolov06] I. Sokolov, Q. K. Ong, H. Shodiev, N. Chechik, D. James, M. Oliver, *J. Colloids Interf. Sci.* **2006**, 300, 475-481.

[Sotres08] J. Sotres, A. M. Baró, *Appl. Phys. Lett.* **2008**, 93,103903.

[Sotres10] J. Sotres, A. M. Baró, *Biophys. J.* **2010**, 98, 1995-2004.

[Weisenhorn92] A. L. Weisenhorn, F. J. Schmitt, W. Knoll, P. K. Hansma, *Ultramicroscopy* **1992**, 42, 1125-1132.

[Yang08] Y. Yang, K. M. Mayer, N. S. Wickremasinghe, J. H. Hafner, *Biophys. J.* **2008**, 95, 5193-5199.

Capítulo 4. La inversión de carga de moléculas individuales en superficies

4.1 Motivación y objetivo

Como se ha explicado en capítulos anteriores, la mayoría de las superficies adquieren una carga cuando se encuentran sumergidas en una solución electrolítica. Como consecuencia, las fuerzas electrostáticas influyen esencialmente en las interacciones que tienen lugar en este medio. Por lo tanto, el desarrollo de herramientas experimentales que analicen este proceso es, por tanto, de una crucial importancia en los estudios de procesos coloidales o biológicos.

Una superficie cargada en una solución electrolítica induce un gradiente en la concentración de los iones que le rodean de manera que la concentración se incrementa hacia la superficie. La región del medio donde se produce este gradiente de concentración se conoce como la parte difusa de la doble capa eléctrica (EDL). Cuando se aproximan dos superficies en estas condiciones, se origina una interacción debida al solapamiento de las correspondientes dobles capas, la fuerza electrostática de doble capa o fuerza EDL. Esta interacción suele ajustarse al modelo de la teoría de Poisson-Boltzmann (PB) [Israelachvili91]. Básicamente, esta teoría predice que la concentración de contra-iones aumenta exponencialmente hacia la superficie, con el fin de equilibrar las cargas. Sin embargo, el modelo PB considera la solución de electrolitos como un medio continuo, despreciando los efectos de los iones. Estos efectos suelen ser menospreciados a bajas concentraciones de electrolitos, siendo válida la teoría de PB en estas condiciones. Sin embargo, esto no es válido a una concentración alta de iones. Para superar las limitaciones de la teoría PB, se han desarrollado distintos enfoques teóricos. Estos incluyen formalismos de ecuaciones integrales [Carnie81; Lozada-Cassou82], métodos variacionales [Feller92], aproximaciones de funcionales de la densidad [Patra94], simulaciones de tipo Monte Carlo [Torrie80], así como otras teorías, modificaciones de la teoría PB. Los resultados predichos por estas teorías llevan al fenómeno de sobrecarga eléctrica (overcharging) o inversión de carga [Quesada-Pérez03], lo cual no podría inferirse en ausencia de correlaciones iónicas. En la literatura de estos términos se utilizan en una amplia variedad de contextos [Lyklema06]. Dentro de este trabajo usaremos el término de inversión de carga, refiriéndose por ello a las situaciones en donde la EDL parece contener más contra-iones que la necesaria para neutralizar la carga superficial.

Los procesos inversión de carga - no sólo han sido predichos teóricamente, sino que también se observan experimentalmente con ciertas técnicas como la electroforesis, se ha empleado, por ejemplo, sobre sistemas coloidales [Elimelech90] y biológicos [Verbich99]. Técnicas de medición de la fuerza, como el aparato de fuerza Superficie [Kékicheff93], pinzas magnéticas [Besteman07], y el Microscopio de Fuerza Atómica (AFM) [Besteman04; Besteman05].

Todos los trabajos previos sobre la inversión de la carga se han realizados en sistemas con cargas homogéneas (o, al menos, con una homogeneidad asumida). Sin embargo, la carga no puede ser distribuida uniformemente sobre una superficie. No obstante, la influencia de las heterogeneidades eléctricas en los procesos de inversión de carga permanece, en realidad, poco conocida. En los últimos años, el AFM, debido a su afilada punta, se ha convertido en una técnica de gran alcance capaz de obtener una resolución lateral de las curvas de fuerza (FS).

Una forma de realizar estas medidas es operando en el modo AFM-FS, que combina la exploración topografía lateral con mediciones de fuerza normales. Se ha demostrado recientemente que el AFM es capaz de resolver tanto la topografía y la fuerza EDL de las moléculas biológicas individuales en dimensiones del orden de nanómetros en medio líquido [Sotres08a]. Por otra parte, ajustando las curvas de fuerza experimentales obtenidas a la expresión para la fuerza EDL derivada de la teoría PB, es posible determinar la carga de la superficie efectiva de moléculas individuales de ADN [Sotres10]. En presente trabajo se ha empleado esta técnica para estudiar un sistema diferente: avidina depositada sobre mica. Curiosamente, los resultados experimentales presentados muestran que las moléculas de avidina pueden invertir su carga de superficie "efectiva" como respuesta a un cambio de la fuerza iónica en la solución del medio.

4.2 Preparación de la muestra

En este trabajo se han empleado avidina suministrado por sigma Aldrich con un 98% de pureza y con peso molecular 66,000 Dalton. Las moléculas individuales sean han obtenido incubando en una lámina de mica recién cortado (Electron Microscopy Sciences , Fort Washington , PA) una concentración de 10 ug/ml sobre una superficie de mica recién exfoliada por 10 min aproximadamente y 1,25 mg / ml para una monocapa de avidina. Finalmente se procede a lavar la muestra para eliminar cualquier avidina que se encuentre en el sobre nadante.

Para medir las fuerzas EDL en moléculas de avidina fue empleado un AFM operado en el modo de espectroscopia de fuerza. Esto se hizo con un AFM comercial (Nanotec SL, Tres Cantos, España) controlado con el software WSxM [Horcas07]. Una descripción técnica detallada del modo de funcionamiento, a partir de ahora referido como el FSI (Force Spectroscopy Imaging, imagen de espectroscopia de fuerzas), se puede encontrar [Sotres08a]. Consiste, básicamente, en sustituir la superficie de la muestra por una matriz bidimensional de puntos, en cada uno de los cuales se ha determinado un valor de altura y una curva de fuerza normal. Por lo tanto, el modo de mapeo FSI permite la obtención simultánea de la topografía y de cualquier otra magnitud que se puede obtener mediante el análisis de las curvas de fuerza. La muestra, avidina sobre mica, se considera un sistema estándar para el estudio de diferentes propiedades en los sistemas de proteína-en-superficie, unión específica [Riener03, (Sotres08b)] o distribución de carga [Leung09].

La ingeniería genética de Estrept(avidina) se ha convertido hoy en día en una herramienta avanzada en los campos de la biología moderna, la medicina y la nanotecnología [Laitinen07]. La avidina es una proteína básica con un pI de 10,5 [Savage94], mientras que la mica tiene un pI por debajo de 3 [Hartley97]. Esto implica que para valores de pH 7.4, la mica se carga negativamente, en oposición a la avidina, que se carga positivamente. Por lo tanto, en estas condiciones, la avidina se une a la superficie de la mica por fuerza electrostática. Para la preparación de la muestra se han seguido los protocolos que figuran en [Pastré10]. Como sensores, se han utilizado puntas de nitruro de silicio con una constante fuerza nominal de 30 pN nm⁻¹, adquiridas a Veeco (MLCT-AUMT-A, Veeco Probes, Camarillo CA).

4.3 Resultados

En la siguiente figura. (4.1) se representan las curvas de fuerza (Normal) adquiridas sobre una superficie de mica (Fig. 4.1a) y una monocapa de avidina (Fig. 4.1B), tanto en agua y como en tampón de fosfato 10 mM pH 7. El agua expuesta al aire es ligeramente ácida debido a la absorción de dióxido de carbono y su consiguiente conversión a ácido carbónico, lo que resulta un pH de ~ 6. A pesar de la controversia que existe sobre la carga superficial de puntas de nitruro de silicio, se acepta que su pI es inferior a 6 [Sokolov06].

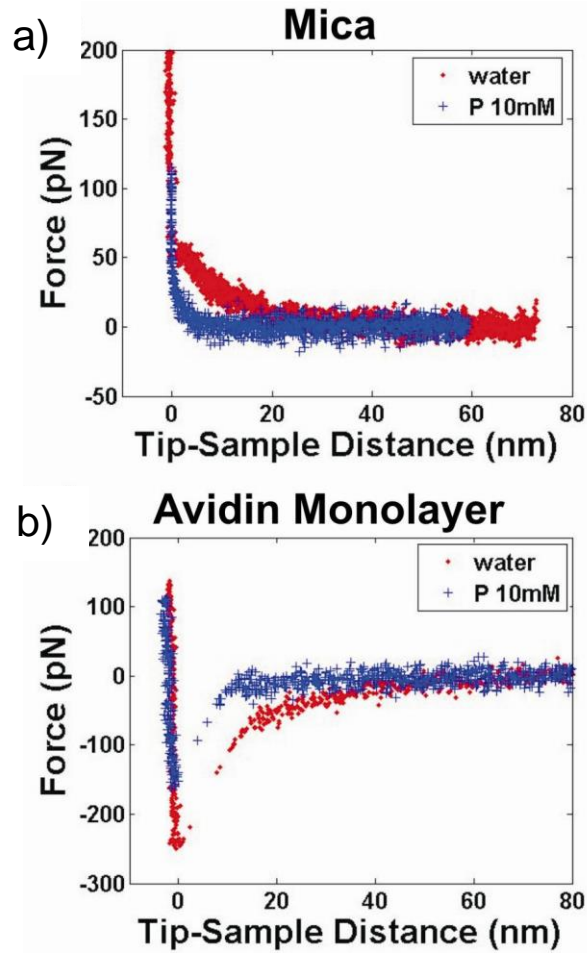


Figura 4.1 Curvas de Fuerza Normal realizadas con un punta de Si3N4 en agua y en tampón de fosfato de sodio 10mM a pH 7 (P10mM) a) en la superficie de mica limpia y b) en la monocapa de avidina

Por consiguiente, tanto en agua como en el tampón fosfato a pH 7, la superficie de mica y la punta de nitruro de silicio, están cargadas negativamente, mientras que las moléculas de avidina están cargados positivamente. En todas las curvas en la figura. 4.1 se observa una fuerza exponencial de largo alcance. Esta fuerza muestra similitudes con la fuerza EDL predicha por la teoría PB bajo la aproximación Derjaguin, FEDL. Para una punta esférica interactuando con una superficie plana, debe emplearse la aproximación dada por [Israelachvili91].

$$F_{EDL}(D) = F_0 \cdot e^{\frac{-D}{\lambda_D}} \quad 4.1$$

$$F_0 = \frac{4\pi R_p \sigma_p \sigma_m \lambda_D}{\epsilon \epsilon_0} \quad 4.2$$

$$\lambda_D = \left(\frac{\epsilon \epsilon_0 k_B T}{e^2 \sum_i c_i z_i^2} \right) \quad 4.3$$

En estas ecuaciones, F_0 es la amplitud de la fuerza de EDL, D es la separación entre punta y muestra, λ_D es la interacción de la longitud de decaimiento también conocida como la Longitud de Debye, ϵ es la constante dieléctrica del medio, ϵ_0 la permitividad del vacío, σ_s y σ_m son respectivamente la densidad de carga superficial de la punta y de la muestra, R_p es el radio de la punta, $k_B T$ es el factor de Boltzmann, c_i y z_i son la concentración y la valencia de cada i -ésimo tipo de ión presente en la solución y e la carga del electrón.

Es importante señalar que λ_D está inversamente relacionada con la fuerza iónica de la solución. A pesar de todas las aproximaciones asumidas para derivar esta ecuación [Israelachvili91] describe con bastante exactitud las características más destacadas de las medidas empíricas de la fuerza EDL mostradas en la figura. 4.1. En primer lugar, el signo de las fuerzas de largo alcance está de acuerdo con la deducida a partir de la ecuación. 4.1. De hecho, la fuerza es repulsiva para superficies con carga similar (punta de nitruro de silicio con la superficie de la mica. Fig. 4.1a), y atractivo para aquellos casos con carga opuesta (monocapa de avidina con la punta de nitruro de silicio. Fig. 4.1b). En la ecuación. 4.1 se predice también el comportamiento de la amplitud de la fuerza F_0 y de λ_D . Éstas tiene valores más altos en agua (baja fuerza iónica) que en tampón de fosfato (fuerza iónica alta). De este modo, se pueden comparar las medidas de longitud de Debye con los datos esperados, a partir de los ajustes exponenciales las curvas de fuerza (Fig. 4.1). En el agua, la longitud de Debye fue de $(11,3 \pm 1,5)$ nm y de (15 ± 3) nm respectivamente, en la mica y en la monocapa de avidina.

Los valores medidos de la longitud de Debye en el tampón de fosfato de 10 mM concuerdan con lo esperado $\lambda_D=2.4$ nm en esta solución de electrolitos. Sin embargo, no se correlaciona igual para el agua, asumiendo que la concentración de ácido carbónico es de 10^{-5} M, ya que se esperaría un valor de $\lambda_D \sim 96$ nm, que es claramente mayor que el obtenido experimentalmente. En otros estudios se han registrado valores similares [Butt91]. Esta diferencia puede deberse a factores característicos de grandes longitudes, puesto que a grandes separaciones es difícil distinguir la fuerza de decaimiento de la línea de fuerza nula. Estos resultados sugieren que es posible utilizar la aproximación de Poisson-Boltzmann, porque se ajusta razonablemente a las curvas de fuerza experimental (Fig. 4.1).

A continuación se analiza una superficie no homogénea donde se encuentran distribuidas algunas moléculas de avidina (con una cobertura superficial $\leq 0,5$ monocapa) absorbida en la superficie de la mica. El interés consiste en conocer la

distribución de EDL de iones alrededor de la molécula. El estudio de las fuerzas EDL en moléculas individuales de avidina adsorbidas sobre la mica se ha realizado empleando el modo FSI del AFM.

Las Figuras 4.2a y 4.2d muestran imágenes topográficas de las muestras de avidina en agua y en el tampón fosfato 10 mM pH 7, respectivamente. Ambas imágenes presentan formas similares distribuidas en la superficie de la mica. Los valores de la altura media (h) y del ancho (w) de las moléculas de avidina son $h_{\text{agua}} = 5 \pm 0,3 \text{ nm}$ $w_{\text{agua}} = 29 \pm 5 \text{ nm}$ en agua y $h_f = 4.7 \pm 0.6 \text{ nm}$ y $w_f = 36 \pm 5 \text{ nm}$ en el tampón fosfato.

Los valores de altura están de acuerdo con el diámetro nominal de las moléculas de avidina individuales de $\sim 5 \text{ nm}$ [Rosano99], y también con la altura medida por AFM en trabajos anteriores [Sotres07]. Los valores de anchura, aunque más grande que los esperados para moléculas individuales, se pueden explicar por los efectos de convolución de la punta. Por lo tanto, las moléculas observadas pueden atribuirse a proteínas de avidinas individuales.

En un trabajo reciente se ha propuesto un modelo simplificado para estudiar cuantitativamente las fuerzas EDL en moléculas individuales adsorbidas [Sotres10]. Este modelo se basa, en primer lugar, en la validez de la teoría de la PB, y en segundo lugar en la superposición lineal de las contribuciones a la fuerza EDL total entre punta-sustrato y punta-molécula. Dentro de este modelo, la fuerza EDL sobre el sustrato y sobre las moléculas puede ser descrita por una función que decae exponencialmente con la distancia punta-sustrato, D_{ps} , y con λ_D como la longitud de decaimiento, de manera que $F_{edl}(d_{ps}) = F_{t0} \cdot \exp(-d_{ps}/\lambda_D)$, donde F_{t0} es la amplitud de la fuerza total y λ_D es la longitud de Debye. Por lo tanto, es útil convertir las curvas de fuerza a curvas de fuerza frente a la distancia entre la punta y el sustrato $F(d_{ps})$.

Esto se realiza desplazando el punto de contacto de la curvas de fuerzas frente a la distancia medidas experimentalmente por el valor de la altura correspondiente de la imagen de la topográfica (asumiendo como cero la altura del sustrato).

Si suponemos (como ya hemos justificado) que las fuerzas EDL dominan la interacción entre la punta y la muestra, los dos parámetros F_{t0} y λ_D se pueden obtener mediante el ajuste de las curvas a la descrita función exponencial. En las

zonas del sustrato limpio las moléculas no contribuyen a la fuerza ejercida sobre la punta. Por lo tanto, en este caso, la amplitud de la fuerza EDL F_{t0} es la misma que la interacción pura entre la punta y el sustrato, F_{ps0} . Sobre la molécula, F_{t0} será la suma de la amplitud de la fuerza del sustrato, F_{ps0} , y un segundo término debido a la fuerza EDL entre la punta y la molécula, F_{pm0} , por lo que $F_{t0} = F_{ps0} + F_{pm0}$. En analogía con la amplitud de la fuerza de la ecuación. 4.1, F_{pm0} es proporcional a las densidades de carga de la superficie de la sonda, σ_p , y de la molécula, σ_m . Como consecuencia, para separaciones similares entre la punta y el sustrato, las fuerzas EDL deben ser más repulsivas cerca de una molécula que lejos de ella, siempre que la molécula y la punta con una carga superficial parecida. Por el contrario, si la carga superficial es opuesta, debe observarse una fuerza de atracción.

Las curvas de la Fuerza medidas experimentalmente en el modo FSI se transformaron a curvas $F(d_{ps})$ de acuerdo con el esquema anterior, obteniendo los resultados descritos en las Figuras 4.2a y 4.2d correspondientes a la topografía, y en las figuras 4.2b y 4.2e correspondientes a las curvas de fuerza. En lo que sigue vamos a distinguir mica y avidina por los colores rojo y azul, respectivamente.

Las curvas $F(d_{ts})$ se ajustaron posteriormente a las funciones exponenciales descritas para la obtención de valores de F_{t0} y λ_D para cada punto de la superficie registrado. En estos ajustes sólo se han considerado las curvas de fuerzas entre punta y muestra a partir de 2 nm, para evitar las interacciones de vdW. Para la muestra medidas en agua (Figuras 4.2a y 4.2b), se obtuvieron los valores del ajuste $F_{t0} = (68 \pm 7)$ pN y $\lambda_D = (11,0 \pm 1,0)$ nm para la zona del sustrato de mica limpias, mientras que para las moléculas de avidina se obtuvieron valores $F_{t0} = (57 \pm 5)$ pN y $\lambda_D = (12,3 \pm 0,8)$ nm.

Se puede observar la gran similitud entre los valores de λ_D en las moléculas de avidina y en el del sustrato, aunque valores más pequeños que los esperados a partir de la teoría PB, similares a los medidos en muestras cargadas homogéneamente en agua (Fig. 4.1). Como se ha comentado anteriormente, esta discrepancia no implica necesariamente el fracaso de la teoría PB, puesto que esta diferencia puede atribuirse a errores en la metodología de ajuste. Con respecto a las amplitudes de las fuerzas, son notablemente más bajas cuanto más cerca se encuentren de las moléculas.

Los resultados en el medio tampón fosfato 10 mM a pH 7 son, por el contrario, completamente diferentes. En este caso, los datos reportados en las

figuras 4.2d y 4.2e, son similares a las figuras 4.2a y 4.2d, excepto que el electrolito produce una concentración de absorción significativamente diferente. Las curvas de fuerza que pertenecen a la misma medida en el modo FSI, como la topografía (fig. 4.2d), también se convirtieron a $F(d_{ps})$ representada en la figura 4.2e y se ajustaron a las funciones exponenciales. En este caso, los valores de $F_{t0} = (120 \pm 22)$ pN y $\lambda_D = (3,5 \pm 0,6)$ nm se obtuvieron en una zona de la mica limpia, mientras que sobre las moléculas se obtuvieron los valores de $F_{t0} = (233 \pm 66)$ pN y $\lambda_D = (3,5 \pm 0,4)$ nm.

Es importante darse cuenta de que los valores de λ_D fueron aproximadamente iguales en todas las partes de la muestra. Una vez más, estos valores coinciden con los medidos en las muestras con cargas homogéneas en la misma solución tampón (fig. 4.1). Por otra parte, la λ_D medida concuerda con la predicha por la teoría PB para una fuerza EDL.

No obstante, las fuerzas registradas cerca de las moléculas de avidina son más repulsivas. Esto está en contraste con las medidas realizadas en agua, donde las fuerzas de cerca de las moléculas de avidina son más atractivo.

Los Mapas Iso-distancia constituyen una forma ilustrativa del mapeo de la distribución de las fuerzas EDL en las superficies. Están construidas a partir de las medidas en el modo FSI mediante la representación de la fuerza normal en cada punto de la muestra, a una distancia dada desde un plano base (que en el caso de las moléculas adsorbidas se elige generalmente el sustrato) [Sotres08].

La figura. 4.2c muestra un mapa de equidistancia, para $d_{ps} = 8$ nm, de los mismos datos experimentales, como en las figuras. 4.2a y 4.2d, pero en esta ocasión de moléculas de avidina adsorbidas sobre la mica en medio acuoso. En este mapa, todas las moléculas de avidina se resuelven claramente (mostrando una resolución similar a la alcanzada en la topografía), con una disminución de la fuerza en las zonas ocupadas por las moléculas.

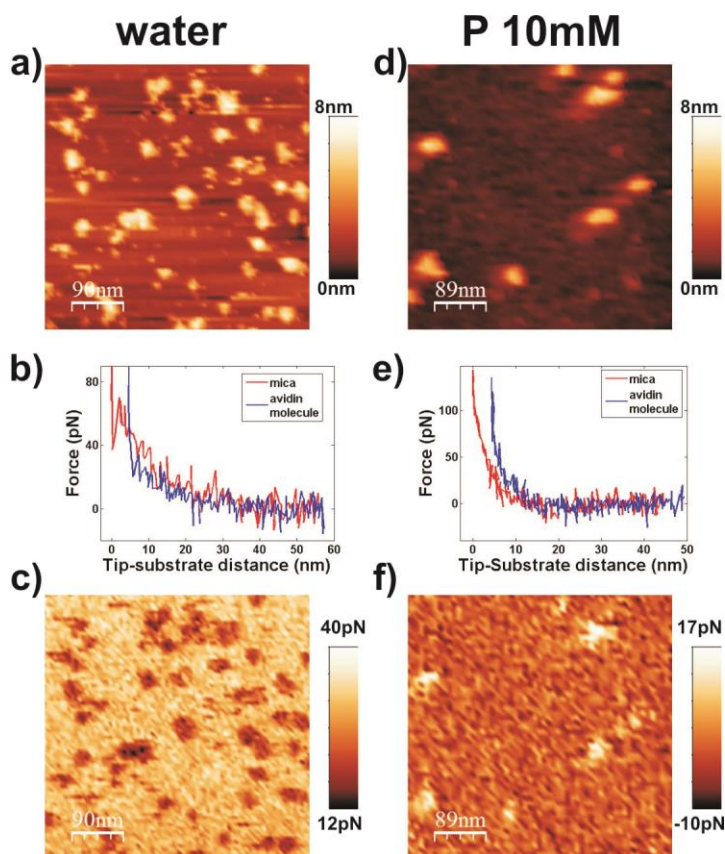


Figura 4.2 A) imagen de la topografía, obtenida mediante el AFM en el modo de FSI, de moléculas de avidina adsorbidas sobre un sustrato de mica en agua. b) Curva de fuerza distancia entre la punta y el sustrato, correspondiente a la misma medida FSI como la topografía en una a). Las curvas corresponden a una zona limpia de la mica (curva roja) y una molécula de avidina (curva azul). C) Mapa de Iso - distancia, fueron calculados del mismo archivo FSI, a) y b), que representan las fuerzas ejercidas sobre la punta mientras se aproximaba al sustrato de mica a 8 nm. d) Imagen de topografía, obtenida por AFM en el modo de FSI, de moléculas de avidina adsorbidas sobre mica en tampón de fosfato de sodio mM pH 7 10 (P10mm). e) Curvas de fuerza distancia entre la punta y el sustrato, correspondiente a la misma medida FSI, d) la imagen topografía. Una vez más, las curvas corresponden a una zona limpia de la mica (curva roja) y a una molécula de avidina (curva azul). f) mapa Iso - distancia, calculada para el mismo archivo FSI como d) y e), que muestra la fuerza ejercida sobre la punta mientras se aproximaba al sustrato de mica a 8 nm.

Este resultado está de acuerdo con el obtenido a partir del análisis de las curvas $F(d_{ps})$, lo que confirma que las moléculas de avidina contribuyen con un término atractivo a la fuerza total entre punta y muestra. Una vez más, se encuentra un comportamiento completamente diferente cuando la muestra es medida con el

tampón fosfato 10 mM pH 7. La figura. 4.2f muestra un mapa de equidistancia, para $d_{ps} = 8$ nm, obtenidas simultáneamente en que las figuras. 4.2d y 4.2e, que son moléculas de avidina adsorbidas en tampón fosfato. En este caso, las moléculas se resuelven, pero en contraste la figura 4.2b la fuerza de repulsión es mayor sobre las moléculas de avidina que sobre mica.

Por lo tanto, cuando las moléculas de avidina están rodeadas de una solución fosfato de 10 mM, contribuyen con un término repulsivo a la fuerza total entre la punta y la muestra. Los datos presentados muestran que las moléculas aisladas de avidina adsorbidas sobre un sustrato de mica ejercen una fuerza de largo alcance sobre la punta de nitruro de silicio. Esta fuerza invierte su signo desde negativo (atractiva) cuando se mide en agua a positivo (repulsiva) cuando la sal de fosfato de sodio se introduce en la medida.

4.5 Discusión

Los datos experimentales se han analizado mediante la teoría de la PB. Sin embargo, los valores de fuerza medidos no corresponden a los esperados de la teoría PB. Esta teoría afirma que la amplitud de la fuerza de EDL depende directamente del producto de las densidades de carga superficies que interactúan, que son los parámetros que determinan el signo de la fuerza (4-1). Por lo que dos superficies con cargas opuestas provocan una atracción en las fuerzas de EDL. Este comportamiento se observa en las medidas realizadas en agua entre la punta con carga negativa y las moléculas de avidina con carga positiva, ya sea tanto moléculas individuales o en forma de monocapa sobre la superficie de la mica. Cuando se realizaron las medidas sobre las monocapas de avidina con un tampón de fosfato sódico 10mM a pH 7, se observó una atracción de la punta por las moléculas de avidina. Tal cosa es de esperar, ya que la variación del pH de la solución no es suficiente como para inducir un cambio en el signo de cargas superficiales que interactúan. Pero en la muestra donde se presentan las moléculas de avidina aislada en la superficie de la mica en medio fosfato de sodio, las moléculas de avidina ejercen una fuerza contra-intuitiva repulsiva en la punta (figuras 4-1 y 4-2).

También hemos llegado a la conclusión, en base a la discusión sobre las fuerzas de interacción, que éstas son exclusivamente de origen electrostático. Por otra parte, si tenemos en cuenta que la teoría PB es válida, la única posibilidad que está de acuerdo con (4-1) es que la avidina invierte el signo de su carga en una solución de tampón fosfato.

El esquema anterior está soportado por estudios teóricos de la inversión de la carga reportados por Attard [Attard95]. Demostró que la inversión carga tiene un comportamiento asintótico de potenciales electrostáticos (y por lo tanto la de fuerzas) similar a la procedente a la teoría PB. Por lo tanto, expresiones derivadas de la teoría PB se pueden utilizar para ajustar las fuerzas de EDL medidas en muestras con inversión de carga (como se hace en este trabajo). Sin embargo, en este caso las cargas superficiales en las expresiones de fuerza representan no sólo los valores reales de la carga superficial, sino también las interacciones entre los iones alrededor. El uso de estos parámetros permite tratar la inversión de carga de una manera más intuitiva, ya que en virtud de este proceso, el signo de las cargas superficial efectiva cambia.

Como se indica en la introducción, los procesos de inversión de carga se asocian en general a las altas concentraciones de iones. En una primera vista se puede considerar que en este caso es diferente ya que hemos observado que a concentraciones bajas de fosfato de sodio 10 mM que en la solución corresponde a $[Na^+] = 10$ mM, $[H_2PO_4^-] \approx 6,2$ mM y $[HPO_4^{2-}] \approx 3,8$ mM. Sin embargo, se tiene que tener en cuenta que las avidinas se adsorben sobre una superficie, donde la concentración de iones es mucho mayor. Considérese, como un ejemplo, una superficie con densidad de carga de 2 E-NM^{-2} (que es el valor nominal para la mica [Hansma96]) sumergido en una solución con una concentración de contra-iones monovalentes de 10 mM. De la teoría de PB, se deduce que la concentración de contra-ión en la superficie sería $\sim 29,8 \text{ M}$ [Israelachvili91].

Por lo tanto, incluso para bajas concentraciones de electrolitos, la presencia de superficies cargadas proporciona un aumento de la concentración de iones en las regiones cerca de la superficie. Esto es más importante cuando se trata con una biomolécula aislada como una proteína. La irregularidad de su estructura en los niveles subnanométricos aumenta aún más la relación entre superficie y volumen. En el caso de una única monocapa, este efecto se reduce debido a que la superficie expuesta a los iones es mucho menor. Esto podría explicar por qué no se produce el efecto de la carga inversa cuando la avidina está presente en forma una monocapa.

La teoría de PB predice que la concentración de iones de carga opuesta conlleva a una compensación de las cargas. Sin embargo la teoría de PB ignora la carga entre los iones. Esta hipótesis podría ser razonable en las concentraciones de iones suficientemente bajos. Pero, como hemos argumentado en el párrafo anterior, tenemos una concentración alta de iones alrededor de la biomolécula. Ésta es una de

las condiciones que conduce normalmente a la sobrecarga [Lyklema06] llamadas también inversión de carga.

Ahora, considérese un objeto pequeño (la molécula de avidina), con un tamaño similar a la longitud de Debye, colocado cerca de una superficie de carga opuesta.

Los contra-iones que forman la EDL del objeto pueden ser imaginados como un "océano" denso de iones de carga opuesta (aquellas que forman la EDL de la superficie). Se espera que en esta situación se producirán interacciones fuertes entre los iones de los diferentes EDL. Éste es exactamente el caso en este experimento.

En la solución de fosfato de sodio las EDLs del sustrato de mica y de la punta de nitrato de silicio se forman principalmente por iones de sodio positivos, mientras que el EDL alrededor de las moléculas de avidina se forma principalmente por iones fosfato negativos, monovalentes y divalentes. Ambos tipos de iones son, muy probablemente, sometidos a interacciones fuertes en las proximidades de la frontera entre las moléculas y el sustrato.

La existencia de una fuerza EDL repulsiva entre la punta y la molécula implica que hay una región alrededor de las moléculas que contienen iones de sodio que se solapan principalmente en las medidas de fuerza con los iones de sodio similares que rodean la punta. Por lo tanto, parece que, como consecuencia de estar inmerso en el "océano" de iones de sodio que cubren la mica, los iones fosfato alrededor de la molécula son eventualmente cubiertos por una capa más pequeña, y, por lo tanto, los iones de sodio son más móviles. Esta hipótesis está apoyada por la ausencia de inversión de carga cuando la mica está totalmente cubierta por avidina, puesto que en este caso la cantidad de iones de sodio en el EDL de la muestra es mínima. El estudio de los mecanismos específicos de la inversión de carga en el caso de biomoléculas aisladas, la dependencia de la cobertura y la composición de iones está fuera del alcance del presente trabajo. Esto habría requerido una serie exhaustiva de experimentos en diferentes soluciones de electrolitos con el fin de determinar el papel de cada tipo de iones.

4.6 Conclusiones

Es importante determinar el origen de la fuerza que conduce a la inversión de carga eléctrica. La interacción total entre dos superficies debe incluir las fuerzas de van der Waals y de doble capa (fuerzas DLVO) que actúan conjuntamente. La atracción de Van der Waals siempre se debe a la repulsión EDL a distancias suficientemente

pequeñas. No obstante, a partir de los datos experimentales puede verse que las fuerzas de van der Waals son insignificantes en comparación con los valores de EDL para distancias mayores a 2 nm, quedando por tanto las fuerzas debidas a la doble capa como las únicas principales responsables de la inversión de carga eléctrica.

Se ha estudiado, mediante la resolución espacial de la espectroscopia de fuerzas la denominada doble capa electrostática (EDL), el cambio de carga eléctrica de moléculas individuales de avidina (4 nm de tamaño) depositadas sobre mica. Se consigue alcanzar una resolución suficiente para detectar moléculas individuales de avidina, tanto en topografía de AFM como en fuerza de EDL. Cuando son analizadas en agua, las moléculas de avidina se comportan del modo esperado de acuerdo con su pI de 10.5, es decir, como si estuvieran cargadas positivamente. Por el contrario, cuando se caracterizan en disolución tampón de fosfato a pH de 7, las moléculas se comportan como si su carga se hubiera invertido. Por tanto, para poder entender los mecanismos responsables del fenómeno de sobrecarga (overcharging), este trabajo presenta interesantes datos experimentales. Más aún, los resultados sugieren que es precisamente esta técnica experimental la más conveniente para estudiar este mecanismo. Finalmente, los resultados proporcionan una manera de controlar externamente el signo de las fuerzas EDL en dominios nanométricos (aquellos delimitados por las posiciones ocupadas por las moléculas).

En conclusión, la sobrecarga en una superficie carga de faltas de homogeneidad (biomoléculas aisladas de tamaño nano) se demostró experimentalmente. Esto se realizó con un AFM operado en el modo de espectroscopia de fuerza, de modo que también se demostró la idoneidad de la técnica para el estudio de carga de inversión. Mientras que el modelo teórico de los mecanismos detrás de los resultados experimentales no se ha abordado, creemos que pueden ayudar a una mejor comprensión del fenómeno de la inversión de la carga. Por último, nuestros datos ofrece una forma de controlar externamente un estado binario (siendo más o menos repulsivo que la fuerza de fondo) de las moléculas adsorbidos sobre un sustrato. No es difícil pensar que los datos presentados en este trabajo abren una amplia gama de aplicaciones, desde los biosensores para el control y almacenamiento de información.

4.7 Referencias

- [Attard95] Attard, P. J. Phys. Chem. 1995, 99, 14174-14181.
- [Besteman04] Besteman, K.; Zevenbergen, M.A.G.; Heering H.A.; Lemay, S.G. Phys. Rev. Lett. 2004, 93, 170802.
- [Besteman05] Besteman, K.; Zevenbergen, M.A.G.; Lemay, S.G. Phys. Rev. E 2005, 72, 061501.
- [Besteman07] Besteman, K.; van Eijk, K.; Lemay, S.G. Nat. Phys. 2007, 3, 641-644.
- [Bhuiyan81] Bhuiyan, L.B.; Outhwaite, C.W.; Levine, S. Mol. Phys. 1981, 42, 1271-1290.
- [Butt91] Butt, H.J. Biophys. J. 1991, 60, 1438-1444.
- [Butt99] Butt, H-J; Kappl M.; Mueller H.; Raiteri R; Meyer W; R uhe J, Langmuir 1999, 15, 2559-2565
- [Carnie81] Carnie, S.L.; Chan, D.Y.C.; Mitchell, D.J.; Ninham, B.W. J. Chem. Phys. 1981, 74, 1472-1478.
- [Dorovantu09] Dorovantu L.S., Bhattacharjee S, Foght JM, Gray MR. Langmuir 2009, 25, 6968-6976 .
- [Elimelech90] Elimelech, M.; O'Melia., C.R. Colloids Surf. 1990, 44, 165-178.
- [Feller92] Feller, S.E.; McQuarrie, D.A. J. Phys. Chem. 1992, 96, 3454-3457.
- [Hansma96] Hansma, H.G.; Laney, D.E. Biophys. J. 1996, 70, 1933-1939.
- [Hartley97] Hartley, P.G.; Larson, I.; Scales P.J. Langmuir 1997, 13, 2207-2214.

- [Horcas07] Horcas, I.; Fernandez, R.; Gomez-Rodriguez, J.M.; Colchero, J.; Gomez-Herrero, J.; Baró, A.M. *Rev. Sci. Instrum.* 2007, 78, 013705.
- [Israelachvili91] Israelachvili, J. 1991, *Intermolecular and Surface Forces* 2nd Ed. Academic Press, London.
- [Kékicheff93] Kékicheff, P.; Marcelja, S.; Senden, T.J.; Shubin, V.E. *J. Chem. Phys.* 1993, 99, 6098-6113.
- [Laitinen07] Laitinen, O.H., Nordlund, H.R., Hytönen, V.P., Kulomaa, M.S. *Trends in Biotech.* 2007, 25, 269-277
- [Leung09] Leung, C.; Kinns, H.; Hoogenboom, B.W.; Howorka, S.; Mesquida, P. *Nano Lett.* 2009, 9, 2769-2773.
- [Lozada-Cassou82] Lozada-Cassou, M.; Saavedra-Barrere, R.; Henderson, D. *J. Chem. Phys.* 1982, 77, 2821-2827.
- [Lyklema06] Lyklema, J. *Colloids Surf. A* 2006, 291, 3-12.
- [Quesada-Pérez03] Quesada-Pérez, M.; González-Tovar, E.; Martín-Molina, A.; Lozada-Cassou, M.; Hidalgo-Álvarez, R. *ChemPhysChem* 2003, 4, 234-248.
- [Pastré10] Pastré D, Hamon L, Sorel I, Le Cam E, Curmi P. A., Piètrement O. *Langmuir* 2010, 26, 2618-2623
- [Patra94] Patra, C.N.; Ghosh, S.K. *J. Chem. Phys.* 1994, 100, 5219-5229.
- [Riener03] Riener, C.K., Stroh, C.M., Ebner, A., Klampfl, C. Gall, A.A., Romanin, C. , Lyubchenko, Y.L. , Hinterdorfer, P. , Gruber, H.J. *Anal. Quim. Acta* 2003, 479, 59-75
- [Rijnaards99] Rijnaards H.H.M., Norde W., Lyklema J., Zehnder A.J.B.

Colloids and Surf. B: Biointerfaces 1999, 14, 179-195

- [Rosano99] Rosano, C.; Arosio, P.; Bolognesi, M. *Biomol. Eng.* 1999, 16, 5-12.
- [Savage94] Savage, M.D.; Mattson, G.; Desai, S.; Nielander, G.M.; Morgensen, S.; Conklin, E.J. 1994, *Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook*, 2nd ed., Pierce, Rockford.
- [Sokolov06] Sokolov, I.; Ong, Q.K.; Shodiev, H.; Chechik, N.; James, D.; Oliver, M. J. *Colloids Interf. Sci.* 2006, 300, 475-481.
- [Sotres07] Sotres, J.; Lostao, A.; Gómez-Moreno, C.; Baró, A.M. *Ultramicroscopy* 2007, 107, 1207-1212.
- [Sotres08a] Sotres, J.; Baró, A.M. *Appl. Phys. Lett.* 2008, 93, 103903.
- [Sotres08b] Sotres, J.; Lostao, A.; Wildling, L.; Ebner, A.; Gómez-Moreno, C.; Gruber, H.J.; Hinterdorfer, P.; Baró, A.M. *ChemPhysChem* 2008, 9, 590-599.
- [Sotres10] Sotres, J.; Baró, A.M. *Biophys. J.* 2010, 98, 1995-2004.
- [Torrie80] Torrie, G.M.; Valleaus, J.P. *J. Chem. Phys.* 1980, 73, 5807-5816.

Capítulo 5. Aplicación del modo AC-DAFM al estudio de muestras con carga heterogénea evitando el contacto mecánico

5.1 Motivación y objetivo

Como se ha expuesto en los capítulos anteriores, el AFM es una técnica imprescindible para el estudio de moléculas biológicas. Las muestras biológicas son moléculas blandas y generalmente están poco adheridas al sustrato, por lo que uno de los grandes retos es minimizar el contacto mecánico entre la punta y la muestra. En AFM se han desarrollado numerosas técnicas con esta finalidad.

Una de estas técnicas, es el modo Jumping (capítulo 2), Con este modo se puede barrer la muestra con la punta a una distancia tal que la interacción principal entre la punta y la muestra sea una fuerza electrostática constante. Este modo de medida es ideal para minimizar el contacto entre la punta y la muestra en regiones siempre repulsivas de la doble capa eléctrica. Ha sido empleada con éxito en numerosas muestras biológicas, como agregados de moléculas anfifílicas [Manne94], membrana púrpura extracelular [Muller99], bicapa de lípidos [Johnson03] y proteínas como la avidina [Sotres07]. Sin embargo, este modo de medida tiene como requisito que todo el sistema debe tener el mismo signo de interacción, si la muestra o la punta invierten la carga en la superficie, se produce un cambio de signo en la interacción entre ambas, dando lugar aun salto al contacto mecánico entre la punta y la muestra. Esto se debe a que no es posible establecer un punto de retroalimentación ya que la pendiente de las curvas de interacción (fuerza normal frente a distancia) es diferente para cada dominio de carga (interacción atractiva o repulsiva). Lo mismo ocurre para el modo dinámico con modulación en frecuencia, ya que la pendiente de las curvas de frecuencia (señal de realimentación) cambian de pendiente para una zona de interacción atractiva o repulsiva.

No obstante, en la fijación al sustrato de muestras biológicas, comúnmente se utilizan métodos de interacción electrostática, induciendo distintos regímenes electrostáticos. Por lo tanto, sería conveniente encontrar un modo de medida más adecuado que el modo Jumping para estos sistemas biológicos compuestos por diferentes dominios de carga locales (muestras "heterogéneas" electrostáticamente). El modo de amplitud constante (AC-DAFM) puede ser una buena alternativa para

obtener imágenes de AFM de muestras con carga heterogénea. Además, con este modo de medida se obtienen informaciones adicionales como la fase y la fuerza.

El objetivo de este capítulo consiste en mostrar que el CA-DAFM es capaz de optimizar la adquisición de imágenes de muestras biológicas con distintos regímenes de interacción en medio fisiológico, al minimizar el contacto mecánico entre punta y muestra, obteniendo información electrostática de nuestro sistema. Este método, en el que una micropalanca rígida se hace oscilar cerca de su frecuencia de resonancia con una amplitud de 1-2 nm, permite la investigación altamente fiable de las biomoléculas con las fuerzas normales y laterales minimizadas entre la punta y la muestra.

5.2. Introducción

En el modo dinámico el fleje puede considerarse como un oscilador amortiguado forzado sometido a fuerzas de interacción entre la punta y la muestra (F_{pm}). Sin tener en cuenta efectos de torsión, por simplicidad, se obtiene la ecuación diferencial siguiente que describe su movimiento:

$$m\ddot{z} + \gamma_c \dot{z} + k_c z = F_0 + F_{pm} \quad 5.1$$

Donde z es el desplazamiento vertical del cantiléver, $k_c = m\omega_0^2/Q$ es la constante de fuerza del cantiléver, m es la masa efectiva total, γ_c es la constante que describe la amortiguación total del fleje más la interacción, $F_0 = F \cos(\omega_0 t)$ es la fuerza periódica de excitación externa, y $F_{pm}(z)$ engloba todo el conjunto de fuerzas que interaccionan entre la punta y la muestra.

Despreciando la fuerza F_{pm} , la solución viene dada por la expresión.

$$z(t) = A \cos(\omega_0 t + \phi) \quad 5.2$$

Donde $A = \frac{F_0}{\sqrt{(k - m\omega_0^2)^2 + \gamma_c^2 \omega_0^2}}$ es la amplitud, $\omega_0 = 2\pi f_0$ es la frecuencia y $\phi = \tan^{-1} \left(\frac{\omega_0 \gamma_c}{k - \omega_0^2 m} \right)$ es la fase. Por lo tanto, el movimiento del fleje oscilante contiene cuatro parámetros: la amplitud, la fuerza, la frecuencia, y la diferencia de fase entre la excitación y la oscilación.

Como hemos visto anteriormente en el modo dinámico de amplitud constante se presentan, principalmente, la amplitud de oscilación del fleje (A) y el desfase (ϕ) entre la oscilación y la excitación de la micropalanca. Ambas magnitudes dependen

de la interacción y por tanto varían según la distancia entre punta y muestra y según los efectos de adhesión viscoelástica. Un funcionamiento estable requiere una amplitud suficiente para tirar de la punta de interacciones atractivas (como la adhesión), por lo que se requiere que $(\partial F_{pm}/\partial z)^{\max} < k$.

Una forma de obtener información mediante el AFM son las denominadas curvas de amplitud/fase frente a distancia, que se obtienen por el mismo procedimiento que en el modo estático. En dichas curvas, se realiza un proceso de aproximación y alejamiento de la punta y la muestra, mientras se registran los valores de amplitud y fase para cada valor de distancia recorrida por el piezo. Los modos de imagen también se pueden pensar en términos de las fuerzas entre la punta y muestra. En general, cuando dos objetos se unen, en el rango de largo alcance las fuerzas son atractivas, y la fuerza se convierte en repulsiva cuando los objetos están muy próximos. Sin embargo, de una curva se puede extraer la fuerza entre la punta y la muestra en función de la distancia y el desplazamiento de la frecuencia registrada en el modo de amplitud constante. La deflexión del fleje se calcula por la teoría de la elasticidad. A partir de la ecuación del movimiento [Meyer04]:

$$m\ddot{z} = -k[z - A_{\text{ext}} \cos(\omega t + \theta)] - \gamma_c \dot{z} + F(z) \quad 5.3$$

donde A_{ext} , es la amplitud externa, $F(z)$ es la fuerza punta muestra en función de la distancia y para amplitud constante se asume que la fuerza de fricción es compensada por la fuerza periódica de excitación externa $F_0 = kA_{\text{ext}} \cos(\omega t + \theta)$. La ecuación 5.3 se reduce a

$$m\ddot{z} = -kz + Fz \quad 5.4$$

Para amplitudes pequeñas, se obtiene una expresión lineal de la fuerza donde el gradiente de fuerza es proporcional al desplazamiento de la frecuencia.

$$\frac{\Delta f}{f} = -\frac{1}{2k} \frac{\partial F}{\partial z} \quad 5.5$$

En las curvas de AC-DAFM se suelen representar la amplitud o la fase frente al desplazamiento del piezoeléctrico. Ambas se pueden dividir en tres regiones de interacción. Cuando la punta oscila alejada de la muestra, lo hace con una amplitud igual a la amplitud libre A_0 , con un desfase constante que corresponde a una situación de ausencia de interacción. Este desfase constante es cero pues es como se obtiene de las medidas directas del microscopio utilizado. Cuando la distancia

entre la punta y la muestra disminuye, la amplitud comienza a decrecer de forma monótona y la fase a aumentar. Generalmente, la punta no llega a tocar la muestra cuando está en este régimen, aunque puede hacerlo de forma intermitente, puesto que la amplitud de oscilación es menor que la separación entre la muestra y la punta. En este régimen, las fuerzas que suelen medirse son fuerzas de largo alcance tipo Van der Waals o fuerzas electrostáticas. La tercera zona se corresponde con el régimen en el que la punta y la muestra están esencialmente en contacto mecánico.

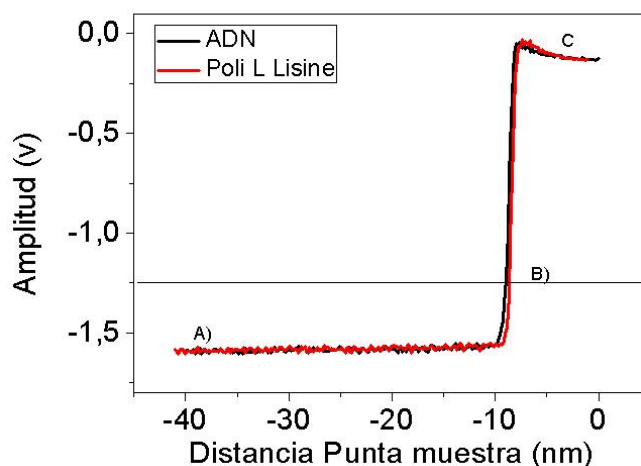


Figura 5.1 Curva esquemática de la amplitud frente a distancia punta muestra, realizada sobre una molécula de DNA depositada (Curva negra) y la mica funcionalizada con poli-L lisina (curva roja) en una solución electrolítica de NaCl 1 mM a pH 7 operando en el modo dinámico con amplitud constante. A) Región de no interacción entre la muestra y la punta, B) Punto de setpoint y C) Zona de contacto

5.3 Métodos experimentales

5.3.1 Preparación de la muestra

En este capítulo utilizaremos dos muestras diferentes para el estudio de superficie cargadas con ambos regímenes de interacción, una de ADN y otra de bicapa lipídica.

ADN

La muestra de ADN se preparó depositando primero 10 μl de Poli-L-lisina sobre una superficie de mica recién exfoliada. Inmediatamente después la superficie se lava con agua mili Q, se seca con nitrógeno gaseoso y por último se deposita sobre la mica funcionalizada, una solución de DNA diluida en agua a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se deja incubar durante unos minutos y se lava varias veces con el tampón de 1 mM NaCl a pH 7.

La poli-L-Lisina es un polímero de aminoácidos de lisina, que contiene un grupo amino en su cadena lateral. Este aminoácido tiene un pI 10, por lo que en soluciones electrolítica a pH 7 estará cargado positivamente. Consiguientemente, la mica recubierta con este monómero adquiere una carga positiva en el sistema. Por otro lado, la molécula de DNA tiene un pI 4 por lo que a pH 7 estará cargada negativamente. Siendo éste un sistema heterogéneo ideal para visualizar las diferencias de fuerza electrostática.

Bicapa lipídica

Para la obtención de las vesículas lipídicas de Dioleoyloxy propyl-N,N,N-trimethylammonium chloride (DOTAP), se disolvió en cloroformo para obtener una concentración final de 0.07 mg/ml. Se evaporó el disolvente con N_2 para evitar la oxidación del lípido, obteniendo una capa delgada en el matraz. La película de lípidos fue rehidratada con agua Milli-Q 18.2 $M\Omega\cdot\text{cm}$ a 25 $^{\circ}\text{C}$, aplicando varios ciclos de sonicación y por último fue extruida repetidamente a través de una membrana de policarbonato de 200 nm, obteniendo vesículas lipídicas uniformes.

Finalmente, para la obtención de bicapa lipídica se incuban las vesículas de DOTAP alrededor de 3 minutos sobre un sustrato de mica recién exfoliada, procediendo a lavar para retirar las vesículas sobrenadantes.

5.3.2 Caracterización de la muestra por AFM

Para la obtención de las imágenes de AFM se ha utilizado un equipo comercial de Nanotec Electrónica. Las medidas se han realizado en modo dinámico con puntas, de constante de fuerza 0.1 N/m y frecuencia de resonancia en agua de 25 kHz (modelo AC40) [Bruker]. El procesado se llevó a cabo usando el programa WSxM. El proceso de calibración se ha realizado utilizando el método del ruido térmico [González 2012].

5.4 Resultados

5.4.1 Caracterización de la molécula de ADN

A continuación se describen los resultados obtenidos en modo dinámico sobre la muestra de DNA preparada del modo descrito. En la imagen 5.2 se realizó un cambio en el setpoint durante la medida de forma que la punta se aleja de la superficie. En la misma imagen topográfica este cambio resulta en las líneas sin contraste definido (la punta esta suelta) y en las imágenes adicionales, esta parte define el régimen de “no interacción” tal y como se discutirá más adelante. La parte superior fue caracterizada a un setpoint inferior, esto es, ejerciendo una fuerza inferior (la reducción de amplitud fue en torno a 500 mV), mientras que en la parte inferior se aplicó un setpoint superior, esto es, incrementando la presión sobre la muestra (correspondiente a una reducción de amplitud cercana a 1 V). En la figura 5.2a se muestra una molécula de DNA, depositada sobre una superficie de mica funcionalizada con poli-L-lisina. Obtenida en medio electrolítico de 1 mM NaCl pH 7 operando en el modo dinámico en amplitud constante. En la figura 5.2b se muestra un perfil a lo largo de la muestra de DNA, observando que la molécula presenta una altura de 1.2 nm, un valor similar a la que se ha obtenido en trabajos anteriores [Moreno 2003, Sotres], y menor que el diámetro nominal 2 nm [Watson 1953]

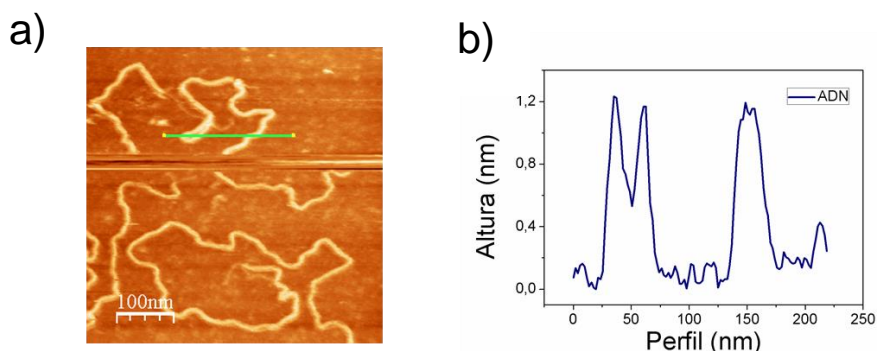


Figura 5.2 a) Imagen de la molécula de DNA depositada sobre la mica funcionalizada con poli-L lisina en una solución electrolítica de NaCl 1 mM a pH 7 operando en el modo dinámico con amplitud constante. b) muestra un perfil de altura de la molécula de DNA.

En la figura 5.3 se representan los canales adicionales que se adquieren junto a la imagen topográfica y proporcionan información fisicoquímica del sistema. El sistema de feedback se realizó en el canal de amplitud donde encontramos que

nuestro sistema varía de 1 a 2 nm (Fig. 5.2 a). Observamos una diferencia de contraste debido al cambio de setpoint y una línea oscura en el centro que define el valor de interacción nula. La figura 5.3b es el canal de fase donde en la parte inferior se visualiza un pequeño halo alrededor de la molécula de ADN, mientras que en la parte superior donde estamos más alejado de la superficie este halo desaparece. Y en la Fig. 5.3c se visualiza la interacción en fuerza entre punta y muestra a una cierta distancia, se observa claramente que a medida que nos acercamos a la muestra la interacción se hace cada vez más fuerte, yendo desde -40 a 35 pN, diferenciando claramente entre la mica recubierta de poli-L-lisina y la molécula de DNA.

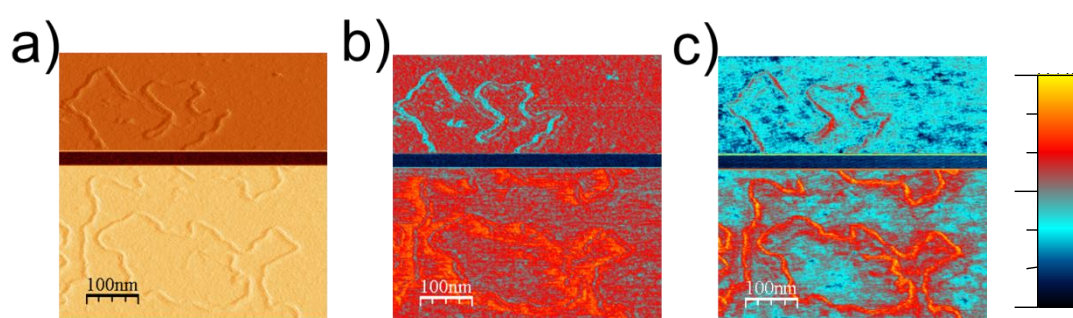


Figura 5.3 Canales adicionales obtenidos de la misma medida de la imagen de topografía 5.2a) de la molécula de ADN depositada sobre una mica funcionalizada con poli-L lisina en una solución electrolítica de NaCl 1 mM a pH 7 operando en el modo dinámico con amplitud constante. Los canales adicionales son a) amplitud que corresponde al canal de feedback, b) la fase y c) la fuerza normal.

Este resultado pone de manifiesto la importancia de la elección del setpoint en la caracterización de AFM, y de la diferente determinación experimental que puede obtenerse en los distintos modos. Esta medida se correlaciona con otros estudios hechos en el modo jumping [Javier].

5.4.2 Visualización de una molécula de ADN en espectroscopia FSI dinámica

Para poder estudiar la distribución de la fuerza de la doble capa eléctrica, la imagen de topografía debe ir acompañada de una resolución en curvas que permita diferenciar entre distintas regiones de interacción en la misma. En la figura 5.4a se muestra una imagen topográfica obtenida en el modo FSI (*Force Spectroscopy Image*), con una oscilación de 4nm, donde se observa la molécula de ADN. Los datos fueron adquiridos con 64 x 64 pixeles. En la figura 5.4.b se muestran dos curvas de amplitud en función de la distancia punta-muestra donde se observa una

reducción de la amplitud sobre la molécula de ADN (línea roja). En la curva podemos observar que la zona de libre interacción se encuentra aproximadamente a -1.4 V de amplitud y el setpoint fue establecido a -1.250 V, también podemos observar que en este canal la interacción comienza a 10 nm. Figura 5.4c representa la fase frente a la distancia, donde claramente podemos apreciar que la muestra tiene ambos régimen de interacción, donde la poli-l-lisina a ph7 es atractiva mientras que la molécula de ADN tiende a repelerse de la punta. Por último la figura 5.4d es una curva de fuerza frente a la distancia donde se observa claramente que la muestra no ha llegado al contacto mecánico y al igual que en la fase tiene la misma dependencia con la interacción.

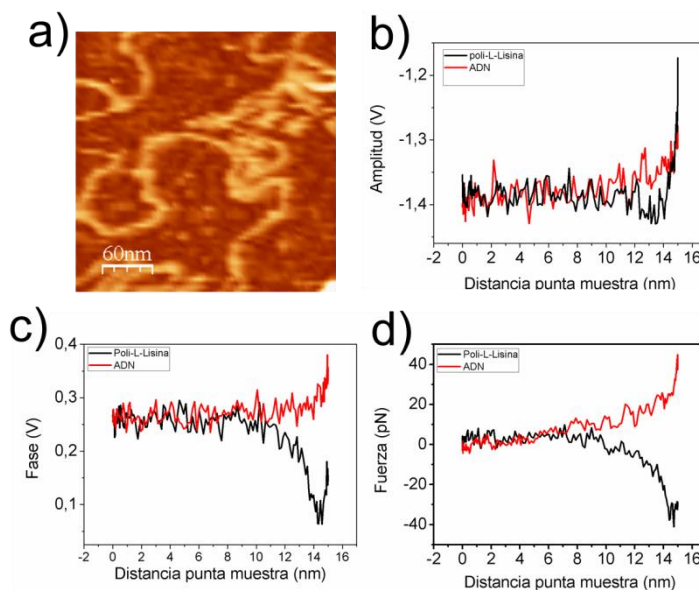
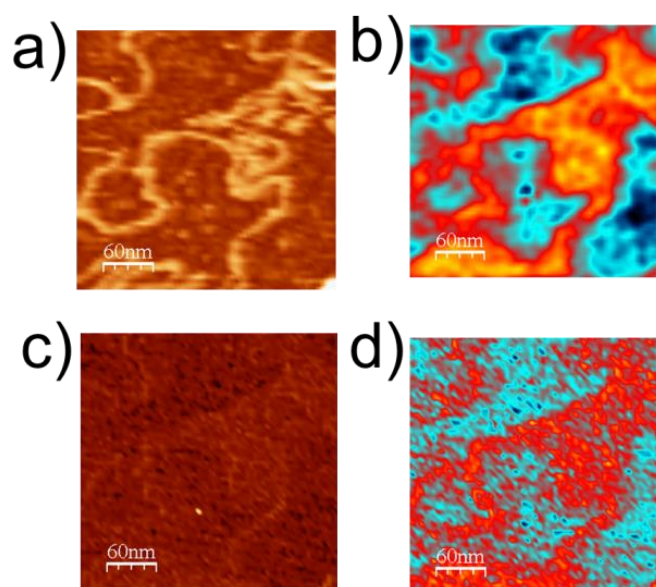


Figura 5-4 a) imagen topográfica de la molécula de ADN depositada sobre mica funcionalizada con poli-L lisina en una solución electrolítica de NaCl 1mM a ph 7 operando en el modo FSI-dinámico con amplitud constante, con una altura de 1.6 nm. b) Curvas de amplitud frente a la distancia punta muestra realizadas sobre la molécula de ADN (línea roja) y sobre la mica recubierta de poli-L-Lisina (línea negra). c) Curva de fase frente a distancia punta muestra y d) curva de fuerza frente a la distancia punta muestra.

Los modos de operación del AFM basados en la realización de curvas de interacción permiten obtener, junto a la topografía, mapas de alguna propiedad de la muestra, o de la interacción con la punta. Estos modos han demostrado ser de gran utilidad para estudiar la distribución de fuerza electrostática sobre distintas superficies [Rostch 1997]. Para estos estudios es conveniente registrar todas las curvas operando en el modo FSI.

A partir de estos datos se obtuvieron mapas a una distancia de 14nm desde la distancia 0 de no interacción (eje de abscisas en las curvas), donde se observa la interacción punta muestra. En la figura 5.5a se representa la información topográfica de la muestra, obteniendo una altura de 1.6nm, en la figura 5.4b se puede ver como se resuelve claramente la molécula de ADN en el canal de fuerza donde la biomolécula tiene una fuerza electrostática de 42 pN y la mica recubierta con poli-lisina está cargada negativamente tal y como predice la teoría, una resolución similar se observa en el canal de fase (figura 5.5 d). La figura 5.5c corresponde al canal de amplitud donde se realizó el feedback.



Figura

5.5 a) imagen topográfica de la molécula de ADN depositada sobre una mica funcionalizada con poli-L lisina en una solución electrolítica de NaCl 1mM a pH 7 operando en el modo FSI-dinámico con amplitud constante. En las figuras b), c) y d) se representa un mapa de iso-distancia a una distancia de 13 nm, .b) es el canal de fuerza (escala: 42 -50 pN) , c) es la amplitud y d) es la fase (escala: 510 -150 mV).

Estos resultados demuestran que se puede obtener imágenes de topografía y obtener resolución suficiente en las curvas de interacción, minimizando el contacto mecánico y detectando las fuerzas electrostáticas.

5.4.3 Caracterización de la bicapa lipídica en modo AC-DAFM

Para el estudio de sistemas heterogéneos en los distintos modos dinámicos hemos utilizado una membrana lipídica de DOTAP depositada sobre una superficie de mica. Los experimentos se han realizado con el mismo tipo de punta del apartado anterior.

La punta de nitruro de silicio está cargada negativamente al igual que la mica a pH fisiológico. El DOTAP es un lípido que a pH fisiológico está cargado positivamente. Esta carga es el origen de su fuerte interacción con la mica, pudiendo formarse bicapas sin la ayuda de un catión divalente. La bicapas lipídicas de DOTAP, tienen una altura aproximada de 6nm. En la figura 5.6 se visualiza una bicapa de lípido, en la que se observan espacios sin recubrir, por lo que nuestro sistema está compuesto por dos regímenes de interacción.

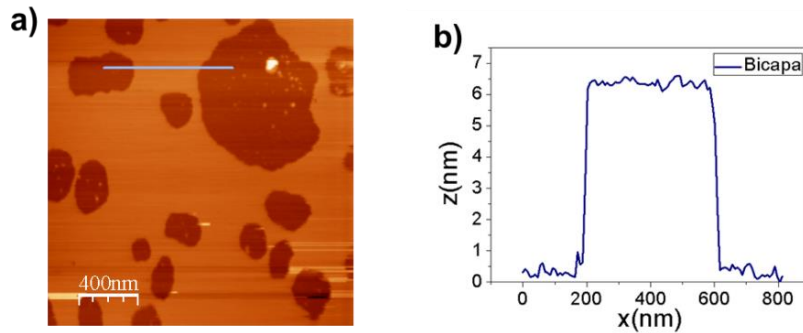


Figura 5.6 a) Imagen topográfica de una bicapa lipídica sobremica y b) es el perfil trazado. La medida se ha realizado en AC-AFM.

Se puede observar claramente que la altura correspondiente a la bicapa es de aproximadamente 6nm, altura que concuerda con la teoría. Al igual que en el caso anterior, además de la caracterización topográfica, registramos los canales de fuerza, fase, frecuencia y amplitud para obtener información adicional que nos den una información sobre la carga de nuestra biomembrana (figura 5.7).

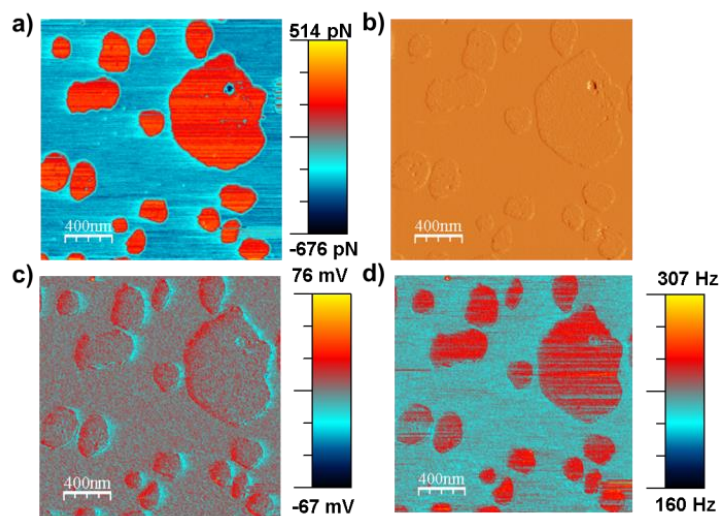


Figura 5.7 a) Canal de fuerza b) amplitud c) fase y d) frecuencia adquiridas en el modo AC-AFM.

Podemos observar que la fuerza entre la punta y la mica es repulsiva, coincidiendo con lo esperado a partir de la expresión de DLVO para la fuerza electrostática entre una punta y una muestra cargada negativamente. Para cargas distintas obtenemos un contraste inverso, por lo que se comprueba que nuestra biomembrana de DOTAP está cargada positivamente tal como se esperaba .

A partir de estos resultados se obtiene información topográfica y electrostática en sistemas heterogéneos, evitando el contacto mecánico.

5.4.4 Caracterización de la bicapa lipídica en modo FC-DAFM

Para este modo de medida utilizamos la misma muestra anterior, y observamos que la altura de la biomembrana había disminuido en casi en un 50% su altura. Esto puede ser debido a que se produce una compresión de la misma durante la medida, ya que en este modo de frecuencia constante el sistema experimenta un cambio de pendiente entre las zonas de interacción atractiva y las zonas de interacción repulsiva, sin embargo para poder realizar el feedback correctamente necesitamos ambas pendientes en la misma dirección, por lo tanto sobre las zonas de la muestra con carga positiva nuestro sistema ejerce mucha más fuerza.

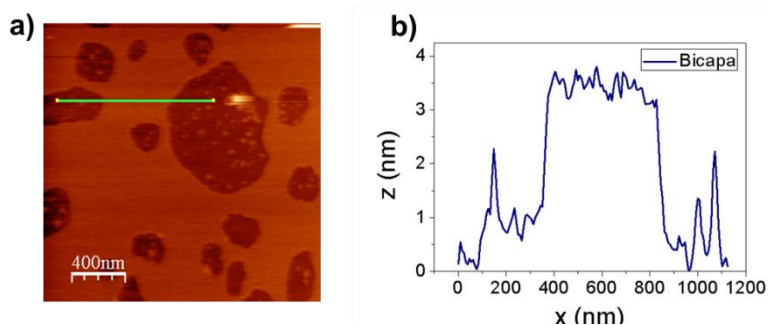


Figura 5.8 a) Imagen topográfica de una bicapa lipídica sobre mica en modo FC-DAFM. b) Perfil correspondiente a la línea verde en la imagen a)

Simultáneamente con la imagen topográfica se adquieren canales adicionales al igual que en la medida anterior, donde observamos en el canal de fuerza (figura 5.9a) no se distingue claramente entre la mica y la bicapa de DOTAP, mientras que el canal de amplitud se distingue claramente entre la zona atractiva y repulsiva. Los canales de frecuencia y fase y muestran el error en la media ya que el primero corresponde al feedback principal y sobre el segundo actúa otro sistema de realimentación llamado PLL (*Phase lock loop*) que fija la fase a 0 maximizando la amplitud.

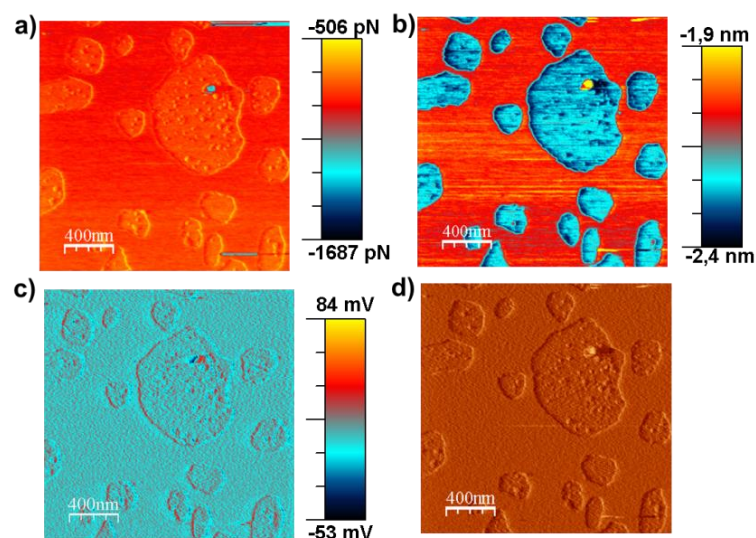


Figura 5.9 a) Canal de fuerza b) amplitud c) fase y d) frecuencia, adquiridas simultáneamente en modo FC-DAFM

5.4.5 Análisis cuantitativo de la curva de la espectroscopia dinámica FSI

En la figura 5.10 se puede ver un recubrimiento parcial de bicapa lipídica de DOTAP sobre mica. Al igual que en el experimento anterior con ADN se han realizado medidas dinámicas de espectroscopía de fuerzas con el modo FSI. Simultáneamente con la topografía se han adquirido las curvas de fuerza, fase y amplitud frente a la distancia punta muestra tanto sobre el lípido como sobre la mica. Comparando las curvas en ambas zonas de la muestra, se puede entender porque es posible realizar la medidas con poca interacción cuando el feedback se realiza en amplitud, ya que la pendiente de las curvas es ese caso es la misma. Sin embargo comparando las curvas de fase, en las que la pendiente es distinta sobre lípido que sobre mica antes de alcanzar el contacto mecánico, se comprende que no es posible realizar la imagen con el feedback es ese canal con poca interacción, ya que solo es posible cuando las pendientes son iguales, en cuyo caso se está tocando la muestra en la zona atractiva (que corresponde a la bicapa lipídica) de ahí que se vea reducida la altura de la bicapa. El comportamiento de las curvas de fase es el mismo que presentan las curvas de frecuencia, que en el modo FSI no se han registrado por la complicación técnica de incorporar un feedback adicional (PLL) mientras se adquieren los datos en este modo de medida, que implican la adquisición de las curvas junto con la topografía, de manera que en la adquisición de cada curva el PLL sale de rango al tocar la muestra y debe volver a entrar en rango. Además para medir en el modo de frecuencia constante por el hecho de tocar la muestra en la

zona atractiva es necesario emplear una mayor amplitud de oscilación para que la punta no se quede pegada a la muestra y una mayor oscilación implica una peor señal de fuerza, ya que la información de la electrostática puede quedar pérdida entre la elevada oscilación de la micropalanca.

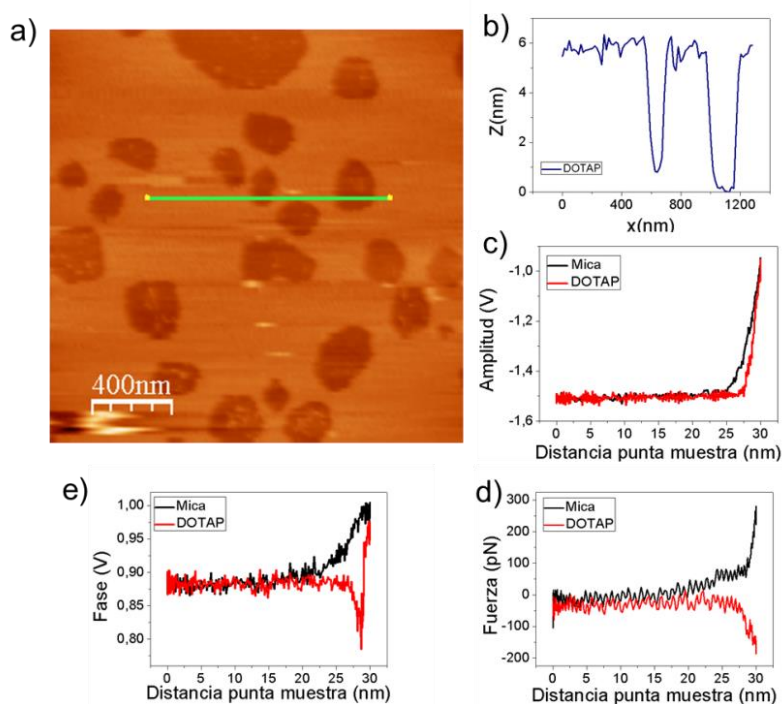


Figura 5.10 a) imagen topográfica de la bicapa lipídica DOTAP sobre mica en agua milli-Q. b) Perfil sobre la bicapa obtenido de la imagen a). c) Curvas de amplitud frente a la distancia punta muestra realizadas sobre la bicapa lipídica (línea roja) y sobre la mica (línea negra). d) Curva de fuerza frente a la distancia punta muestra y e) curva de fase frente a distancia punta muestra.

En la figura 5.11 se muestra la superposición de los perfiles topográficos obtenidos en las figuras 5.6 y 5.8 en la misma zona de la muestras en ambos modos de medidas. La curva roja corresponde al modo de frecuencia constante mientras que la curva negra corresponde al modo de amplitud constante. Como ya se ha comentado anteriormente, se atribuye esta diferencia de altura considerable a la inestabilidad del sistema en el momento de realizar el feedback a frecuencia constante ya que el sistema requiere pendientes de interacción en el mismo régimen, provocando así la comprensión de la misma.

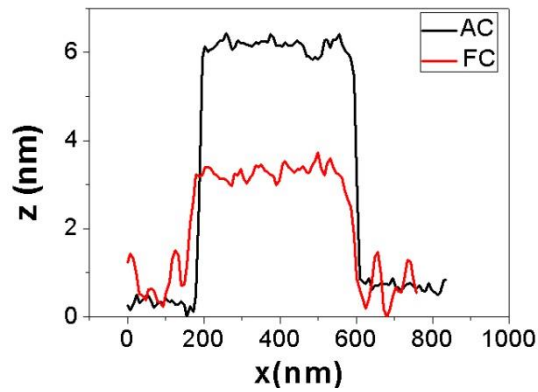


Figura 5.11 Superposición de los perfiles topográficos obtenidos en las figuras 5.6 y 5.8 en ambos modos de medida. La curva roja corresponde al modo de frecuencia constante mientras que la curva negra fue medida a amplitud constante.

5.5 Conclusiones

De los resultados discutidos anteriormente en este capítulo se pueden extraer varias conclusiones. Primero que con el modo AC-DAFM es posible obtener imágenes de topografía en medio líquido a una distancia tal, que nos permite evitar deformación, destrucción y contaminación tanto de la punta como de la muestra, al minimiza el contacto entre ella.

Debido a la importancia no solo de obtener información topográfica del sistema sino también de conocer las propiedades de la biomoléculas en biología, ha quedado demostrada la capacidad del AC-DAFM de obtener información electrostática en sistemas dinámicos con una oscilación pequeña.

Se ha comparado los modos de medidas AC-DAFM-AC y FC-DAFM- en moléculas blandas y con carga superficial, observando una compresión en las islas de bicapa de DOTAP debido al cambio de pendiente al que está sometido el sistema en el modo FC-DAFM, lo que provoca deformación y deterioro de la punta y la muestra, en particular, al tomar las imágenes de moléculas biológicas blandas en FC-DAFM. Este último punto es importante ya que la contaminación y la modificación continua de la punta no permite obtener resultados cuantitativos comparables, sobre todo cuando se realizan experimentos de espectroscopia.

5.6 Referencias

- [Bruker] <http://www.brukerafmprobes.com/p-3823-ac40.aspx>
- [Meyer 04] Ernst Meyer, Hans Josef Hug, Roland Bennewitz, Scanning Probe Microscopy: The Lab on a Tip, Springer, 2004.
- [González)](González Martínez Juan Francisco, Carvajal Inés Nieto, Colchero Paetz Jaime. Calibration of oscillation amplitude in Dynamic Scanning Force Microscopy
- [Gotsmann99] Gotsmann,*C. Seidel, B. Anczykowski, and H. FuchsPhysikalisches Institut, Conservative and dissipative tip-sample interaction forces probed with dynamic 1999 the American Physical Society, 11051-11061
- [Green04] Green Christopher P., Jason Hadi Lioe, Cleveland P., Proksch Roger, Mulvaney Paul, Sader John E. Normal and torsional spring constants of atomic force microscope cantilevers Review of Scientific Instruments (2004) 75, 1988-1996.
- [Johnson03] Johnson A.S., Nehl C.L., Hafner J.H. Fluid electric force microscopy for charge density mapping in biological systems. Langmuir. 2003;19:10007–10010.
- [Lievonen09] Lievonen J, Ahlskog M. Lateral force microscopy of multiwalled carbon nanotubes. Ultramicroscopy. 2009. 109 825-9
- [Ling07] Ling X, Butt HJ, Kappl M. Quantitative measurement of friction between single microspheres by friction force microscopy. Langmuir. 2007, 23 8392-9.

- [Manne9] Manne, S., Cleveland, J.P., Gaub, H.E., Stucky, G.D., Hansma, P.K. (1994) "Direct visualization of surfactant hemimicelles by force microscopy of the electrical double layer" *Langmuir* 10, 4409-4413
- [Moreno-Herrero03] Moreno-Herrero F., Colchero J., A.M. Baro DNA height in scanning force microscopy .*Ultramicroscopy* 96 (2003) 167–174.
- [Müller99] Müller D.J., Fotiadis D., Engel A. Electrostatically balanced subnanometer imaging of biological specimens by atomic force microscope. *Biophys. J.* 1999; 76:1101–1111.
- [Sotres07] Sotres J, Lostao A, Gómez-Moreno C, Baró AM. Jumping mode AFM imaging of biomolecules in the repulsive electrical double layer. *Ultramicroscopy*. 2007 107(12):1207-12
- [Watson53] Watson J.D. and Crick F.H.C. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid *Nature* 171, 737-738 (1953)

Conclusiones Generales

En este trabajo se ha llevado a cabo por medio de espectroscopía de fuerzas (FS) la diferenciación de moléculas individuales tan similares morfológicamente que resultan indistinguibles topográficamente. Estas moléculas son avidina y estreptavidina que se encuentran ancladas a una bicapa lipídica biotinilada. El principio de diferenciación se basa en su distinta carga superficial. La avidina es una glicoproteína cargada positivamente, mientras que la estreptavidina es una proteína prácticamente neutra a pH 7. La diferencia de carga que presentan ambas moléculas se ha podido determinar con AFM adquiriendo las curvas de fuerzas frente a distancia (FZ) simultáneamente con la topografía de la muestra. Estas curvas de fuerza presentan notables diferencias cuando se miden sobre cada proteína, así como sobre el sustrato, debido a la interacción electrostática.

Los resultados obtenidos muestran que ambas proteínas están cargadas negativamente, aunque esperábamos que la avidina presentara carga positiva y la estreptavidina neutra. Atribuimos estos valores inesperados de la densidad superficial de carga de las proteínas a los iones presentes en la disolución y a la compleja interacción de las proteínas con la bicapa lipídica.

A pesar de que la avidina y la estreptavidina presentan el mismo signo en la densidad de carga superficial, ambas proteínas se pueden distinguir claramente, lo cual muestra la gran sensibilidad del AFM para detectar pequeñas variaciones en la densidad de carga de moléculas individuales y por tanto pone de relieve la importancia del empleo de la espectroscopía de fuerzas para la caracterización de las propiedades electrostáticas locales de muestras biológicas en medio fisiológico.

Es importante determinar el origen de la fuerza que conduce a la inversión de carga eléctrica. La interacción total entre dos superficies debe incluir las fuerzas de van der Waals y de doble capa (fuerzas DLVO) que actúan conjuntamente. La atracción de Van der Waals siempre se debe a la repulsión EDL a distancias suficientemente pequeñas. No obstante, a partir de los datos experimentales puede verse que las fuerzas de van der Waals son insignificantes en comparación con los valores de EDL para distancias mayores a 2 nm, quedando por tanto las fuerzas debidas a la doble capa como las únicas principales responsables de la inversión de carga eléctrica.

Se ha estudiado, mediante la resolución espacial de la espectroscopia de fuerzas la denominada doble capa electrostática (EDL), el cambio de carga eléctrica de moléculas individuales de avidina (4 nm de tamaño) depositadas sobre mica. Se

consigue alcanzar una resolución suficiente para detectar moléculas individuales de avidina, tanto en topografía de AFM como en fuerza de EDL. Cuando son analizadas en agua, las moléculas de avidina se comportan del modo esperado de acuerdo con su pI de 10.5, es decir, como si estuvieran cargadas positivamente. Por el contrario, cuando se caracterizan en disolución tampón de fosfato a pH de 7, las moléculas se comportan como si su carga se hubiera invertido. Por tanto, para poder entender los mecanismos responsables del fenómeno de sobrecarga (overcharging), este trabajo presenta interesantes datos experimentales. Más aún, los resultados sugieren que es precisamente esta técnica experimental la más conveniente para estudiar este mecanismo. Finalmente, los resultados proporcionan una manera de controlar externamente el signo de las fuerzas EDL en dominios nanométricos (aquellos delimitados por las posiciones ocupadas por las moléculas).

En conclusión, la sobrecarga en una superficie carga de faltas de homogeneidad (biomoléculas aisladas de tamaño nano) se demostró experimentalmente. Esto se realizó con un AFM operado en el modo de espectroscopia de fuerza, de modo que también se demostró la idoneidad de la técnica para el estudio de carga de inversión. Mientras que el modelo teórico de los mecanismos detrás de los resultados experimentales no se ha abordado, creemos que pueden ayudar a una mejor comprensión del fenómeno de la inversión de la carga. Por último, nuestros datos ofrece una forma de controlar externamente un estado binario (siendo más o menos repulsivo que la fuerza de fondo) de las moléculas adsorbidos sobre un sustrato. No es difícil pensar que los datos presentados en este trabajo abren una amplia gama de aplicaciones, desde los biosensores para el control y almacenamiento de información.

De los resultados discutidos anteriormente en este capítulo se pueden extraer varias conclusiones. Primero que con el modo AC-DAFM es posible obtener imágenes de topografía en medio líquido a una distancia tal, que nos permite evitar deformación, destrucción y contaminación tanto de la punta como de la muestra, al minimiza el contacto entre ella.

Debido a la importancia no solo de obtener información topográfica del sistema sino también de conocer las propiedades de la biomoléculas en biología, ha quedado demostrada la capacidad del AC-DAFM de obtener información electrostática en sistemas dinámicos con una oscilación pequeña.

Se ha comparado los modos de medidas AC-DAFM-AC y FC-DAFM- en moléculas blandas y con carga superficial, observando una compresión en las islas

de bicapa de DOTAP debido al cambio de pendiente al que está sometido el sistema en el modo FC-DAFM, lo que provoca deformación y deterioro de la punta y la muestra, en particular, al tomar las imágenes de moléculas biológicas blandas en FC-DAFM. Este último punto es importante ya que la contaminación y la modificación continúa de la punta no permite obtener resultados cuantitativos comparables, sobre todo cuando se realizan experimentos de espectroscopia.

Agradecimientos

Este trabajo no se habría podido realizar sin la colaboración de muchas personas que me han brindado su ayuda, sus conocimientos y su apoyo. Quiero agradecerles a todos ellos cuanto han hecho por mí, para que este trabajo saliera adelante de la mejor manera posible.

A mis directores de tesis Prof Arturo Baró, por la confianza depositada en mí y la posibilidad ofrecida de trabajar en el campo de la Nanociencia, también por su esfuerzo, dedicación, comentarios e ideas. En segundo lugar al Dr. Jaime Colchero por su gran calidad científica y humana, por estar siempre dispuesto ayudarme y apoyarme en todo momento. Ha corregido minuciosamente este trabajo y me dado la posibilidad de mejorarlo. Tengo que agradecerle sus comentarios, direcciones, sugerencias y las correcciones con las que he podido elaborar una adecuada memoria de todo el trabajo realizado durante estos últimos años. Gracias a mis dos directores he participado en congresos, cursos y he recibido una formación que me ha permitido acometer este trabajo.

Mi más sincero agradecimiento Dra. Elena López Elvira, tengo tantas cosas que agradecer que unas líneas no son suficientes, me enseñó el funcionamiento del equipo, la paciencia que me has tenido en estos años, los comentarios científicos, por contestar a muchas dudas y cuestiones no solo en el ámbito profesional, me ha asesorado y animado en todo momento gracias por ese apoyo incondicional y por confiar en mí cuando ni yo lo hacía y por sobre todo su amistad. Sin ti esta tesis no habría sido posible, mil gracias.

A mi amigo y compañero, Dr. Eloy Pérez, por siempre tener una palabra de ánimo, una solución para cada problema y por todo lo que me has enseñado en este tiempo.

Agradezco infinitamente al Dr. Javier Sotres, por todo el tiempo que dedico a enseñarme a usar el FSAS, por la colaboración y el apoyo durante estos años.

A los compañeros del Instituto de ciencias de materiales de Madrid, por el agradable ambiente de trabajo, así como la colaboración prestada en numerosas ocasiones.

A mi familia, mis padres por la educación, el apoyo y la confianza, además por el sacrificio extra humano que han hecho para que realice mis metas. Mi abuela Francia por ser tan especial conmigo y brindarme su apoyo incondicionalmente

donde quiera que estés. Tía Rosa por ser mi segunda madre, desde que tengo uso de razón has estado pendiente de mí y te has dedicado a escucharme y ayudarme en todas las formas posibles.

A mis amigos incondicionales, Santi, María, Karen, Ana y Anthony por siempre estar apoyándome y estar en los momentos más difícil y de desesperación.

A Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.