

Trabajo de Fin de Grado

MEMBRANAS CELULARES
SIMULADAS PARA APLICACIONES
EN EL CAMPO DE LA SALUD

Autora:

Adriana Gil Paricio

Directora:

Pilar Cea Mingueza

Departamento de Química Física 2021-2022

Índice

1.Introducción	1
2.Objetivos.....	3
3.Materiales y métodos	4
3.1 Reactivos y disolventes utilizados.....	4
3.2 Sustratos	4
3.3. Instrumentación	4
3.4 . Procedimiento experimental	5
3.4.1 Películas de Langmuir.....	5
3.4.2 Microscopía de ángulo de Brewster (BAM)	6
3.4.3 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	7
4.Resultados y discusión	7
4.1 Fabricación y caracterización de las películas de Langmuir.....	7
4.1.1 Espectroscopia Ultravioleta-Visible: Ley de Lambert-Beer	7
4.1.2 Isotermas presión superficial y área por molécula	9
4.1.4 Microscopía del Ángulo de Brewster (BAM)	10
4.1.5 AFM	11
4.2 Miscibilidad gingerol-colesterol y gingerol-DPPC.....	14
4.2.1 Mezclas gingerol-colesterol.....	14
4.2.2 Mezclas DPPC-gingerol	16
5. Conclusiones y perspectivas de futuro	19
6. Bibliografía.....	20

Resumen

El gingerol es un compuesto de gran interés debido a sus amplios efectos terapéuticos, en concreto, por sus propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas. En este TFG se ha estudiado las propiedades físico-químicas del gingerol mediante modelos de membrana de Langmuir-Blodgett. Se ha determinado que el gingerol forma monocapas estables y reproducibles en la interfase aire-agua, llegando hasta la fase de líquido condensado a altas presiones. La monocapa se ha caracterizado con técnicas de microscopio de ángulo Brewster (BAM) y microscopía de fuerza atómica (AFM) para estudiar su morfología, observándose una monocapa homogénea y sin agregados a medida que la compresión de la monocapa es mayor. Para conocer cómo actúa el compuesto con la membrana plasmática de las células, se ha realizado una primera aproximación en el estudio de la interacción del gingerol con el DPPC y el colesterol. Como resultados se han obtenido que el gingerol es miscible tanto con el colesterol como con DPPC exhibiendo un comportamiento más ideal a medida que la presión aumenta.

Gingerol is a compound of great interest due to its large therapeutic effects, in particular for its anti-inflammatory and anti-carcinogenic properties. In this TFG the gingerol physical-chemical properties have been studied using the Langmuir-Blodgett model. It has been determined that the Gingerol creates stable monolayers at the air-water interphase, reaching the condensed liquid phase at high pressures. The monolayer has been characterized with Brewster Angle Microscope techniques (BAM) and Atomic Force Microscopy (AFM) to study its morphology, observing a homogeneous monolayer and without aggregates as the compression of the monolayer is increased. In order to learn how the compound works with the plasma membrane of cells, a first approximation has been made in the study of the interaction of Gingerol with the DPPC and cholesterol. The obtained results show that gingerol is miscible in cholesterol and DPPC exhibiting more ideal behaviour as pressure increases.

1. Introducción

La relación entre alimentación y salud es probablemente uno de los temas más estudiados a lo largo de la Historia. En este momento actual, nadie duda que una buena alimentación constituye un factor determinante en la calidad de vida y bienestar de la población.

Toda sustancia externa que pueda modificar la composición y estructura de nuestras células o sistemas funcionales recibe el nombre de xenobiótico (del griego *xenos*, “extranjero”). Los podemos clasificar en endógenos, propios del alimento, o exógenos, que dependen de manipulaciones y ajenos a él. Son por tanto estos xenobióticos endógenos presentes en nuestra dieta los verdaderos protagonistas, ya que aportan los efectos protectores o preventivos frente a las enfermedades, o por el contrario, pueden contribuir a su aparición.

La membrana plasmática cobra una gran importancia en la entrada de los xenobióticos. Ésta juega un rol crítico en limitar la absorción y acumulación de las sustancias. Para conocer el mecanismo de actividad fisiológica de los xenobióticos, se aplican varios métodos que se basan en las interacciones entre una molécula bioactiva y los componentes de la membrana. Sin embargo, hacerlo con células vivas es muy complicado, es por eso que se usan los modelos de membrana. Uno de los modelos de membrana más relevantes en el panorama científico son las monocapas de Langmuir.¹

El “superalimento” (“*alimentos con altos niveles de nutrientes o fitoquímicos bioactivos con beneficios para la salud humana*”)² que ha sido de interés para nuestro estudio es el **jengibre**. El jengibre, conocido botánicamente como *Zingiber officinale* Rosc, de la familia de *Zingiberaceae* y al orden natural *Scitamineae*, es usado en la actualidad en una variedad de condimentos y bebidas³. Pero mucho antes, el jengibre ya era muy apreciado por sus propiedades medicinales y desempeñaba un papel muy importante en la atención sanitaria primaria de India y China.⁴ Se usaba para tratar enfermedades y síntomas de resfriados, dolor estomacal, dolor de cabeza, diarrea, artritis o reumatismos. Además, hoy en día se sabe que tiene actividad farmacológica contra toxicidades naturales, químicas e inducidas por la radiación. Es un gastroprotector, neuroprotector, hepatoprotector, nefroprotector y protector del sistema reproductor.⁵

Desde un punto de vista químico, el rizoma del jengibre contiene una gran cantidad de compuestos. Los componentes no volátiles incluyen aquellos que son biológicamente activos. Se tratan de los gingeroles, los shogales, los paradoles y la zingerona.⁶ En el ámbito farmacéutico e investigador, el gingerol es un compuesto de gran interés debido a sus propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas.⁷ Dentro de este grupo, se encuentra el 6-gingerol, el 8-gingerol y el 10-gingerol, con una estructura bastante análoga.⁸ El 6-gingerol ha recibido una atención considerable como agente terapéutico potencial debido a su eficacia en la regulación de múltiples vías moleculares. Todos los sus efectos y su estructura han sido recogidos en la **Figura 1**.

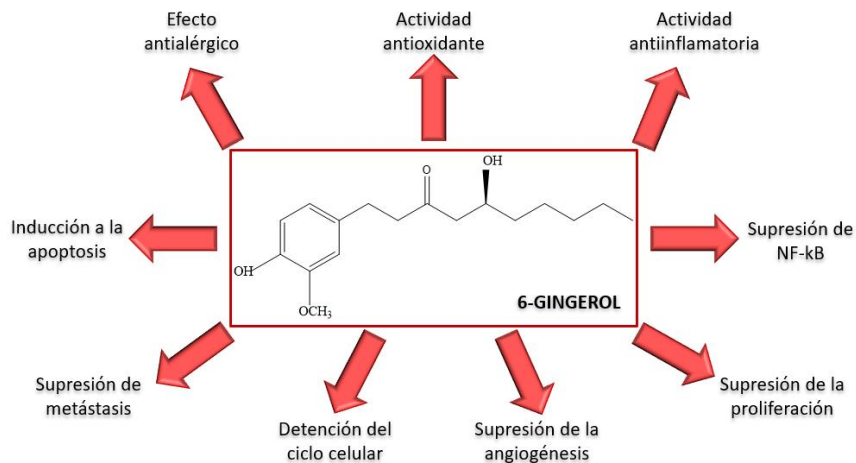


Figura 1. Efectos terapéuticos del 6-gingerol. (Figura adaptada de artículo “Colitis Ulcerosa Aguda Inducida por Sulfato de Sodio en Ratas: Efectos terapéuticos de los gingeroles en la colitis ulcerosa”)

8

El propósito de este TFG es el estudio de las propiedades superficiales del 6-gingerol y su interacción con modelos de membrana celular. En la literatura no se han localizado estudios registrados acerca de la actividad superficial del gingerol y de su capacidad para formar películas de Langmuir o de Langmuir Blodgett por lo que consideramos interesante abordar dicho análisis. Se trata de una sustancia muy higroscópica que incorpora dos grupos OH y una cetona, por lo que exhibe tautomerismo ceto-enol. El alto número de aceptores y de donores de enlaces de hidrógeno hace que el gingerol construya una amplia red de enlaces de hidrógeno intermoleculares, y en el caso de las películas de Langmuir, también podría formar enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua de la superficie. Además, la presencia del anillo bencílico puede resultar en apilamientos por interacciones de orbitales π .

Respecto a los compuestos químicos usados para simular la membrana se usó el colesterol (un lípido del tipo esterol), **figura 2**, que desempeña un papel clave en la formación de balsas lipídicas, en el ordenamiento y en el moldeado de la estructura lateral de la membrana⁹. Además de controlar la fluidez y la asimetría de la bicapa. El segundo componente es el DPPC, **figura 3**, (dipalmitoilfosfatidilcolina). Todas las fosfatidilcolinas, PC, que tienen una colina en la “cabeza” de la molécula,¹⁰ son un componente principal de muchos surfactantes pulmonares, en particular en los alvéolos pulmonares.¹¹

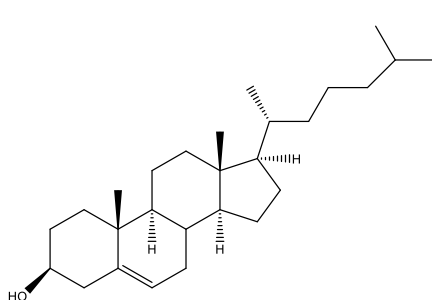


Figura 2. Estructura del colesterol

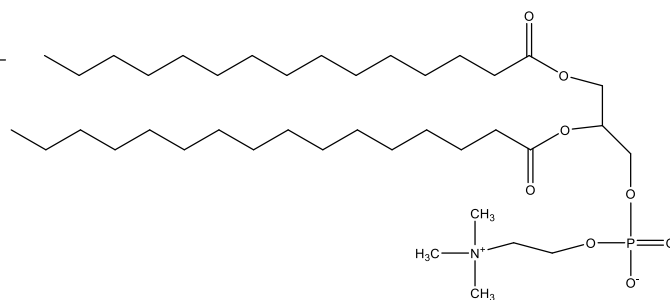


Figura 3. Estructura del DPPC

2. Objetivos

Los objetivos de este Trabajo de Fin de Grado son esencialmente formativos, consolidando conocimientos y habilidades adquiridas a lo largo de la titulación. Entre las competencias que deben haberse adquirido o consolidado a través de este TFG se incluyen:

- Saber trabajar de forma independiente y con soltura en el laboratorio, haciendo un uso adecuado de la instrumentación científica.
- Desarrollar el pensamiento crítico a la hora de analizar los resultados obtenidos y qué pasos tomar para continuar con la investigación.
- Aprender cómo se trabaja en un grupo de investigación.
- Ser capaz de redactar una memoria científica, adquiriendo la información de fuentes fiables y con buena reputación, y plasmar los resultados obtenidos en el laboratorio de forma rigurosa, clara y con conclusiones sólidas.
- Mejorar las competencias comunicativas en el ámbito científico exponiendo el trabajo oralmente frente a un tribunal.
- Dominar la búsqueda de bibliografía científica.

Además, el proyecto incluye objetivos de tipo científico que se enmarcan dentro del campo de investigación de nanomateriales y nanoestructuras, caracterización de dichos materiales nanoestructurados y estudio de fenómenos superficiales. Concretamente, en este TFG los objetivos científicos incluyen:

- Determinar las propiedades superficiales del gingerol en una interfase aire-agua y la fabricación de monocapas de Langmuir acompañada de una caracterización *in situ* de las películas de Langmuir.
- Fabricar películas de Langmuir-Blodgett de gingerol y analizar su topografía, interpretando qué información nos aporta cada técnica acerca de la monocapa de gingerol. En especial se usaron la técnica de BAM y AFM.
- Analizar la interacción del gingerol con algunos de los componentes mayoritarios de membranas plasmáticas celulares.
- Desenvolverse con soltura con softwares para el tratamiento de datos científicos, en concreto, Origin y Zotero.

3. Materiales y métodos

A continuación se muestran los equipos empleados, disolventes y reactivos utilizados para la realización de este proyecto.

3.1 Reactivos y disolventes utilizados

Compuesto	CAS	Proveedor	Pureza
Gingerol	23513-15-7	Sigma-Aldrich	≥99%
DPPC	63-89-8	Sigma-Aldrich	≥99%
Colesterol	57-88-5	Sigma-Aldrich	≥99%
Cloroformo	67-66-3	Macron Fine Chemicals	≥99,8%
Etanol	64-17-5	Laboaragón	≥99,5%
Acetona	200-662-2	Macron Fine Chemicals	≥99%
Agua Mili-Q	7732-18-5	Destilador de Facultad	Resistividad 18,2 MΩ·cm

3.2 Sustratos:

Las monocapas se han depositado sobre sustratos de mica que han sido adquiridos en Electron Microscopy Sciences Company (Cat. #71851-05, de 25 x 75 mm y espesor 0,26-0,31 mm). La mica se cortó en rectángulos de tamaño 100x100 mm² y se exfolió con celo antes de su utilización.

3.3. Instrumentación:

- Cuba doble KSV de dimensiones 580 x 145 mm² con dos barreras móviles y un brazo para realizar transferencia sobre los diferentes sustratos. En este TFG no se usó como doble, sino sólo uno de los compartimentos, y se empleó para el registro de isotermas presión-área y transferencias de las monocapas sobre mica.
- Cuba NIMA 702 de dimensiones 720 x 100 mm² con dos barreras móviles, que se utilizó para registro de isotermas presión-área y toma de imágenes con microscopio de ángulo Brewster (BAM).
- Espectrofotómetro UV Varian Cary 50 con haz doble, con monocromador Czerny-Turner, bombilla de Xenon y un rango de longitudes de onda 190-1100 nm y cubeta de cuarzo de 1 cm.
- BAM: KSV-NIMA con láser rojo de $\lambda = 659$ nm y 50 mW.
- Microscopio de fuerza atómica (AFM): Multimode 8 (Bruker), de la casa Veeco-Bruker, con unidad de control Nanoscope V (Bruker), del Laboratorio de Microscopías avanzadas (LMA), además de cantilevers RTESPA-150 (Bruker), con una constante de Spring nominal de 5 N·m⁻¹ y resonancia de 150 kHz.
- Ultrasonidos.
- Microjeringuilla Hamilton de 1 mL.

- Microbalanza del modelo Mettler ME30 con una precisión de $\pm 0,001$ mg.
- Equipo de medición de potencial superficial de la casa comercial KSV NIMA.

3.4. Procedimiento experimental

En esta sección se procederá a explicar brevemente las técnicas de que se han usado para la formación y caracterización de monocapas de gingerol y sus correspondientes mezclas, así como las películas LB.

3.4.1 Películas de Langmuir

La técnica de Langmuir permite formar ordenadas monocapas en una interfase aire-agua. Estas monocapas se forman debido a las propiedades anfipáticas de las moléculas, las cuales poseen una parte hidrofóbica y otra hidrofílica. El registro de isothermas π -A proporciona información acerca de la disposición de las moléculas sobre la monocapa, las interacciones que se establecen entre ellas y su estabilidad.

Las cubas usadas han sido NIMA 702 y cuba doble KSV. Se trabaja en una sala limpia, a una temperatura aproximadamente constante de 20 °C y humedad ambiente (cuyo valor siempre se anota por si tuviese algún tipo de influencia). El protocolo de limpieza consiste en limpiar dos veces con acetona la cuba, dejando un intervalo de 15 minutos entre cada lavado, y otras dos veces más con cloroformo, esperando 15 minutos también. Esto prepara la superficie de teflón de la cuba, haciéndola más hidrófoba. Después se procede al lavado con agua Milli-Q, llenando tres veces la cuba y eliminando el agua con ayuda de una trompa de vacío con el fin de eliminar posibles restos de contaminantes. Por último, se llena la cuba con agua creando un menisco convexo de unos 5 mm en la cuba. En paralelo al procedimiento de limpieza, se limpia con etanol el platillo de Wilhelmy (en nuestro caso papel de filtro), que una vez seco, se deja que se humedezca con agua Milli-Q. Antes de dispersar se realiza un blanco para asegurarnos que no queden restos de contaminantes que puedan interferir en nuestro experimento. Si al cerrar las barreras por completo los valores de presión superficial no superan los 3 mN·m⁻¹, el blanco se da por bueno, aunque se limpia la zona entre barreras con el succionador. Sin embargo, si supera esa presión, se comienza el proceso de limpieza desde un principio.

Cuando ya está preparada la cuba, se empieza a dispersar un volumen conocido de una concentración también exactamente conocida de una disolución del compuesto de interés. Para ello, se usa una microjeringuilla Hamilton de 1 mL, procurando que la presión superficial que marca la balanza al echar cada gota no supere 1 mN·m⁻¹. El disolvente donde está disuelto el compuesto de interés debe ser orgánico, volátil y con un coeficiente de extensión sobre el agua positivo y lo mayor posible. Una vez dispersado el material, se espera 15 minutos a que el disolvente se evapore y solo quede en la superficie nuestro compuesto. Al dispersar un material anfifílico, las partes polares se fijarán sobre en la superficie acuosa y las colas hidrofóbicas se dispondrán de forma desordenada, preferentemente sobre la superficie a áreas por molécula altas, aunque con cierta tendencia a alejarse de ésta.

A medida que se van cerrando las barreras, las moléculas del compuesto que se encontraban inicialmente dispersas en **fase gas, G**, se van comprimiendo y organizando en

la monocapa de Langmuir. Al comprimir van apareciendo interacciones de tipo Van der Waals entre las moléculas y las cadenas alquílicas se van elevando perpendicularmente a la interfase aire-agua. Cuando aparecen las interacciones entre las cadenas hidrocarbonadas, el material se encuentra en una fase de líquido **expandido (LE)**. A menores áreas por molécula, se produce un cambio de pendiente y pasamos a un **líquido condensado (LC)**, con un mayor empaquetamiento del tensoactivo. Si seguimos juntando aún más las barreras, aparece la **fase sólida (S)**, donde debido a la rigidez de la monocapa, la variación de π vs. A es muy marcada y forma una línea casi vertical.¹² Por último, puede ocurrir **el colapso de la monocapa**, donde el empaquetamiento de las moléculas es tal que se aplican unas sobre otras, dejando de ser una estructura ordenada. Todo esto está ilustrado en la **figura 4**.¹²

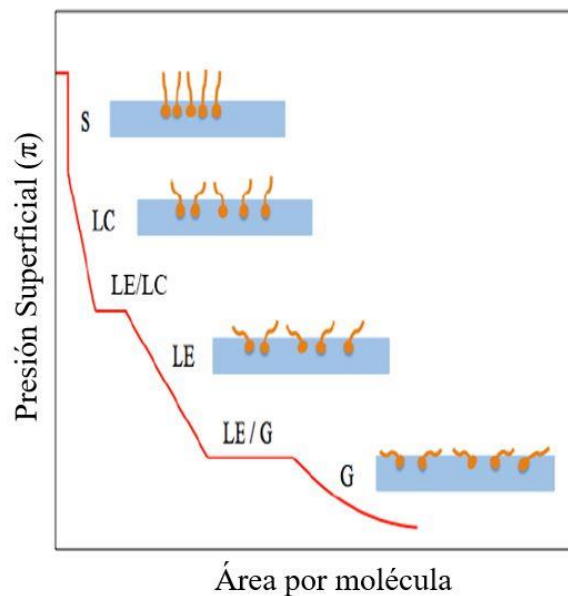


Figura 4. Isoterma de Langmuir de una sustancia anfifílica indicando sus distintos estados físicos. (Figura adaptada del artículo "Review on asphaltene films at air-water and oil-water interfaces")¹²

El área por molécula se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{área por molécula} = \frac{N_A N_o}{\text{Área de la cuba}} \quad (1)$$

donde N_o son los moles depositados del material sobre el agua, N_A el número de Avogadro= $6,022 \cdot 10^{23}$ átomos·mol⁻¹.

3.4.2 Microscopía de ángulo de Brewster (BAM)

El principio de microscopía de ángulo de Brewster se basa en el hecho de que en una interfase pura aire- agua, cuando incide un haz de luz p-polarizada, no produce reflexión y toda la luz es transmitida (el ángulo de Brewster cumple que $\text{tg } i = n_2/n_1$, en el caso del agua-aire, $i=53, 1^\circ$). Sin embargo, cuando la monocapa está presente en la interfase aire-agua (índice de refracción n_2), tendrá un gran efecto en la reflexión de la luz. Si se mantiene el

ángulo de incidencia original no se va a cumplir la condición del ángulo de Brewster y una pequeña parte de luz será reflejada. Este haz reflejado puede ser recogido por un detector y nos da gran información acerca de la homogeneidad de la monocapa sujeta a estudio.¹³

3.4.3 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

La microscopía de fuerza atómica es una técnica muy usada en diversos campos científicos. La mayor aplicación del AFM consiste en obtener imágenes de alta resolución de la topografía de una superficie a escala nanométrica, pudiéndola visualizar, medir e incluso manipular.¹⁴ Este instrumento cuenta con varios modos de operación, como por ejemplo, estáticos, dinámicos, *tapping* y de contacto entre otros.

El funcionamiento básico del AFM se basa en que una punta de un par de micras sujeta a una viga en voladizo, denominada *cantilever*, realiza un barrido por toda la superficie de nuestra muestra, recorriéndola línea por línea y creando la imagen en función de la posición. Este método es capaz de detectar si hay fuerzas de van der Waals, de tipo electrostático o repulsiones interelectrónicas a escala nanométrica.¹⁵ Las fuerzas de interacción entre la punta y la superficie causan deflexión del voladizo y estas son medidas por un fotodetector conectado a un software que interpreta la información y genera la imagen.

En el TFG el modo de trabajo empleado ha sido el de tipo *tapping* en la que el contacto es intermitente. El *cantilever* oscila durante el análisis y gracias a las diferencias en amplitud o fase de la vibración, se obtiene la imagen.

4.Resultados y discusión

En este apartado, se discutirán los resultados obtenidos en el laboratorio durante la realización del TFM correspondientes al estudio de las películas de gingerol y de sus correspondientes mezclas con colesterol y DPPC. Dado que no se encontró información bibliográfica acerca del gingerol en monocapas de Langmuir se comenzó realizando un estudio exhaustivo de sus propiedades superficiales. Se usaron de técnicas para la caracterización *in situ* durante el proceso de formación de las monocapas en la interfase aire-agua (isotermas de presión superficial vs. área por molécula y BAM). También se analizó la transferencia de las monocapas sobre soportes sólidos (películas LB) y la morfología de las mismas mediante AFM.

4.1 Fabricación y caracterización de las películas de Langmuir

4.1.1 Espectroscopia Ultravioleta-Visible: Ley de Lambert-Beer

La técnica de UV-vis se ha empleado para saber si el gingerol forma agregados a según qué concentraciones. Si esto fuera así, habría que asegurarse de trabajar a concentraciones en las que no hay agregados en disolución, ya que de otro modo no formaría monocapas homogéneas en la interfase aire-agua.

El gingerol presenta un máximo de absorbancia en 282 nm en cloroformo. Este resultado se encuentra en consonancia con el dato de $\lambda_{\text{máx}}$ reportado en la bibliografía, 280 nm en cloroformo. Esto indica que la transición se produce entre los orbitales π enlazante y π antienlazante, ($\pi \rightarrow \pi^*$) cuyo rango va de 200-700 nm (las transiciones entre $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ocurren a longitudes de onda más baja).

Un estudio de la absorbancia, Abs, a distintas concentraciones para el valor de absorbancia máxima permite obtener la absorptividad molar, ϵ :

$$Abs = \epsilon * l * c \quad (2)$$

Donde l es el paso óptico de la cubeta y c la concentración de la disolución. Se registraron espectros de gingerol a distintas concentraciones, en el intervalo $1 \cdot 10^{-4}$ a $1 \cdot 10^{-6}$ M. Para ver si cumplía la ecuación de Lambert-Beer, se representó la absorbancia máxima frente a las distintas concentraciones a la longitud de onda máxima. Si se cumple la linealidad, significa que el compuesto no forma agregados a esas concentraciones. Sin embargo, si se pierde dicha linealidad, el compuesto sí que los formará a partir de esa concentración. Por tanto, nos permite saber cuáles son las concentraciones de trabajo más adecuadas.

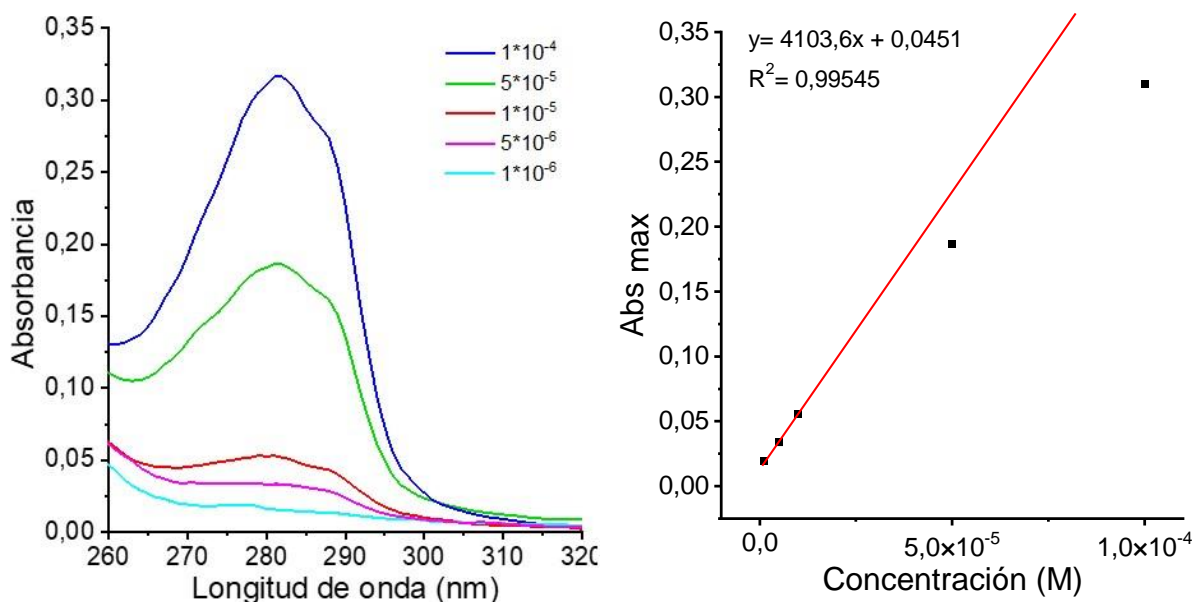


Figura 5. A la izquierda, absorbancia vs. longitud de onda (nm). A la derecha absorbancia máxima vs. distintas concentraciones.

Como se muestra en la **figura 5**, al representar los valores de absorptividad frente a concentración, se comprobó que cumple la Ley de Lambert-Beer en el rango de concentraciones menores a 10^{-5} . Con concentraciones más altas, se ve como se pierde la linealidad por la formación de agregados en el gingerol. Haciendo un ajuste por mínimos cuadrados y sabiendo que l , el paso óptico, es igual a 1 cm, se pudo calcular la absorptividad molar, $\epsilon = 4.100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ en cloroformo. Por ello, se decidió emplear una disolución de concentración $5 \cdot 10^{-6}$ M, ya que a esa concentración no hay agregados en la disolución.

4.1.2 Isotermas presión superficial y área por molécula

En primer lugar, se hicieron diversas pruebas para ver cuáles eran las condiciones óptimas de concentración y volumen a dispersar, asegurando que se obtienen isotermas reproducibles y con valores de área por molécula consistentes con lo esperado a partir de modelos moleculares. Tras varias pruebas, incluyendo la del apartado anterior, se determinó que las mejores condiciones consisten en comenzar el experimento a un área por molécula inicial de unos 472 nm² (es decir, dispersar 6 mL de una concentración de 5·10⁻⁶ M en CHCl₃ en la cuba doble). Con estos parámetros, la **figura 6** muestra una isoterma de gingerol reproducible.

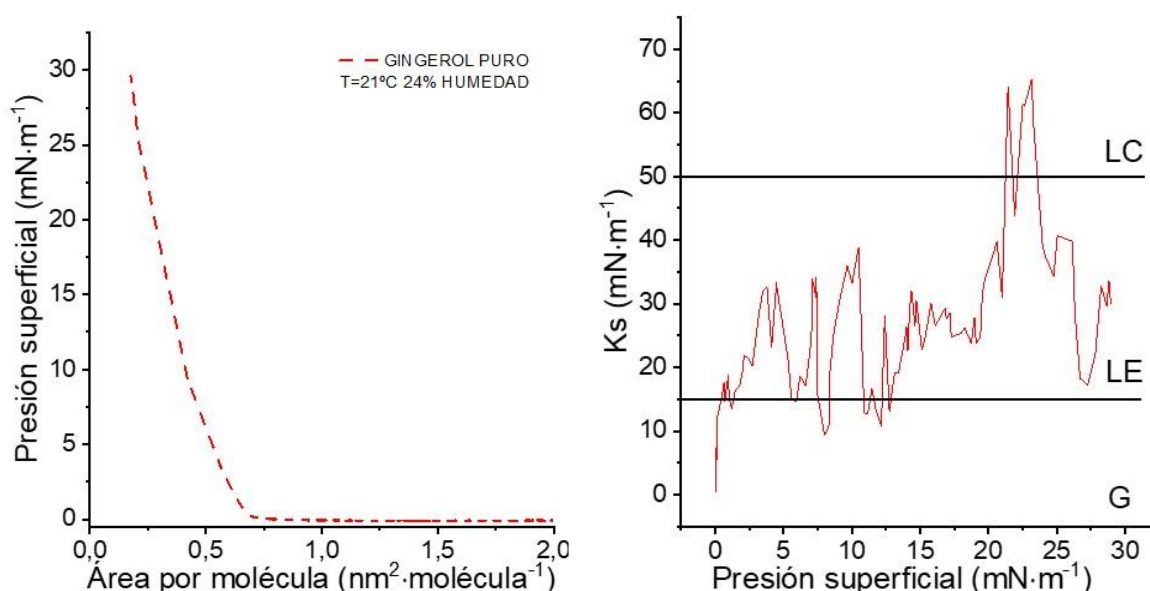


Figura 6. A la izquierda, la isoterma presión superficie vs. área por molécula de gingerol puro. T=21 °C y 24 % humedad. A la derecha, representación de la Ks vs. la presión superficial.

Para conocer mejor las distintas fases y transiciones de fase por las que pasa la monocapa de Langmuir a lo largo del proceso de compresión, se ha calculado el coeficiente de compresibilidad bidimensional, C_s, de acuerdo a la ecuación¹⁶:

$$C_s = -\frac{1}{A} \left(\frac{dA}{d\pi} \right)_T \quad (3)$$

donde A es el área y π es la presión superficial a una temperatura de 21 °C y 24% de humedad. Otro parámetro equivalente y con frecuencia más empleado, es el módulo de Young, K_s, que es la inversa de C_s.

$$K_s = -A \left(\frac{d\pi}{dA} \right)_T \quad (4)$$

Al representar el módulo de Young respecto a la presión superficial, **figura 6**, es posible obtener información adicional sobre las fases y transiciones de fase. Según la clasificación de Davies y Rideal, el líquido expandido se caracteriza por tener unos valores del módulo de Young entre 15 y 50 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ mientras que el estado de condensación es de 100 a 250 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Valores mayores a 250 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ corresponden al estado sólido.¹⁷

En la isoterma de gingerol el inicio de la subida de presión (habitualmente conocido como el “despegue” de la isoterma) comienza en un área de $0,7 \text{ nm}^2\cdot\text{molécula}^{-1}$. Hasta entonces, las moléculas se encuentran en **fase gas**, es decir, bastante separadas unas de otras y se mueven de forma independiente. La primera transición inicial se produce a los $2,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, se atribuye al cambio de fase gas a fase líquido expandido. La K_s ratifica esta interpretación, ya que una K_s menor que $15 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ corresponde a fase gas y mayores comenzaría la fase de líquido expandido. Las áreas por molécula varían desde $4,7 \text{ nm}^2$ a $0,6 \text{ nm}^2$. Después entramos en la **fase de líquido expandido**, bastante extensa en nuestro caso, ya que presentamos K_s entre 15 a $50 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ desde presiones superficiales de $2,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ hasta los $22 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. El área por molécula varía de los $0,6 \text{ nm}^2$ hasta los $0,28 \text{ nm}^2$. A partir de los $22 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ la monocapa se encuentra en fase de **líquido condensado**. La K_s oscila entre los $50 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ y alcanza un máximo de K_s de $68 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. La fase de LC corresponde al rango de presiones de 20 a $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. La caída en los valores de K_s a partir de ese máximo lo podemos asociar a la aparición de pequeños colapsos locales que dan lugar a estructuras 3D y suponen un aumento puntual de la compresibilidad bidimensional o disminución de K_s . La estructura química del gingerol nos permite explicar el por qué no llega a fases sólidas. El hecho de tener grupos dadores y aceptores de enlaces de hidrógeno, una cadena alquílica pequeña, y el sistema bencílico con orbitales perpendiculares π , contribuyen a la alta flexibilidad conformacional y a dar estructuras dinámicas de enlaces de hidrógeno, que favorecen la fluidez de la monocapa y hace que el gingerol no entre en fase sólida.

Estos resultados indican que el gingerol presenta actividad superficial, pudiendo obtenerse películas de Langmuir en la interfase aire-agua. A medida que se va comprimiendo la monocapa, podemos ver cómo el compuesto se reorganiza y va pasando por las distintas fases de forma controlada.

4.1.4 Microscopía del Ángulo de Brewster (BAM)

Para conocer mejor la organización bidimensional de la monocapa de gingerol, se usó la técnica de Microscopía del Ángulo de Brewster. Con esta técnica se puede obtener información acerca del comportamiento de la monocapa, pudiéndose visualizar la formación de la película y obtener imágenes a lo largo del proceso de compresión. Esta técnica complementa la información ya proporcionada por las isotermas de presión-área.

Se fueron tomando imágenes de las diferentes etapas de compresión del proceso. La **figura 7** muestra ejemplos representativos de éstas.

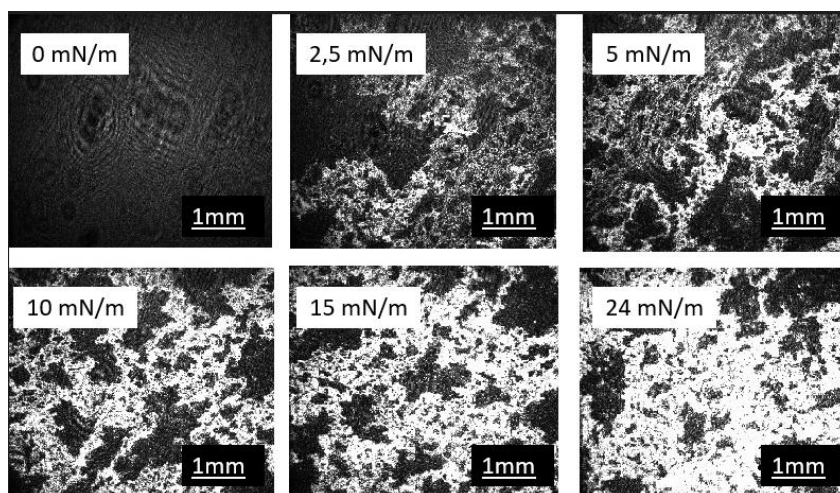


Figura 7. Imágenes BAM a distintas presiones registradas durante la compresión de una monocapa de gingerol a 21 °C y 33% humedad.

Como se observa en la **figura 7**, la fotografía del BAM registrada al comienzo de la isoterma cuando la presión es cero, es totalmente oscura. A medida que la isoterma avanza y se comprime, pasamos de imágenes oscuras a imágenes donde se observan dominios de todos grises o blanquecinos. La presencia de moléculas en la interfase aire-agua provoca un cambio en el índice de refracción (ángulo de Brewster diferente), produciendo un haz de luz reflejado que es captado por la cámara del dispositivo. Además, en este caso se aprecia un aumento gradual del brillo de la monocapa a medida que se comprime, lo que es consistente con un aumento del espesor de la monocapa (las moléculas de gingerol van colocándose más verticales respecto a la superficie acuosa al comprimir).¹⁸ Asimismo, las imágenes muestran una película homogénea y no se aprecia la formación de estructuras tridimensionales (3D).

Los resultados obtenidos para el gingerol en la interfase aire-agua nos llevan a concluir que este material forma isotermas de Langmuir reproducibles (siempre que nos aseguremos de trabajar con disoluciones muy diluidas), donde las moléculas de gingerol están predominantemente en fases expandidas y sólo a muy altas presiones se entra ligeramente en fase líquida condensada. En las condiciones de nuestros experimentos no se alcanza la fase sólida. Además, las monocapas de gingerol son homogéneas y no se aprecian agregados 3D a lo largo de su formación.

4.1.5 AFM

La microscopía de fuerza atómica puede usarse para obtener imágenes topográficas de las películas de Langmuir. Esto ofrece una visión muy directa de la morfología de la superficie con una alta resolución espacial¹⁶.

Para nuestro estudio se transfirieron monocapas de gingerol sobre un sustrato de mica a distintas presiones. Para realizar la transferencia se usó la cuba doble, empleando un brazo vertical que sostiene el sustrato, inicialmente sumergido en el agua, y que al alcanzar la presión objetivo asciende hasta el exterior, transfiriéndose así la monocapa de gingerol. A

presiones de 10 y 15 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (**figura 8**) se observa una monocapa bastante bien formada con ciertos agujeros cuyo número y tamaño va disminuyendo al aumentar la presión de transferencia.

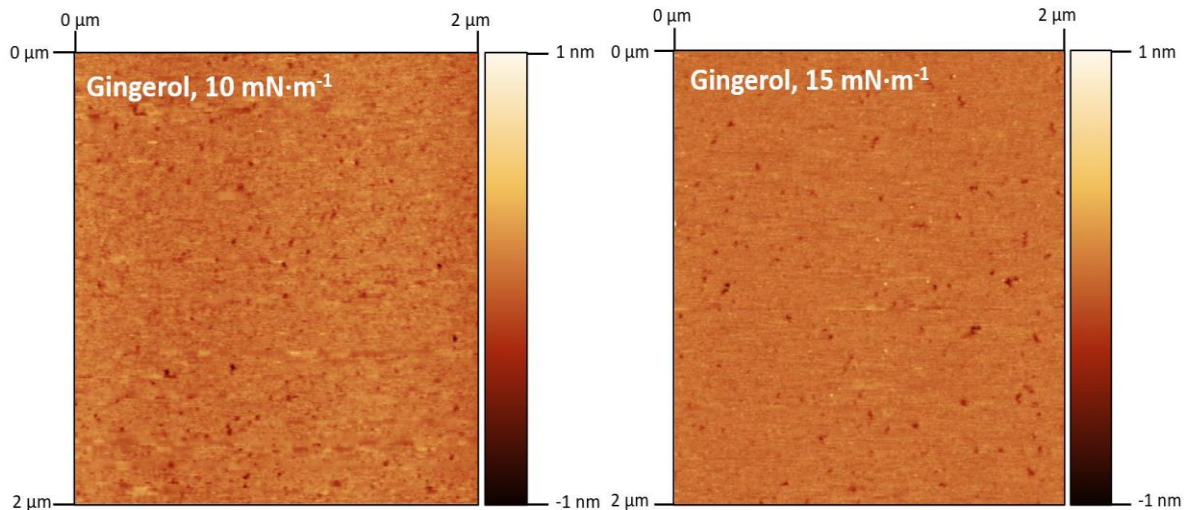


Figura 8. Imagen de AFM de la transferencia de gingerol a la presión de 10 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Tamaño de la imagen 2 μm x 2 μm (izquierda). Imagen de la transferencia de gingerol a presión de 15 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Tamaño de imagen 2 μm x 2 μm (derecha)

A una presión de 25 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, las imágenes obtenidas (ver un ejemplo representativo en la **figura 9.a**) muestran una película bastante homogénea, sin agujeros. Se ha seleccionado una imagen en la que se aprecia alguna zona relativamente grande sin cubrir que ha permitido determinar la altura de la película, que es de aproximadamente 1 nm, (ver perfil de alturas en la **figura 9.a**) lo que es compatible con la altura de una monocapa de gingerol. Por otro lado, se ven algunos agregados 3D sin ser muy abundantes, con alturas de unos pocos nanómetros (5-15 nm) (**figura 9.b**). Este resultado es consistente a su vez con los datos de K_s donde vimos que a presiones entre los 23 y 25 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ se alcanza un máximo y luego una disminución del módulo de Young, indicativo de algún colapso local. Si bien, también hay que considerar que esos colapsos locales pueden darse por el mero hecho de introducir un sustrato en la cuba, lo que supone la presencia de otra interfase. En el caso de las transferencias realizadas a 30 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, ya no se aprecian zonas sin cubrir en ninguna de las imágenes tomadas (**figura 10**), pero en este caso los agregados 3D tienen una altura mayor (del orden de unos 100 nm).

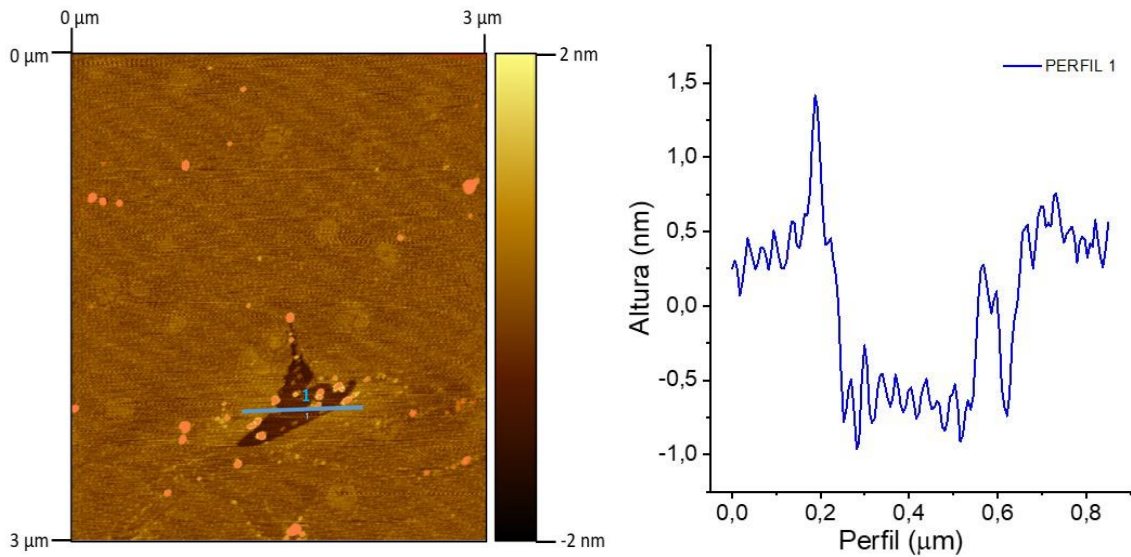


Figura 9.a. Imagen de AFM de la transferencia de gingerol a la presión de $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Tamaño de la imagen $3 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$ (izquierda). Perfil de la película (derecha)

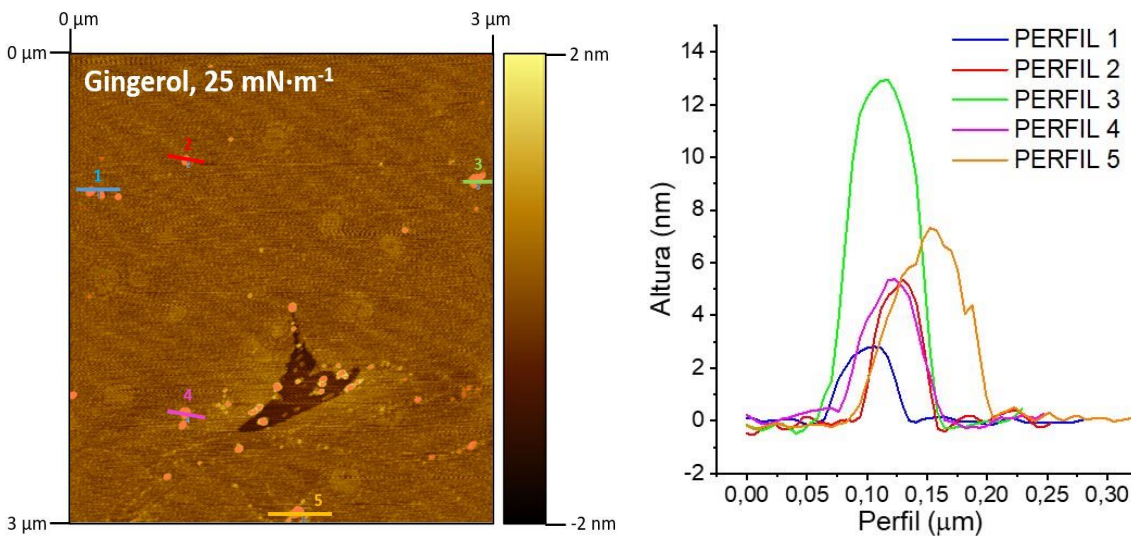


Figura 9.b. Perfiles adicionales de agregados 3D a la presión de $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$

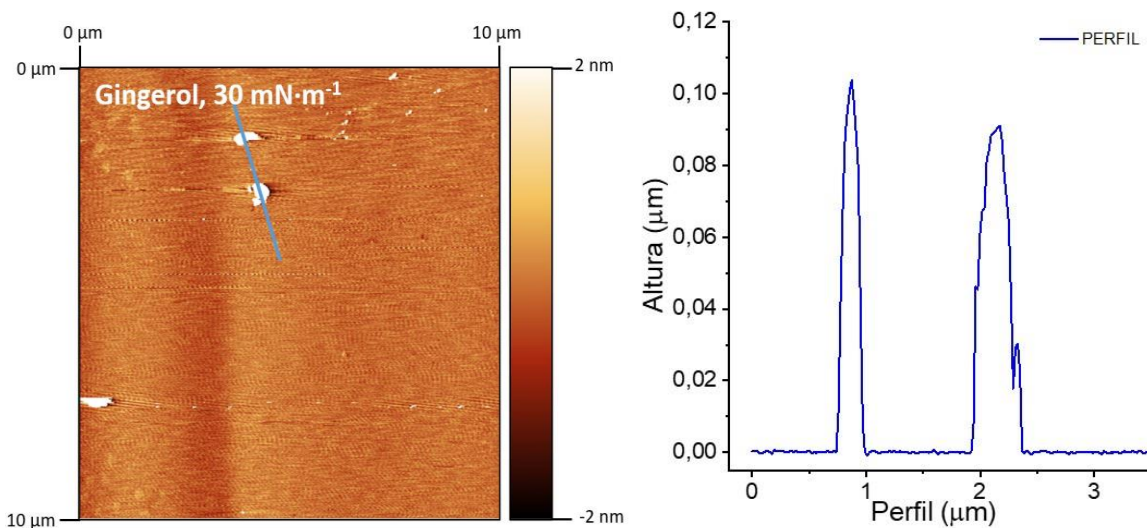


Figura 10. Imagen de AFM de la transferencia de gingerol a la presión de $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Tamaño de la imagen $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ (izquierda). Perfil de la película (derecha)

4.2 Miscibilidad gingerol-colesterol y gingerol-DPPC

Una vez acabado el estudio del 6-gingerol en la interface aire-agua y transferido sobre soportes sólidos, se procedió a estudiar la miscibilidad con dos compuestos muy abundantes en la membrana celular plasmática: el colesterol y el DPPC. Los componentes de una monocapa mixta, pueden ser miscibles, parcialmente miscibles o inmiscibles. Las isotermas de presión-área proporcionan información sobre la miscibilidad de los componentes. En una monocapa en la que sus componentes son inmiscibles, la monocapa que forme se podrá considerar como constituida por las monocapas de los componentes puros en equilibrio entre sí. El área de la película será igual a la suma de áreas que obtendríamos con las sustancias por separado.¹⁹ Por otro lado, en una monocapa mixta integrada por componentes totalmente miscibles se cumplirá que a una presión determinada:

$$A_{12} = A_1x_1 + A_2x_2 \tag{5}$$

Siendo A_{12} el área de la monocapa mixta, A_1 y A_2 , es el área de los componentes puros y x_1 y x_2 son las fracciones molares.

En concordancia con la **ecuación 5**, una forma de conocer la miscibilidad de la monocapa mixta, es representar A_{12} , en función de todo el rango de fracciones molares de un componente a una presión determinada. Esto dará una línea recta, área de mezcla ideal, que une los valores de área por molécula de los dos componentes puros tanto si éstos son inmiscibles como si son totalmente miscibles. Las desviaciones de la linealidad ponen en manifiesto la existencia de miscibilidad no ideal de los componentes de la mezcla. Estas desviaciones pueden ser debidas a interacciones atractivas entre los componentes (el área por molécula en la mezcla es menor que el área de mezcla ideal) o interacciones repulsivas (el área por molécula en la mezcla es mayor que el área de mezcla ideal).¹⁹

En primer lugar se realizaron las isotermas de presión-área del colesterol y el DPPC puros. Ambos componentes tuvieron las mismas condiciones de trabajo que cuando se trabajó con el 6-gingerol (6 mL a dispersar de una concentración de $5 \cdot 10^{-6}$ M en CHCl_3), consiguiéndose así que el número de moléculas inicial sea el mismo. Estos resultados, isotermas de la **figura 11**, se compararon con la literatura, obteniendo resultados acordes a lo publicado previamente.^{20 21}

4.2.1 Mezclas gingerol-colesterol

Se registraron las isotermas de mezclas binarias gingerol-colesterol para algunas fracciones molares. El número de moléculas iniciales se mantuvo constante y únicamente se cambió la proporción en la que estaban cada uno de los compuestos. Se usaron disoluciones de concentración $5 \cdot 10^{-6}$ M.

En la **figura 12** se puede comprobar que a medida que aumentamos la proporción de gingerol, se obtienen isotermas más comprimidas y la presión máxima que se obtiene es

menor, debido a que el gingerol no llega a presiones tan altas como el colesterol. Sin embargo, a fracciones molares altas de colesterol, las isothermas se parecen mucho más a las del componente puro.

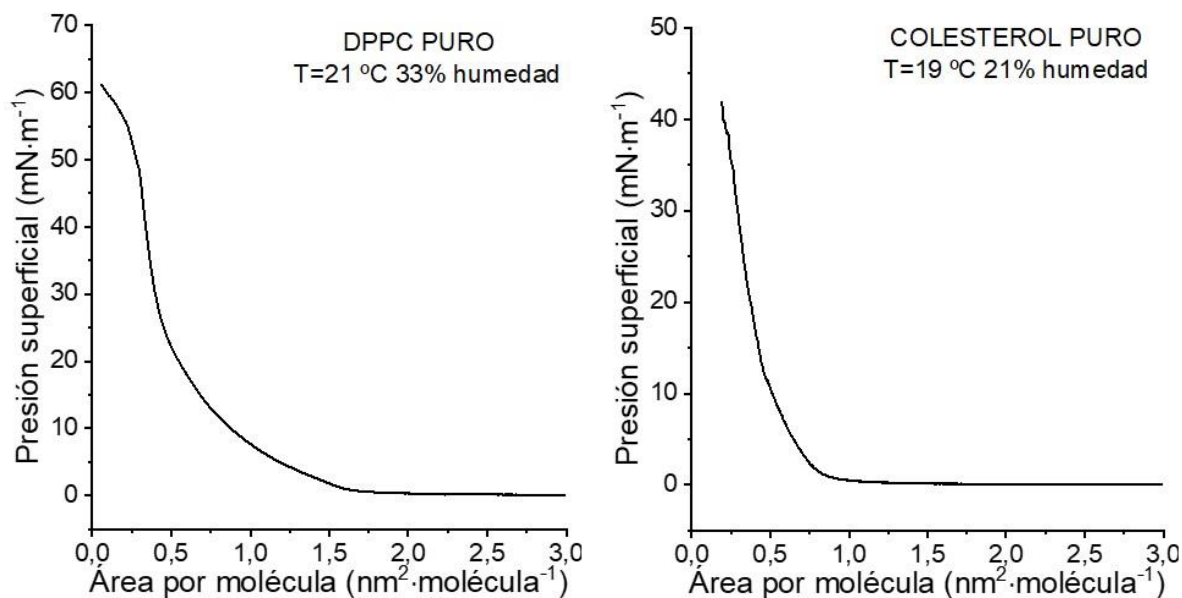


Figura 11. A la izquierda isoterma presión vs. área por molécula de DPPC puro a 21 °C y 33% de humedad. A la derecha, isoterma presión vs. área por molécula de colesterol puro a 19 °C y 21% de humedad.

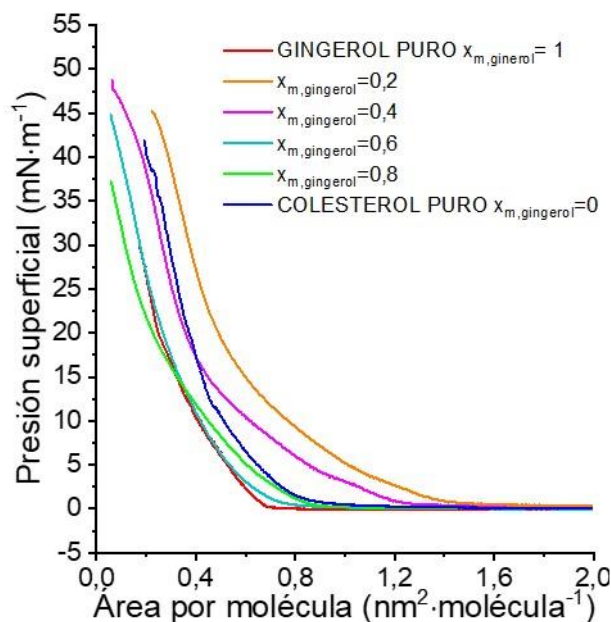


Figura 12. Isothermas presión vs. área por molécula para las mezclas gingerol-colesterol indicadas.

Después se representaron las áreas por molécula a las presiones superficiales de 5, 15 y 30 mN· m⁻¹, para las fracciones molares estudiadas. La línea recta que une x_{m,gingerol}=0 y x_{m,gingerol}=1, define cuál debería de ser el comportamiento ideal en las distintas mezclas

colesterol-gingerol. En la **figura 13** pueden apreciarse algunas desviaciones significativas de la idealidad, en particular a bajas presiones superficiales.

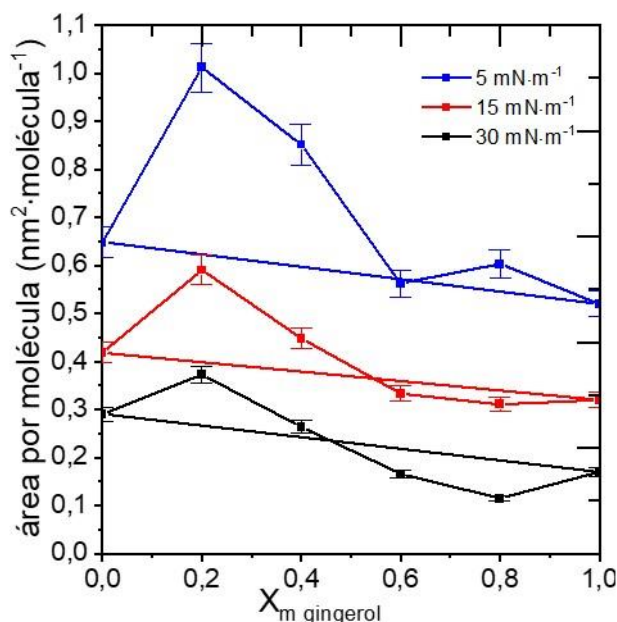


Figura 13. Representación del área por molécula colesterol-gingerol vs. fracción molar del gingerol a las presiones superficiales indicadas.

En la gráfica se observa que a medida que la monocapa está más comprimida y las presiones son mayores, se acerca más a la idealidad. A $5 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$, tenemos desviaciones positivas de la idealidad. Estas pueden ser indicativas de que la presencia de uno de los componentes puede dar lugar a la rotura de enlaces entre moléculas del mismo tipo (rotura de interacciones gingerol-gingerol o en su caso colesterol-colesterol) o interacciones repulsivas importantes entre el colesterol y el gingerol. En este caso, y dada la tendencia del gingerol a agregarse (ver las importantes desviaciones de Lambert-Beer) es posible que el colesterol induzca a la rotura de dichos agregados. A medida que aumenta la presión superficial, por ejemplo a $15 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$, las desviaciones positivas a la idealidad son mucho menos pronunciadas, siendo estas más significativas a fracciones molares bajas en gingerol ($X_{m, \text{gingerol}}=0,2$ y $X_{m, \text{gingerol}}=0,4$); es más, a fracciones molares más altas de gingerol las desviaciones de la idealidad son muy pequeñas y negativas señalando incluso la predominancia de interacciones ligeramente atractivas entre colesterol y gingerol. Por último, a presiones altas de $30 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$, es cuando las mezclas presentan áreas más similares a lo ideal. Posiblemente, a presiones altas, las moléculas están ya muy próximas unas a otras, fomentándose la agregación lateral entre ellas en el sistema 2D de modo que la rotura de enlaces de hidrógeno predominantes a presiones bajas ya no es tan significativa aquí.

4.2.2 Mezclas DPPC-gingerol

Seguidamente se realizó el mismo tratamiento de datos para la mezcla DPPC-gingerol, **figura 14**. La tendencia es la misma que la descrita previamente para las mezclas de colesterol-gingerol. Las mezclas de fracciones molares de $X_{m, \text{gingerol}}$ de 0,2 a 0,8 se encuentran comprendidas entre la isoterma de DPPC puro a la de gingerol puro. Se puede comprobar que conforme aumentamos la proporción de gingerol, las isotermas están más

comprimidas. Vuelve a pasar que la presión de colapso disminuye, debido a que el DPPC puro llega a presiones mucho mayores.

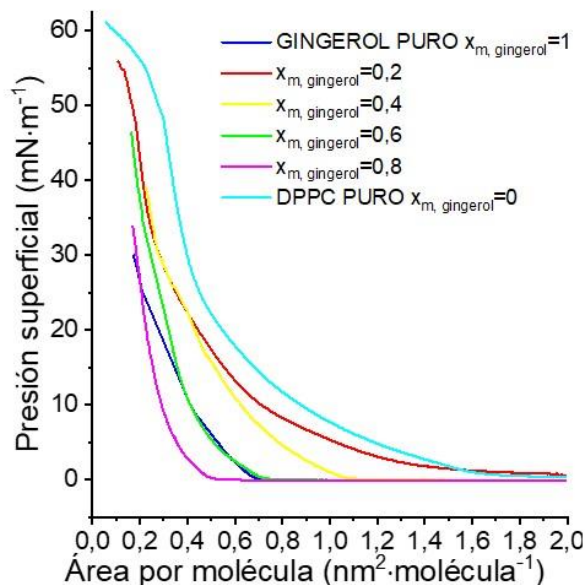


Figura 14. Isoterma presión vs. área por molécula para las mezclas gingerol-DPPC indicadas.

Representando el área por molécula frente a la fracción molar a distintas presiones, obtenemos la **figura 15**.

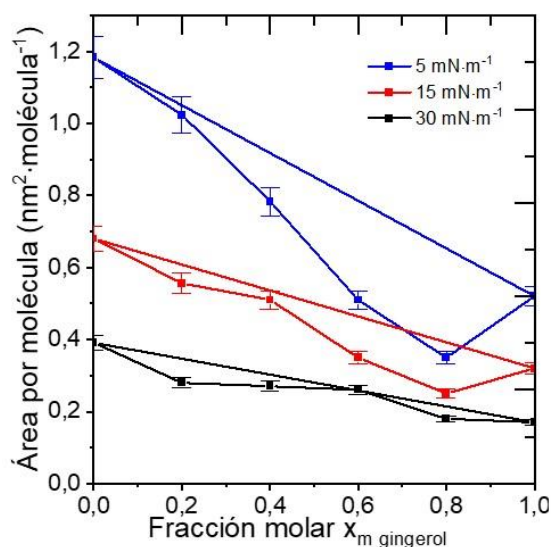


Figura 15. Representación del área por molécula DPPC-gingerol vs fracción molar de gingerol a las presiones superficiales indicadas.

Se observa nuevamente que a medida que aumentamos la presión, el comportamiento es más similar al ideal. Las áreas registradas en las mezclas DPPC-gingerol se encuentran por debajo de la línea, lo que quiere decir que las interacciones entre las moléculas son atractivas. Las mezclas presentan una cierta miscibilidad entre sus componentes.

Seguendo el estudio de las mezclas, se consideró de interés estudiar como varía el colapso según variamos la fracción molar de gingerol. Aquellas mezclas que son inmiscibles, suelen tener dos presiones colapsos correspondientes a la de los componentes puros, o también puede suceder que la presión de colapso es la misma que la del componente puro que presente un valor menor. Sin embargo, si la mezcla es miscible, las presiones de colapso estarán comprendidas entre las dos puras. Esto se puede explicar usando la **regla de Crisp**:

$$L = (C_V + C_S) - (F_V - F_S) + 3 \quad (6)$$

Siendo L el número de grados de libertad, C_V el número de componentes en fase volumen, C_S el número de componentes insolubles, F_V el número de fases volumen y F_S el número de fases superficiales aparen equilibrio.¹⁹ Cuando una monocapa cuyos componentes son miscibles alcanza el colapso, aparece la fase colapsada como adicional. De modo que siendo $C_V=2$ (agua y cloroformo) $C_S= 2$ (gingerol y colesterol o DPPC), $F_V=3$ (aire, agua y el colapso), da como resultado que los grados de libertad, L , son igual a:

$$L = 4 - F_S \quad (7)$$

Si los componentes de la mezcla son miscibles sólo habrá una fase en equilibrio, $F_S=1$, y por tanto tendrá 3 grados de libertad. Como trabajamos a una T y π constante en el laboratorio, la única variable que hay es la presión de colapso de la monocapa mixta. Es por ello que, si las mezclas son miscibles, la presión de colapso varía en función de la proporción de los componentes de la mezcla. Sin embargo, si los componentes de la mezcla son inmiscibles, $F_S=2$, los grados de libertad serán igual a $L=0$, siguiendo la **ecuación 6**. Por tanto, a una T y π constante, no hay variaciones en el sistema, y la presión de colapso va a ser independiente de la composición de la mezcla.²²

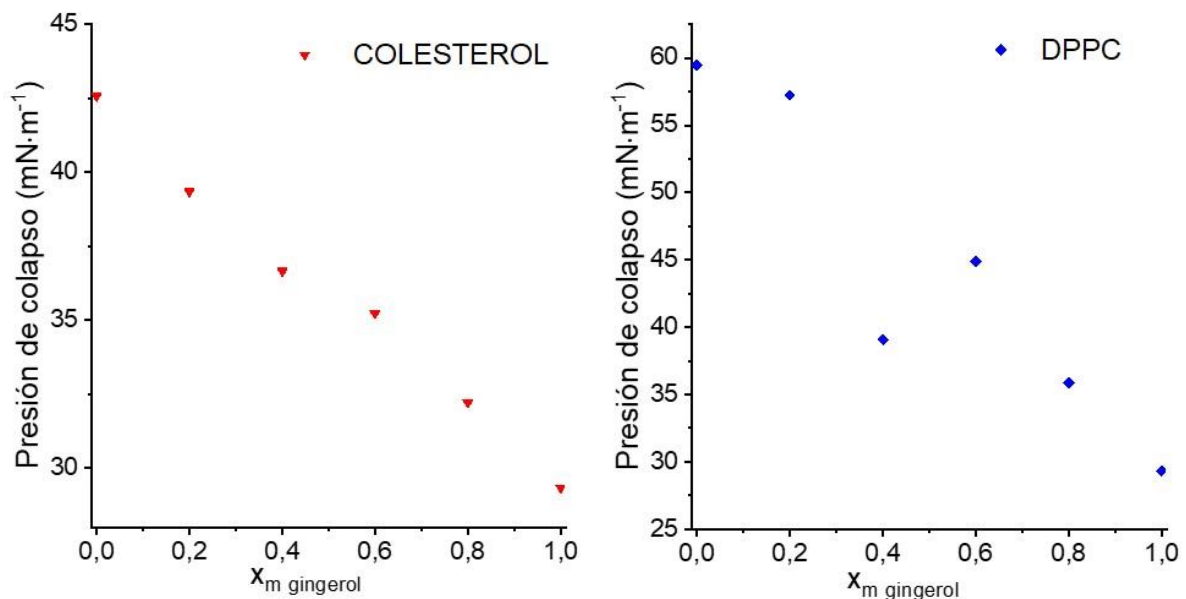


Figura 17. Representación de las presiones del colapso de las mezclas gingerol-colesterol (izquierda) y gingerol-PDDC (derecha) en función de fracciones la fracción molar.

En la **figura 17** se observa que las presiones de colapso varían en función a la cantidad de gingerol de la mezcla. Todas están comprendidas entre las de sus componentes

puros. El grado de libertad será igual a $L=1$, propio de las monocapas mixtas miscibles y se cumple la regla de Crisp antes descrita. Por tanto, se concluye que para las monocapas mixtas colesterol-gingerol, como DPPC-gingerol, las presiones de colapso parecen indicar que hay miscibilidad entre los componentes.

5. Conclusiones y perspectivas de futuro

En este TFG se han estudiado las propiedades físico-químicas del compuesto 6-gingerol mediante los modelos de Langmuir y Langmuir-Blodgett. Además, se ha realizado una primera aproximación en el estudio de su interacción con dos compuestos de la membrana plasmática, analizando su comportamiento a través de monocapas mixtas de colesterol-gingerol y DPPC-gingerol.

El primer paso de la investigación consistió en comprobar la reproducibilidad de las isotermas de gingerol y una vez encontradas las condiciones de trabajo ($5 \cdot 10^{-6}$ M en CHCl_3), se estudió el comportamiento y la morfología de las monocapas. Se ha determinado que el gingerol es capaz de formar monocapas en la interfase aire-agua a disoluciones diluidas, como indican las isotermas de presión-área por molécula donde las moléculas de gingerol están predominantemente en fases extendidas y sólo a muy altas presiones entran ligeramente en fase líquida condensada. Con el BAM y el AFM se obtuvo como resultado que el gingerol forma monocapas más homogéneas y sin agregados 3D a lo largo su formación.

En el estudio termoquímico de las mezclas binarias se ha determinado que tanto para las mezclas colesterol-gingerol y DPPC-gingerol, el gingerol es parcialmente miscible en todo el rango de fracciones molares. Esto se ha visto reflejado en las representaciones del área por molécula- x_m gingerol, con desviaciones de la línea de idealidad. Los resultados indican interacciones atractivas entre el gingerol, el DPPC y el colesterol (previsibles por su parte polar) cuanto mayor es la presión superficial. La miscibilidad del compuesto también se ha comprobado al obtenerse presiones de colapso comprendidas entre las del compuesto puro, cumpliéndose así la Ley de Crisp.

La realización de este TFG, me ha permitido aprender nuevas técnicas y métodos de trabajo. De esta manera, se ha comenzado un estudio preliminar a una investigación global que incluiría cálculos más rigurosos (por ejemplo, en las mezclas realizar el cálculo de la energía de Gibbs, ΔG_m , y la energía de Gibbs de exceso, ΔG_m^E) o un mayor número de experimentos, lo cual excede las horas planteadas para un TFG. Por tanto, como perspectivas de futuro podría completarse el sistema binario con las fracciones molares restantes de las mezclas DPPC-gingerol y colesterol-gingerol y seguidamente realizar un estudio ternario completo colesterol:DPPC:gingerol. También se podrían estudiar otros fosfolípidos y esteroides de la membrana plasmática, glúcidos o proteínas. Así se obtendría una idea más realista de la interacción del gingerol con los componentes que la forman, ya que en TFG hemos tenido que hacer una aproximación a sólo dos componentes.

6. Bibliografía

- (1) Wnętrzak, A., Łątka, K., & Dynarowicz-Łątka, P. Interactions of alkylphosphocholines with model membranes-the Langmuir monolayer study. *The Journal of membrane biology*, **2013** 246(6), 453–466. <https://doi.org/10.1007/s00232-013-9557-4>
- (2) Taulavuori, K.; Julkunen-Tiitto, R.; Hyöky, V.; Taulavuori, E. Blue Mood for Superfood. *Nat. Prod. Commun.* **2013**, 8 (6), 1934578X1300800627. <https://doi.org/10.1177/1934578X1300800627>.
- (3) Nakazawa, T.; Ohsawa, K. Metabolism of [6]-Gingerol in Rats. *Life Sci.* **2002**, 70 (18), 2165–2175. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01551-X](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01551-X).
- (4) Nair, K. P. *Turmeric (Curcuma Longa L.) and Ginger (Zingiber Officinale Rosc.) - World's Invaluable Medicinal Spices: The Agronomy and Economy of Turmeric and Ginger*; Springer International Publishing: Cham, **2019**. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-29189-1>.
- (5) Joshi, D.; Srivastav, S. K.; Belemkar, S.; Dixit, V. A. Zingiber Officinale and 6-Gingerol Alleviate Liver and Kidney Dysfunctions and Oxidative Stress Induced by Mercuric Chloride in Male Rats: A Protective Approach. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, 91, 645–655. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.108>.
- (6) Wei, C.-K.; Tsai, Y.-H.; Korinek, M.; Hung, P.-H.; El-Shazly, M.; Cheng, Y.-B.; Wu, Y.-C.; Hsieh, T.-J.; Chang, F.-R. 6-Paradol and 6-Shogaol, the Pungent Compounds of Ginger, Promote Glucose Utilization in Adipocytes and Myotubes, and 6-Paradol Reduces Blood Glucose in High-Fat Diet-Fed Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18 (1), 168. <https://doi.org/10.3390/ijms18010168>.
- (7) Wang, S.; Zhang, C.; Yang, G.; Yang, Y. Biological Properties of 6-Gingerol: A Brief Review. *Nat. Prod. Commun.* **2014**, 9 (7), 1934578X1400900736. <https://doi.org/10.1177/1934578X1400900736>.
- (8) Zhang, F.; Ma, N.; Gao, Y.-F.; Sun, L.-L.; Zhang, J.-G. Therapeutic Effects of 6-Gingerol, 8-Gingerol, and 10-Gingerol on Dextran Sulfate Sodium-Induced Acute Ulcerative Colitis in Rats: Therapeutic Effects of Gingerols on Ulcerative Colitis. *Phytother. Res.* **2017**, 31 (9), 1427–1432. <https://doi.org/10.1002/ptr.5871>.
- (9) Videv, P.; Mladenov, N.; Andreeva, T.; Mladenova, K.; Moskova-Doumanova, V.; Nikolaev, G.; Petrova, S.; Doumanov, J. Condensing Effect of Cholesterol on HBest1/POPC and HBest1/SM Langmuir Monolayers. *Membranes* **2021**, 11 (1), 52. <https://doi.org/10.3390/membranes11010052>.

- (10) Toimil, P.; Prieto, G.; Miñones Jr, J.; Sarmiento, F. A Comparative Study of F-DPPC/DPPC Mixed Monolayers. Influence of Subphase Temperature on F-DPPC and DPPC Monolayers. *Phys Chem Chem Phys* **2010**, *12* (40), 13323–13332. <https://doi.org/10.1039/C0CP00506A>.
- (11) Ładniak, A., Jurak, M. & Wiącek, A.E. Langmuir monolayer study of phospholipid DPPC on the titanium dioxide–chitosan–hyaluronic acid subphases. *Adsorption* **2019**, *25*, 469–476. <https://doi.org/10.1007/s10450-019-00037-1>
- (12) Tata, Y.; Salazar Rodríguez, F.; Forgiarini, A.; Delgado-Linares, J.; Bullon, J. Review on Asphaltene Films at Air-Water and Oil-Water Interfaces. **2018**. *INGENIERIA UC*, vol. 25, pp. 120-133.
- (13) Joshi, B.; Khatavkar, R.; Iyer, N. Brewster Angle Microscope – An Excellent Tool for Nanoscience Researchers. *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Nano-Met. Chem.* **2006**, *36* (2), 227–229. <https://doi.org/10.1080/15533170500524785>.
- (14) Gołek, F.; Mazur, P.; Ryszka, Z.; Zuber, S. AFM Image Artifacts. *Sel. Pap. 6th Int. Workshop Surf. Phys. "Functional Mater.* **2014**, *304*, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.01.149>.
- (15) García, A.; Kikut Cruz, K. Microscopía de fuerza atómica como herramienta en la investigación de asfaltos. *Infraestruct. Vial* **2020**, *22*, 20–27.
- (16) Villares, A.; Lydon, D. P.; Porrès, L.; Beeby, A.; Low, P. J.; Cea, P.; Royo, F. M. Preparation of Ordered Films Containing a Phenylene Ethynylene Oligomer by the Langmuir–Blodgett Technique. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (25), 7201–7209. <https://doi.org/10.1021/jp072052h>.
- (17) Jurak, M.; Szafran, K.; Cea, P.; Martín, S. Analysis of Molecular Interactions between Components in Phospholipid-Immunosuppressant-Antioxidant Mixed Langmuir Films. *Langmuir* **2021**, *37* (18), 5601–5616. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c00434>.
- (18) Girardon, M.; Korchowiec, B.; Korchowiec, J.; Rogalska, E.; Canilho, N.; Pasc, A. A Way to Introducing a Hydrophilic Bioactive Agent into Model Lipid Membranes. The Role of Cetyl Palmitate in the Interaction of Curcumin with 1,2-Dioleoyl-Sn-Glycero-3-Phosphatidylcholine Monolayers. *J. Mol. Liq.* **2020**, *308*, 113040. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113040>.
- (19) Fidalgo Rodríguez, J. L. Interacciones en monocapas de colesterol con ácidos grasos saturados e insaturados (omega-3, omega-6 y omega-9). **2016**. <http://hdl.handle.net/10347/14627>
- (20) Hao, C.; Li, J.; Mu, W.; Zhu, L.; Yang, J.; Liu, H.; Li, B.; Chen, S.; Sun, R. Adsorption Behavior of Magnetite Nanoparticles into the DPPC Model Membranes. *Appl. Surf. Sci.* **2016**, *362*, 121–125. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.11.173>.

- (21) Barnaba, C., García-Alvarado, M.A., Medina-Meza, I.G., & Tejero-Andrade, J.M.. **2013** Langmuir adsorption isotherms for different organic solutions of cholesterol. *Revista mexicana de ingeniería química*, 12(2), 283-292. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382013000200008&lng=es&tlng=en.
- (22) Malcolm, B. R. Studies of the Flow of Molecular Monolayers during Compression and the Effect of a Plateau in the Pressure-Area Curve. *Thin Solid Films* **1985**, 134 (1), 201–208. [https://doi.org/10.1016/0040-6090\(85\)90132-4](https://doi.org/10.1016/0040-6090(85)90132-4).