

Trabajo de Fin de Grado

Fabricación de membranas celulares artificiales y
evaluación de sus propiedades para aplicaciones en
el campo de la salud.

Autora

Lara Adwan Al Chihabi

Directoras

Pilar Cea Mingueza

Laura Dotor Delgado

Departamento de Química Física

Facultad de Ciencias

Universidad de Zaragoza

2022-2023

Índice

1	Objetivos	1
2	Introducción	1
3	Parte experimental.....	3
3.1	Materiales	3
3.2	Equipos e instrumentos	4
3.3	Métodos.....	4
3.3.1	Técnica de Langmuir y Langmuir-Blodgett	4
3.3.2	Mezclas y cálculos termodinámicos.....	6
3.3.3	Microscopía de fuerza atómica (AFM)	8
4	Resultados y discusión	8
4.1	Experimentos con [6]-Gingerol.....	8
4.1.1	Espectroscopía UV-Vis.....	8
4.1.2	Isoterma: optimización de las condiciones.....	9
4.1.3	Estudios de estabilidad y reversibilidad	10
4.2	Monocapas monocomponente.....	11
4.3	Monocapas mezclas binarias	13
4.4	Monocapas mezclas ternarias.....	14
4.4.1	Estudio ternario	18
4.5	AFM	21
4.5.1	[6]-Gingerol.....	21
4.5.2	GING-CHOL.....	22
4.5.3	GING-DPPC.....	23
5	Resumen y conclusiones	23

Resumen

Una gran parte de los medicamentos comercializados en la actualidad actúan directamente sobre componentes de la membrana celular. Sin embargo, debido a su complejidad resulta muy difícil realizar estudios de la membrana celular mediante métodos directos. Por ello se recurre al uso de modelos que mimeticen su comportamiento. En este TFG, se utiliza la técnica de Langmuir y Langmuir-Blodgett para la fabricación de monocapas (membranas celulares simuladas) a partir de colesterol y DPPC para el posterior estudio de su interacción con un xenobiótico de gran interés debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antitumorales: [6]-Gingerol. A partir de la información extraída de las isotermas de presión superficial-área por molécula (π -A) en la interfase aire-agua obtenidas a partir de diversas mezclas binarias y ternarias de [6]-Gingerol con colesterol y DPPC, se han realizado estudios termodinámicos para discernir las mezclas de mayor miscibilidad y estabilidad termodinámica. En concreto, las mezclas con contenido en CHOL-DPPC en proporción 0,5:0,5 a una presión superficial de $30 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ son de interés biológico, ya que simulan el entorno membranal en células eucariotas. Al considerar que la mezcla de CHOL-DPPC se trata de una única entidad molecular, se ha obtenido que la mezcla más favorecida termodinámicamente es $\chi_{\text{GING}}-\chi_{\text{DPPC}}-\chi_{\text{CHOL}}=0,5-0,25-0,25$. Por otro lado, considerando los compuestos como tres entidades moleculares distintas, se obtiene que la mezcla ternaria termodinámicamente más estable es $\chi_{\text{GING}}-\chi_{\text{DPPC}}-\chi_{\text{CHOL}}=0,7-0,15-0,15$. Finalmente, el estudio de determinadas mezclas binarias de GING-CHOL y GING-DPPC mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) muestran la topología de las películas, que se correlacionan con los resultados obtenidos a partir de los cálculos termodinámicos.

Nowadays, most commercialized drugs target the components of the cell membrane. Nevertheless, due to the complexity of the membrane's structure, one encounters many difficulties directly studying such membranes. For this reason, artificial model cell membranes are used. In this project, Langmuir and Langmuir-Blodgett techniques are used to prepare monolayers made out of cholesterol and DPPC, to further study its interaction with a biologically interesting xenobiotic due to its reported antioxidant, anti-inflammatory and antitumoral properties: [6]-Gingerol. Thermodynamic studies using the data retrieved from pressure-area per molecule (π -A) isotherms at the air-water interface from various binary and ternary [6]-Gingerol, cholesterol and DPPC mixes are carried out in order to figure out the mixtures with the highest thermodynamic stability. In particular, mixtures containing CHOL-DPPC in a 0,5:0,5 ratio at a surface pressure of $30 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ are of biological importance because layers incorporating this mixture simulate eukaryotic cell membranes. If the CHOL-DPPC mixture is considered a unique molecular entity, the highest thermodynamic stability ternary mixture obtained is that of $\chi_{\text{GING}}-\chi_{\text{DPPC}}-\chi_{\text{CHOL}}=0,5-0,25-0,25$. Meanwhile, considering all three compounds as individual molecular entities, mixtures containing $\chi_{\text{GING}}-\chi_{\text{DPPC}}-\chi_{\text{CHOL}}=0,7-0,15-0,15$ are the most favoured from a thermodynamic point of view. Finally, by means of Atomic Force Microscopy (AFM), morphology images were obtained of selected binary GING-CHOL and GING-DPPC films, which further support the conclusions from the thermodynamic studies conducted.

1 Objetivos

Este TFG presenta una naturaleza esencialmente académica, ya que en él se consolidan competencias características de un Graduado en Química. Algunas de las competencias más relevantes a desarrollar por la estudiante son el trabajo responsable y autónomo en el laboratorio, el pensamiento crítico y científico, la resolución de problemas, la búsqueda de bibliografía científica y la comunicación de los resultados tanto de forma oral como escrita. La aplicación de dichos conocimientos y habilidades adquiridos permiten a la estudiante introducirse en el ámbito de la investigación, en este caso concreto, en el de la nanobiotecnología.

Por otro lado, este trabajo desarrolla una investigación en el laboratorio, por lo que presenta además una serie de objetivos científicos. Estos son el modelado de membranas celulares artificiales mediante la técnica de Langmuir-Blodgett, y el estudio de estas en presencia de [6]-Gingerol con la obtención de información sobre interacciones moleculares y propiedades de mezcla. En consecuencia, con este trabajo se adquieren conocimientos sobre la fabricación de bicapas que simulan membranas celulares, técnicas de caracterización de materiales, como la microscopía de fuerza atómica (AFM), así como de estudios termodinámicos aplicados a la interfase aire-agua.

2 Introducción

Las membranas celulares son estructuras esenciales en los seres vivos. Actúan como barreras flexibles, preservando y delimitando a las células, y controlan el transporte de moléculas a través de estas. Son selectivamente permeables a moléculas polares. Como consecuencia, la membrana celular juega un papel muy importante en los procesos celulares. Sus principales componentes son fosfolípidos, proteínas, glúcidos y colesterol. Su estructura consiste en una bicapa lipídica debido a la naturaleza anfipática de los lípidos. Así, las cabezas hidrófilas de las cadenas lipídicas quedan en el exterior de la bicapa, y los cuerpos hidrófobos en el interior.¹

Un estudio realizado en Estados Unidos en 2006 revela que más del 60% de los medicamentos comercializados actúan directamente sobre componentes de la membrana plasmática.² Es por ello por lo que conocer y comprender los mecanismos de interacción de la membrana con otras moléculas de interés, como proteínas o fármacos, es fundamental para el desarrollo de nuevos medicamentos y terapias. Estos sistemas también podrían ser utilizados para el estudio de los efectos de virus y de citotoxicidad en la membrana celular.³

Debido a la complejidad de la membrana celular, su extracción y estudio resulta complicado mediante métodos directos. Es por ello por lo que en la literatura frecuentemente se recurre a membranas celulares artificiales que mimeticen el comportamiento de esta en organismos vivos. Existen diversos modelos de sistemas de membranas celulares, entre ellos las monocapas de Langmuir, las películas de Langmuir-Blodgett (LB) y Langmuir-Schaefer (LS); siendo una de sus principales ventajas el control sobre el empaquetamiento de las moléculas elegidas, de manera que es posible definir la densidad molecular variando el área por molécula a partir de una cuba de Langmuir.⁴⁻⁷

En este trabajo, se fabrican membranas artificiales a partir de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y colesterol mediante la técnica de Langmuir y Langmuir-Blodgett, para estudiar a continuación su interacción con un xenobiótico proveniente del jengibre: [6]-Gingerol.

El jengibre (*Zingiber officinale*) es una planta de la familia de las zingiberáceas que se ha utilizado como de condimento culinario y en el tratamiento de diversas molestias y enfermedades en China e India desde hace más de 5000 años.⁸ En las últimas décadas, la investigación de efectos terapéuticos de alimentos basados en plantas y de especias ha aumentado, siendo uno de estos alimentos el jengibre.

Se han distinguido un mínimo de 14 compuestos bioactivos en el jengibre. En concreto, los compuestos más estudiados en la bibliografía son el [6]-Gingerol y [6]-Shogaol, por ser los mayoritarios.⁸ Diversos trabajos han demostrado que [6]-Gingerol es un compuesto con propiedades antiinflamatorias, antioxidativas y antitumorales, por lo que es una sustancia de alto interés científico.⁸⁻¹²

Para estudiar la interacción de este xenobiótico con la membrana plasmática, se ha seleccionado la dipalmitoilfosfatidilcolina (DDPC) y el colesterol como componentes de la membrana celular simulada. El DPPC es un compuesto importante de las membranas celulares, siendo el componente mayoritario en surfactantes pulmonares. Se ha elegido en este trabajo dado que es el principal fosfolípido utilizado en la fabricación de modelos de membranas celulares debido a su naturaleza inerte y a su carga neutra.¹³ Por otro lado, el colesterol es un componente esencial en la membrana celular, ya que regula la fluidez y el orden de esta. En concreto, influye en la organización lateral de los lípidos en la membrana.^{14,15}

Las propiedades físico-químicas y las estructuras de los compuestos utilizados en el estudio de este TFG, que definen la interacción entre estos, se recogen en la **Tabla 1** y en la **Figura 1**, respectivamente.

Tabla 1. Propiedades físico-químicas del [6]-Gingerol, DPPC y colesterol.¹⁶⁻¹⁸

Propiedad	[6]-Gingerol	DPPC	Colesterol
Fórmula molecular	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	C ₄₀ H ₈₀ NO ₈ P	C ₂₇ H ₄₆ O
Masa molecular (g/mol)	294,4	734,0	386,7
Aspecto	Sólido blanco	Sólido blanco	Sólido blanco
Log P _{octanol/agua}	2,5	13,5	8,7
Estructura	Beta-hidroxicetona, anillo p-fenólico, 1 estereocentro	Fosfolípido, 1 estereocentros	Esterol, 8 estereocentros
Carga formal	0	0	0
Nº átomos donores de enlaces de H	2	0	1
Nº átomos aceptores de enlaces de H	4	8	1
Nº enlaces rotables	10	40	5

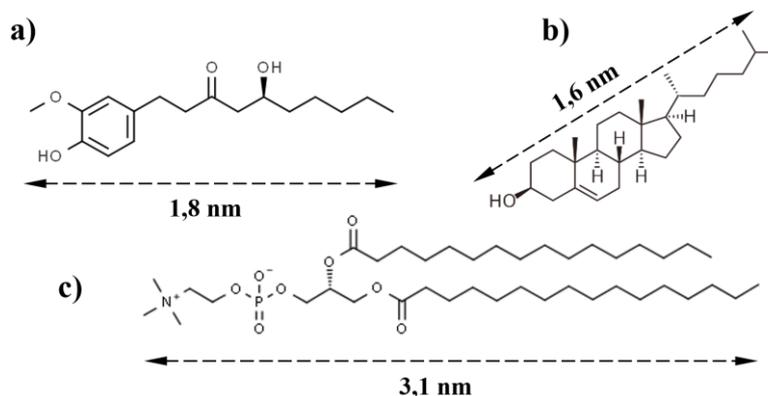


Figura 1. Estructuras de a) [6]-Gingerol ((5S)-5-hidroxi-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)decan-3-ona); b) colesterol ((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-[(2R)-6-metilheptan-2-il]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ol); c) DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina) respectivamente. Valores obtenidos con Avogadro: an open-source molecular builder and visualization tool.¹⁹ Versión 1.2.0. Disponible en <http://avogadro.cc/>

Tras una extensa búsqueda bibliográfica, no hemos localizado estudios sobre el [6]-Gingerol con la técnica de Langmuir ni de su actividad superficial en la literatura. Se dispone solamente de un TFG llevado a cabo por una compañera el curso anterior²⁰, donde se estudió el [6]-Gingerol en sistemas binarios, siendo por ello este trabajo una extensión de aquel. Así, se toma de referencia su TFG como un estudio preliminar del compuesto. No obstante, la presencia de distintos factores (instrumentales, condiciones de temperatura y humedad, utilización de lotes distintos de los compuestos) hacen necesaria la repetición de algunos experimentos preliminares. En este TFG, se extenderá el estudio a sistemas ternarios consiguiendo de esta forma una visión mucho más amplia del comportamiento del [6]-Gingerol en el entorno membranal.

3 Parte experimental

3.1 Materiales

Se diluyen 10 mg de [6]-Gingerol ($\geq 98\%$ (HPLC), Sigma-Aldrich, CAS 23513-14-6) en cloroformo ($\geq 99,8\%$, Macron Fine Chemicals, CAS 67-66-3) obteniendo una disolución madre de concentración $6,9 \cdot 10^{-4}$ M. Esta se somete a ultrasonidos durante 5 minutos antes de su uso para la preparación de disoluciones diluidas de [6]-Gingerol de concentración 10^{-5} M. Por otro lado, se preparan disoluciones de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, CAS 63-89-8) y de colesterol ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, CAS 57-88-5) también en cloroformo, de concentración 10^{-5} M. Para preparar las mezclas, se toman los volúmenes correspondientes de las disoluciones preparadas de concentración 10^{-5} M de cada compuesto.

Para la limpieza de la cuba se utiliza acetona ($\geq 99,5\%$, Sigma-Aldrich, CAS 67-64-1), cloroformo y agua Milli Pore Milli-Q proveniente del destilador del edificio I+D+i en el Campus Río Ebro (resistividad de $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$). Las barreras de la cuba se limpian con acetona y agua Milli-Q. La subfase para todos los experimentos en la cuba es agua Milli-Q.

Para la preparación de películas de Langmuir-Blodgett se utilizan sustratos de mica moscovita proveniente de Electron Microscopy Sciences (Cat. #71851-05, tamaño de las láminas: 25 x 75 mm, grosor: 0,26 – 0,31 mm) que previamente son exfoliados mediante celo y lavados con etanol ($\geq 99,5\%$, Laboaragón, CAS 64-17-5).

3.2 Equipos e instrumentos

- Cuba KSV Nima KN 2003 de dimensiones 580 x 145 mm² (área efectiva entre las barreras: 536 x 145 mm²). Consta de dos brazos móviles y un brazo para las transferencias de las monocapas sobre un sustrato.
- Espectrofotómetro UV Varian Cary 50 Bio. Consta de un monocromador Czerny-Turner, haz doble, lámpara de xenón y un rango de longitudes de onda 190-1100 nm. Cubeta de cuarzo de 1 cm.
- Microscopio de fuerza atómica (AFM) del Laboratorio de Microscopías avanzadas (LMA) de la Universidad de Zaragoza: Multimode 5 (Bruker), de la casa Veeco-Bruker, con unidad de control Nanoscope V (Bruker), cantilevers RTESPA-150 (Bruker), con una constante de Spring nominal de 6 N·m⁻¹ y resonancia de 150 kHz.
- Microbalanza Radwag MYA 5/2Y.
- Microjeringuillas Hamilton de 1 mL.
- Baño de ultrasonidos.

3.3 Métodos

3.3.1 Técnica de Langmuir y Langmuir-Blodgett

La técnica de Langmuir permite la obtención de monocapas en la interfase aire-agua. Esto se realiza en una cuba de unos pocos milímetros de profundidad que se llena con un disolvente (generalmente agua), denominándose subfase. En los extremos de la cuba se disponen dos brazos móviles, y en el centro de la cuba se coloca una balanza de Wilhelmy, que registra medidas de presión superficial (π). Esta se define según la **Ecuación 1**:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (1)$$

donde γ_0 es la tensión superficial del líquido contenido en la subfase (agua) y γ es la tensión superficial de la subfase cubierta por las moléculas inyectadas sobre su superficie.

Mediante una microjeringuilla, se dispersan sobre la superficie de la subfase las moléculas del compuesto o compuestos de los que se desee obtener la monocapa (compuestos de naturaleza anfipática). El disolvente en el que esté disuelto el compuesto de interés debe ser volátil e insoluble en la subfase, así como tener un coeficiente de dispersión, S , positivo sobre el líquido de la subfase, de manera que se produzca la dispersión espontánea sobre ella. Una vez inyectado el compuesto, se inicia el proceso de compresión, que llevan a cabo las barreras móviles y que se realiza a temperatura constante.

La representación del área por molécula frente a la presión superficial da lugar a una isoterma de compresión (π - A) que es característica de cada compuesto y que ofrece información sobre las distintas fases en las que se pueden encuentran las moléculas, como se recoge en la **Figura 2**.

Al iniciar la compresión, las moléculas se encuentran muy alejadas entre sí, por lo que apenas existen interacciones intermoleculares (fase gas, G). Es por ello que la presión superficial es muy pequeña. Conforme disminuye el área por molécula, las moléculas se van ordenando (paso de fase gas a fase líquida expandida, LE, y luego condensada, LC) hasta llegar al estado sólido, S, donde la organización de las moléculas es la máxima. Si se sigue comprimiendo una vez llegado a la fase sólida, se produce el colapso de la película, de manera que las moléculas se amontan unas encima de otras. Cabe mencionar que no siempre se ven todas las fases.

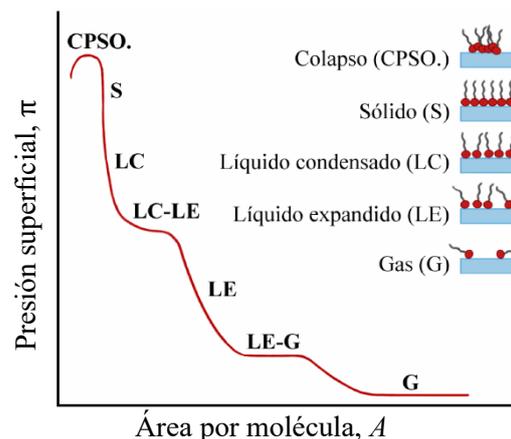


Figura 2. Isoterma π - A genérica con las distintas fases en las que se puede encontrar la monocapa.

En este TFG, se usa una cuba de teflón con barreras de polioximetileno (POM), que dispone de un pozo y un brazo móvil en la zona central para la realización de las transferencias. La cuba se encuentra dentro de una cabina que la protege del polvo (**Figura 3**). Cualquier partícula, materia grasa, etc. podría afectar a los resultados de los experimentos. Es por ello que el laboratorio es una sala semi-blanca, y es preciso el uso de bata, guantes y calzas.

Antes del inicio de un experimento, es necesaria la limpieza tanto de la cuba como de las barreras con el fin de eliminar cualquier posible contaminación o impureza que puedan tener. Para ello, en primer lugar, se humedece papel con acetona y se procede a limpiar la cuba y las barreras. Se espera 15 minutos para permitir la evaporación del disolvente. A continuación, se repite la metodología descrita sustituyendo la acetona por cloroformo en el caso de la cuba (debido a la incompatibilidad de POM con el cloroformo). Tras 15 minutos, se procede a realizar dos lavados de la cuba con sus barreras colocadas con agua Milli-Q, succionando el agua con una bomba de vacío. Se llena una tercera vez la cuba con agua Milli-Q, ya que se utiliza como subfase en todos los experimentos en este TFG.

El siguiente paso consiste en la preparación del papel de Wilhelmy. Este se humedece con etanol y, una vez se haya eliminado su exceso por evaporación, se deja en un vaso de precipitados con agua Milli-Q hasta su uso. Una vez realizados los lavados de la cuba y preparada la subfase, se coloca el papel en la balanza. Se realiza un blanco para asegurarse de que la superficie quede limpia antes de iniciar a inyectar el compuesto de interés. Este consiste en comprimir y descomprimir las barreras sin inyectar ningún compuesto sobre la superficie. La superficie de la subfase se considera limpia si la presión superficial medida en el blanco es igual o inferior a $0,4 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Si es superior, se debe repetir el protocolo de limpieza de la cuba. Tras confirmar que el blanco es aceptable, se procede a inyectar el compuesto de interés mediante una microjeringuilla. Se espera 15 minutos para la evaporación del disolvente, y se empieza a comprimir.

En este TFG, se inyectan 6 mL de las disoluciones de 10^{-5} M en cada experimento, de manera que se fije el área por molécula inicial en $2,15 \text{ nm}^2\cdot\text{molécula}^{-1}$, según la **Ecuación 2**:

$$\text{Área por molécula} = \frac{\text{Área total entre las barreras}}{V \cdot C \cdot N_A} \quad (2)$$

donde el V (L) es el volumen dispersado sobre la superficie, C (M) es la concentración de la disolución dispersada y N_A (moléculas·mol⁻¹) el número de Avogadro.

Las disoluciones usadas se almacenan en el congelador para evitar que el cloroformo se evapore y que los materiales se degraden, y se dejan fuera para que estén a temperatura ambiente previo al inicio de un experimento. La temperatura del laboratorio se mantiene constante en 22°C para todos los experimentos. La influencia de la temperatura es especialmente importante en el caso del DPPC, como es posible observar en sus isoterms.¹³

En la obtención de isoterms puras del [6]-Gingerol, se introduce primero la disolución en un baño de ultrasonidos durante 3 minutos antes de utilizarla por primera vez y cada dos dispersiones de 1 mL (6 dispersiones en total) con el fin de evitar la formación de agregados moleculares.

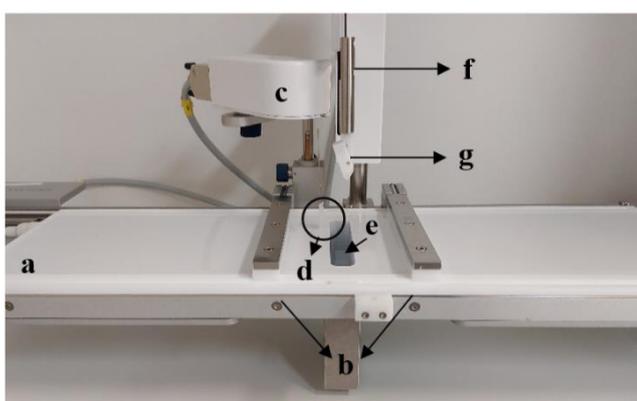


Figura 3. Partes de la cuba KSV utilizada: a) Cuba de teflón; b) Brazos móviles de POM; c) Balanza de Wilhelmy; d) Papel de Wilhelmy; e) Pozo de transferencia; f) Brazo móvil de transferencia; g) Pinzas de soporte de sustrato para transferencias.

La técnica de Langmuir-Blodgett (LB) consiste en la transferencia de la monocapa de Langmuir sobre un sustrato en vertical mediante emersión o inmersión de este en la subfase. En este TFG se han realizado las transferencias por emersión en sustratos de mica cortados en dimensiones de 1x1 cm². Dado que la mica es hidrofílica, las cabezas polares de las moléculas se depositan sobre ella.

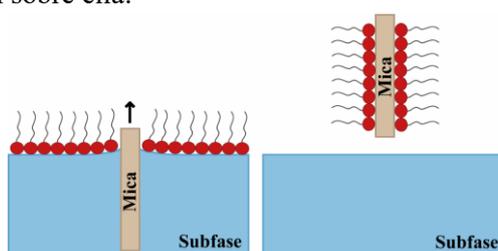


Figura 4. Esquema que muestra el proceso de transferencia vertical (LB) por emersión.

3.3.2 Mezclas y cálculos termodinámicos

Se realizan mezclas binarias de [6]-Gingerol con colesterol, [6]-Gingerol con DPPC y colesterol con DPPC; y mezclas ternarias de los tres compuestos a diferentes fracciones molares. Antes del uso de la disolución de [6]-Gingerol, se introduce en un baño de ultrasonidos durante 3 minutos. Una vez preparadas las mezclas, estas se someten a ultrasonidos durante 30 segundos

(menor tiempo de sonicación debido a un menor volumen) una vez preparadas, y cada 2 dispersiones de 1 mL (un total de 6 jeringuillas de 1 mL).

A partir de los resultados de las isothermas π - A registradas es posible el cálculo de varios parámetros termodinámicos que ofrecen información de interés. El primero de los parámetros estudiados es el área de exceso (A^E), definido como²¹:

$$A^E = A_{mezcla} - A_{ideal} = A_{mezcla} - \sum_i \chi_i A_i \quad (3)$$

donde A_{mezcla} ($\text{nm}^2 \cdot \text{molécula}^{-1}$) es el área molecular experimental de la monocapa a la presión superficial estudiada, π ($\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$); χ_i es la fracción molar de cada compuesto estudiado, i ; y A_i ($\text{nm}^2 \cdot \text{molécula}^{-1}$) es el área por molécula de los componentes puros a la presión superficial π .

Este parámetro informa sobre la miscibilidad de la mezcla, así como de las interacciones intermoleculares (atractivas o repulsivas). Así, los componentes de una mezcla se pueden considerar idealmente miscibles o completamente inmiscibles cuando $A^E = 0$; y parcialmente miscibles cuando $A^E \neq 0$. Valores $A^E < 0$ indican la presencia de interacciones atractivas entre los distintos componentes y/o un empaquetamiento más efectivo de las moléculas (debido a factores estéricos), mientras que $A^E > 0$ indica interacciones repulsivas y/o un empaquetamiento menos efectivo.

El segundo parámetro estudiado es la energía de Gibbs de exceso de mezcla (ΔG_m^E)²²⁻²⁴:

$$\Delta G_m^E = \int_0^\pi A_{mezcla} d\pi - \sum_i \chi_i \int_0^\pi A_i d\pi \quad (4)$$

Valores de $\Delta G_m^E < 0$ indican fuertes interacciones, mientras que valores $\Delta G_m^E > 0$ indican interacciones repulsivas.

La estabilidad de las películas multicomponente puede evaluarse a través de la energía de Gibbs de mezcla (ΔG_m), definida según la **Ecuación 5**²⁴, donde R es la constante de los gases ideales y T la temperatura.

$$\Delta G_m = \Delta G_m^E + \Delta G_m^{ideal} = \Delta G_m^E + RT \sum_i \chi_i \ln \chi_i \quad (5)$$

Valores de $\Delta G_m < 0$ indican que la monocapa es estable, mientras que si $\Delta G_m > 0$ la monocapa se considera inestable.

Por último, se estudia el módulo de Young (K_s), parámetro relacionado con el coeficiente de compresibilidad (C_s). A partir de este, es posible distinguir las fases en las que se encuentran las monocapas en la interfase aire-agua. Esto se lleva a cabo mediante la **Ecuación 6** y siguiendo la clasificación de Davies y Rideal: la fase gas (G) presenta valores de K_s de entre 0-12,5 $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$; valores de entre 12,5-50 $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$ son característicos de la fase de líquido expandido (LE); las regiones donde K_s toma valores de 50-100 $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$ indican la transición LE-LC; valores de entre 100-250 $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$ se corresponden con la fase de líquido condensado (LC); valores superiores a 1000 $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$ se relacionan con la fase sólida²⁵.

$$K_s = C_s^{-1} = -A \left(\frac{d\pi}{dA} \right)_T \quad (6)$$

3.3.3 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

La microscopía de fuerza atómica es una potente técnica utilizada en la determinación estructural de materiales, permitiendo la obtención de imágenes de alta resolución en la escala nano.

El principio de su funcionamiento se basa en el recorrido de una punta puntiaguda por la superficie de una muestra. La punta está montada sobre un soporte flexible denominado cantiléver. Durante el barrido, el movimiento del cantiléver es monitorizado por un láser que incide en la parte trasera del cantiléver. El haz del láser se refleja entonces a un fotodetector que registra los movimientos del cantiléver. La imagen 3D se construye a partir de la magnitud del *feedback* que se obtiene en cada punto escaneado de la muestra. Esta imagen por tanto presenta información sobre la topografía de la superficie de la muestra.

La interacción de la punta con la muestra es caracterizada según la distancia entre estas. Así, a grandes distancias, existe una fuerza atractiva entre ellas, como son las fuerzas de Van der Waals. Al contrario, las fuerzas son repulsivas cuando la distancia entre la punta y la muestra es pequeña, debido a la superposición de los orbitales electrónicos de la punta y la muestra.

En este TFG se ha utilizado el modo *tapping*, que consiste en el contacto intermitente de la punta con la muestra al mismo tiempo que oscila el cantiléver. De esta manera, se consigue reducir significativamente los daños de la muestra. En la **Figura 5** se representa el esquema de este modo de trabajo. El equipo utilizado se describe en el apartado **3.2 Equipos e instrumentos**.

Las imágenes obtenidas se procesan mediante el software libre Gwyddion Versión 2.62.

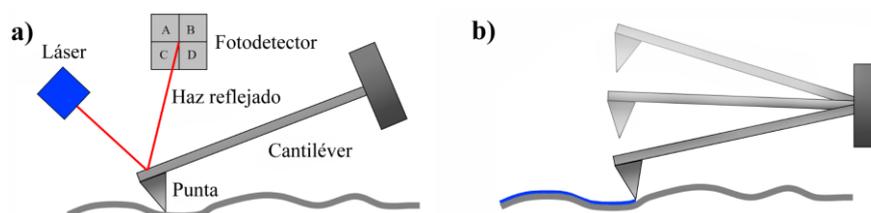


Figura 5. a) Esquema del funcionamiento básico de un microscopio de fuerza atómica. b) Esquema del modo *tapping* (Figuras adaptadas de *Atomic Force Microscopy for university students: applications in biomaterials* de Kontomaris y Stylianou²⁶).

4 Resultados y discusión

4.1 Experimentos con [6]-Gingerol

4.1.1 Espectroscopía UV-Vis

Se ha estudiado el compuesto [6]-Gingerol mediante espectroscopía UV-vis. Se ha comprobado una buena consistencia entre los resultados obtenidos y los publicados, con una longitud de onda máxima, $\lambda_{m\acute{a}x}$, acorde a la de la literatura. Para ello, se preparan varias disoluciones de [6]-Gingerol en cloroformo de concentraciones perfectamente conocidas, obteniendo curvas de Abs- λ . Una vez identificada $\lambda_{m\acute{a}x}$, se obtiene la representación de Abs-

Concentración a dicha $\lambda_{\text{máx}}$ para comprobar el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer (**Ecuación 7**), obteniendo la recta de calibrado con la que se puede interpolar la señal de la disolución cuya concentración se desee conocer. Se ha utilizado una cubeta de cuarzo de paso óptico, l , igual a 1 cm. Las disoluciones empleadas se introducen en un baño de ultrasonidos durante 3 minutos antes de cada medida. Las gráficas obtenidas se recogen en la **Figura 6**.

$$Abs = \varepsilon \cdot l \cdot C \quad (7)$$

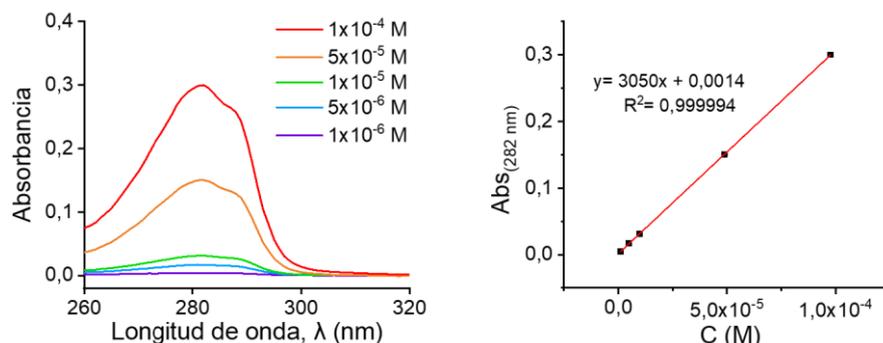


Figura 6. Izquierda: Representación Abs- λ para las disoluciones de la concentración indicada. Derecha: Representación Abs_(282nm)-C para las disoluciones de la concentración indicada.

En primer lugar, se observa que $\lambda_{\text{máx}} = 282$ nm. A dicha longitud de onda, se cumple la ley de Lambert-Beer para el rango de concentraciones estudiadas (de $1 \cdot 10^{-6}$ M a $1 \cdot 10^{-4}$ M), obteniéndose un ajuste lineal ($R^2=0,999$). La pérdida de la linealidad, especialmente en concentraciones más elevadas podría atribuirse a una posible formación de agregados moleculares en la disolución (que han resistido al baño de ultrasonidos). Por otro lado, se obtiene que $\varepsilon = 3050 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, valor similar al de la literatura ($\lambda_{\text{máx}} = 282$ nm, $\varepsilon = 2530 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)²⁷. La diferencia en la absorptividad molar puede deberse al disolvente: en este TFG las disoluciones son en cloroformo, mientras que en el trabajo referenciado se utiliza metanol como disolvente.

4.1.2 Isoterma: optimización de las condiciones

Se obtuvieron las isotermas de compresión π -A del compuesto en diferentes condiciones, variando la concentración y el volumen dispersado de manera que el área por molécula inicial quedase fija en $1,29 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécula}^{-1}$ (esto se calcula según la **Ecuación 2**). Se obtienen los resultados recogidos en la **Figura 7**.

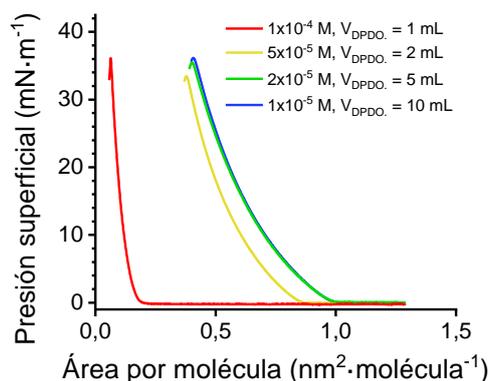


Figura 7. Isotermas π -A de [6]-Gingerol obtenidas a diferentes condiciones.

Al estar dispersando el mismo número de moléculas inicialmente, se debería obtener siempre la misma isoterma. Sin embargo, se observa que la isoterma del [6]-Gingerol aparentemente no se reproduce. Esto se puede explicar debido a la formación de agregados moleculares. Evidencia de ello es la secuencia en la que aparecen las isotermas, de menor a mayor área por molécula del despegue de la isoterma: $1 \cdot 10^{-4} \text{ M} > 5 \cdot 10^{-5} \text{ M} > 2 \cdot 10^{-5} \text{ M} = 1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Dado que las isotermas correspondientes a $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ (curva rosa) y $1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ (curva azul) son muy reproducibles entre sí, se puede considerar que la concentración más elevada donde no se producen agregados moleculares es $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Finalmente, se decide utilizar una concentración de $1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ y un volumen de dispersión de 6 mL (un menor volumen de dispersión se traduce en una menor probabilidad de saturación de la superficie, lo que implicaría tener que volver a empezar el experimento). Con estas condiciones, el área por molécula inicial es de $2,15 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécula}^{-1}$, que se fijará para el resto de los experimentos del TFG.

4.1.3 Estudios de estabilidad y reversibilidad

Para estudiar más a fondo las monocapas de [6]-Gingerol obtenidas, se realizan dos tipos de experimentos estrechamente relacionados entre sí.

El estudio de estabilidad de la monocapa en la interfase aire-agua consiste en registrar medidas de presión superficial respecto a área por molécula cuando se intenta mantener constante un determinado valor de presión superficial durante un largo periodo de tiempo. Esto se consigue gracias a los ligeros movimientos que realizan las barreras de la cuba. El objetivo es analizar la disminución del área por molécula desde que se alcanza el valor de presión superficial que se desee hasta el fin del experimento. En este TFG, se ha seleccionado una presión superficial constante de $30 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ (debido a que es el valor habitual en el entorno membranal celular)²⁸ con una duración total del experimento de unas 18 horas.

Como se puede observar en la **Figura 8**, se produce una disminución significativa del área por molécula en las primeras 1,5 horas del experimento, del orden de 60% de área. Esto es consistente con la fluidez de la monocapa a dicha presión superficial, como se verá más adelante. Sin embargo, se consigue una gran estabilización del área molecular en el tiempo restante del experimento, de manera que se produce una reducción de menos de 5% del área molecular durante 16 horas.

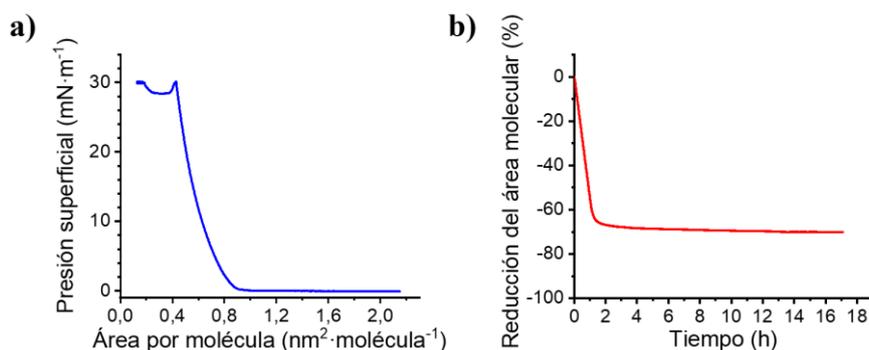


Figura 8. a) Isoterma π - A de [6]-Gingerol registrada en el estudio de estabilidad a una presión superficial objetivo de $30 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$. b): Representación de la reducción del área molecular (%) frente al tiempo (h) durante el experimento de estabilidad de [6]-Gingerol.

Por otro lado, se estudia la reversibilidad de la monocapa de [6]-Gingerol. Dicho estudio consiste en la compresión y descompresión de la película del compuesto de manera sucesiva, analizando la histéresis que se forma. Este estudio se realiza con una presión superficial objetivo de $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ y se llevan a cabo tres ciclos de compresión-descompresión, obteniendo los resultados de la **Figura 9**.

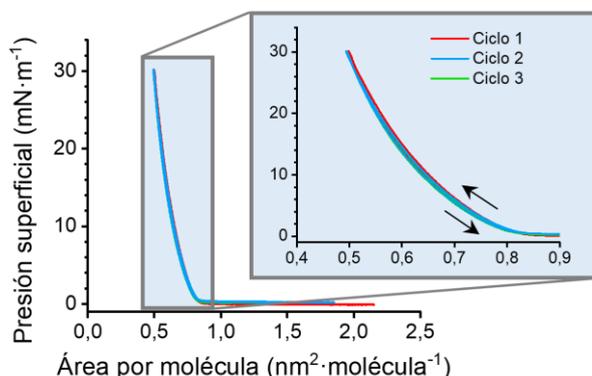


Figura 9. Histéresis del estudio de reversibilidad de la monocapa de [6]-Gingerol.

Se observa una histéresis prácticamente nula: la isoterma del compuesto es altamente reversible durante los tres ciclos de compresión-descompresión realizados, es decir, no se produce una pérdida significativa de moléculas en la subfase durante el proceso de compresión.

4.2 Monocapas monocomponente

Tras varios estudios de reproducibilidad de las isotermas de cada compuesto estudiado en este TFG, se obtienen como isotermas representativas las recogidas en la **Figura 10**, junto con sus respectivos valores de módulo de Young, calculados mediante la **Ecuación 6** (ver apartado **3.3.2 Mezclas y cálculos termodinámicos**).

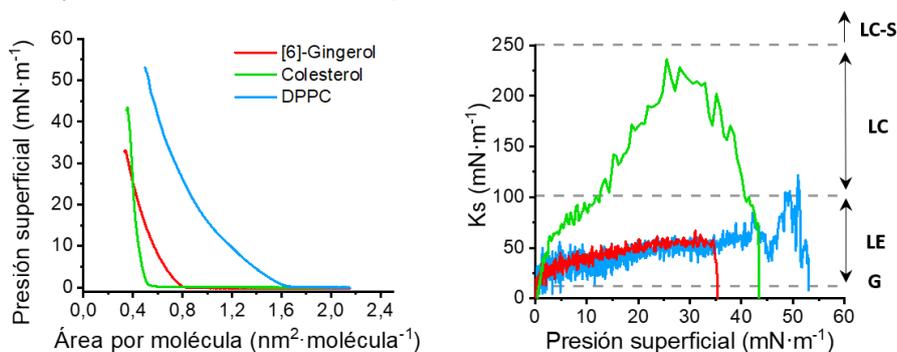


Figura 10. Izquierda: Isotermas π - A de [6]-Gingerol, colesterol y DPPC a 22°C . Derecha: Gráfica K_s - π para las monocapas de [6]-Gingerol, colesterol y DPPC.

La isoterma de [6]-Gingerol presenta un despegue en un área por molécula igual a $0,81 \text{ nm}^2\cdot\text{molécula}^{-1}$, correspondiente a una presión de $0,1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. A este valor de presión, la K_s del compuesto es de $10,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, por lo que la monocapa está en fase G. Observando la gráfica K_s - π , la monocapa pasa a fase de LE a una presión superficial de $0,2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Una vez alcanzada una presión superficial de $11,0 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ se produce la transición LE-LC, ya que se observan

valores de K_s de $50 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. La presión superficial sigue aumentando continuamente hasta su colapso en $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. El valor máximo de K_s que se observa es de $66,8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ cuando la presión es de $31,0 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. La fluidez de la monocapa de [6]-Gingerol se puede explicar a partir de su estructura: la presencia de dos átomos donores de enlaces de hidrógeno y cuatro átomos aceptores de enlaces de hidrógeno permite interacciones intermoleculares, tanto entre moléculas de [6]-Gingerol como con la subfase acuosa. Además, el alto número de enlaces capaces de rotar se traduce en una alta flexibilidad conformacional. La presencia de un anillo p-fenólico puede lugar a un apilamiento π - π intermolecular.

Respecto al colesterol, su isoterma despegue con un área por molécula de $0,53 \text{ nm}^2\cdot\text{molécula}^{-1}$. En la gráfica K_s - π , se observa que la transición de LE-LC se produce cuando la presión superficial es baja, con un valor de $2,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. La monocapa pasa a la fase LC cuando la presión toma un valor de $12,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. El máximo de K_s observado es de $236,3 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, correspondiente a un valor de presión de $25,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Su colapso se produce a una presión de $43,4 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. La naturaleza más compacta de las monocapas de colesterol (frente a las de [6]-Gingerol o del DPPC) se debe a su estructura planar como consecuencia de la disposición en conformación trans de las moléculas. Se puede producir asimismo apilamiento π - π intermolecular, y la formación de enlaces de hidrógeno debido a su único grupo -OH.

En cuanto al DPPC, el despegue de su isoterma ocurre con un área por molécula de $1,65 \text{ nm}^2\cdot\text{molécula}^{-1}$, a presión de $0,3 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Este valor de presión se corresponde con una K_s de $8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$: la monocapa se encuentra en fase G. Según la gráfica K_s - π , a una presión aproximada de $0,6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ se observa la transición a una fase LE. Se puede considerar que la monocapa pasa a fase LE-LC cuando la presión es de $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ aproximadamente. La presión aumenta continuamente hasta alcanzar la fase LC con un valor de $48,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. El valor máximo de K_s es de $121,6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, correspondiente a una fase LC. El colapso se observa cuando la presión es de $53,1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. La isoterma es ligeramente diferente a la de la bibliografía¹³. Hemos atribuido estas diferencias a que en este trabajo se comienza con una densidad superficial más baja, lo que podría suponer una menor agregación de estas en la superficie. Esto implicaría que la isoterma despegue antes. Este cambio de concentración también provoca que, a bajas presiones, las fases difieran (G, LE), mientras que, a altas presiones, las isotermas puedan confluir. Por otro lado, las condiciones de temperatura y humedad influyen en la aparición y forma del *plateau* de la fase de transición LC-LE en la isoterma. La flexibilidad de la monocapa de DPPC se atribuye a una estructura dinámica: la cabeza polar de la molécula promueve la formación de enlaces de hidrógeno (cuatro átomos aceptores de enlaces de hidrógeno), mientras que sus dos cadenas saturadas fomentan un ordenamiento de estas mediante interacciones de Van der Waals. No obstante, el elevado número de enlaces capaces de rotar (40 enlaces) proporciona una notable flexibilidad conformacional.

En definitiva, [6]-Gingerol presenta los menores valores de K_s por lo que se corresponde con la monocapa menos condensada. Le sigue el DPPC, cuya monocapa alcanza a pasar a una fase de LC con un valor máximo de K_s de $121,6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Finalmente, el colesterol forma las monocapas más condensadas, aunque sin llegar a una fase LC-S. Su valor máximo de K_s es de $236,3 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

4.3 Monocapas mezclas binarias

En primer lugar, se estudia el módulo de Young para las mezclas binarias [6]-Gingerol-Colesterol (GING-CHOL) y [6]-Gingerol-DPPC (GING-DPPC) a diferentes fracciones molares de [6]-Gingerol. Las gráficas K_S - π se recogen en el **Anexo I**. Se observa un aumento de la fluidez de la monocapa de colesterol al aumentar la concentración de GING en la mezcla binaria. El aumento máximo se produce cuando $\chi_{\text{GING}}=0,6$, donde K_S alcanza valores propios de la monocapa de GING pura. En la mezcla GING-DPPC, la presencia de GING en la monocapa de DPPC no afecta a su fluidez.

Con el fin de estudiar la estabilidad y miscibilidad de las monocapas de las mezclas binarias, se aplican las **Ecuaciones 3, 4 y 5** del apartado **3.3.2 Mezclas y cálculos termodinámicos**. Se realiza el estudio a las siguientes presiones superficiales: 5, 10, 15, 20, 30 y 33 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Las gráficas correspondientes obtenidas se recogen en el **Anexo I**.

En cuanto al área por exceso, en la mezcla GING-CHOL A^E toma valores pequeños, presentándose una situación próxima a la idealidad ($A^E = 0$). A mayor presión superficial, menor es A^E . El mínimo absoluto se ubica en $\chi_{\text{GING}} = 0,8$, correspondiéndose con la fracción molar con mayores interacciones atractivas. Por otro lado, la mezcla GING-DPPC presenta valores de A^E inferiores que en el caso de la mezcla GING-CHOL. A bajas χ_{GING} , los valores de A^E son muy próximos a cero, lo que se traduce o bien en un comportamiento muy cercano a la idealidad o en una situación de total inmiscibilidad de los componentes en la monocapa. Para el resto de χ_{GING} , los valores de A^E son positivos, lo que implica la presencia de interacciones repulsivas y/o la formación de monocapas menos compactas de lo esperado. Los máximos se encuentran especialmente a χ_{GING} elevadas.

Respecto a las interacciones de los componentes de la monocapa, la mezcla GING-CHOL presenta menores valores de ΔG_m^E cuanto mayor es la presión superficial. Se observan valores negativos a bajos valores de χ_{GING} , destacando el mínimo absoluto en $\chi_{\text{GING}}=0,8$. Esto se traduce en unas fuertes interacciones atractivas entre el GING y el CHOL. Por otro lado, la mezcla GING-DPPC muestra valores ΔG_m^E generalmente positivos para todas las fracciones molares de GING, lo que indica la presencia de interacciones repulsivas.

Finalmente, respecto a ΔG_m , en la mezcla de GING-CHOL, se observan valores negativos para todas las fracciones molares, lo que se traduce en una mayor estabilidad de la mezcla frente a los componentes puros por separado. Los valores son más negativos cuanto mayor es la presión superficial. El mínimo absoluto se encuentra en $\chi_{\text{GING}}=0,8$, aunque se observa además una alta estabilidad en $\chi_{\text{GING}}=0,3$. En cuanto a la mezcla GING-DPPC, los valores son generalmente negativos, excepto a fracciones de GING elevadas, donde son ligeramente positivas. La situación de mayor estabilidad se encuentra en $\chi_{\text{GING}}=0,5$. En general, la mezcla de GING-CHOL presenta una mayor estabilidad (con mínimos de valor $-2000 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$) que las monocapas de GING-DPPC.

4.4 Monocapas mezclas ternarias

Para el estudio de las mezclas ternarias de GING-DPPC-CHOL se han seleccionado las fracciones molares de las líneas GING-[DPPC-CHOL], siendo [DPPC-CHOL] 0,25:0,75, 0,5:0,5 y 0,75:0,25. Estos puntos vienen recogidos en el Anexo II.

El estudio termodinámico se ha llevado a cabo según dos aproximaciones: (i) se considera que el binario DPPC-CHOL es un componente único, estudiando de esta manera la mezcla ternaria como si se tratara de un binario para estudiar el efecto de añadir [6]-Gingerol a un modelo de membrana celular formado por DPPC y CHOL; y (ii) considerando la mezcla de los tres componentes. Lo que nos dará una visión global de la mezcla ternaria.

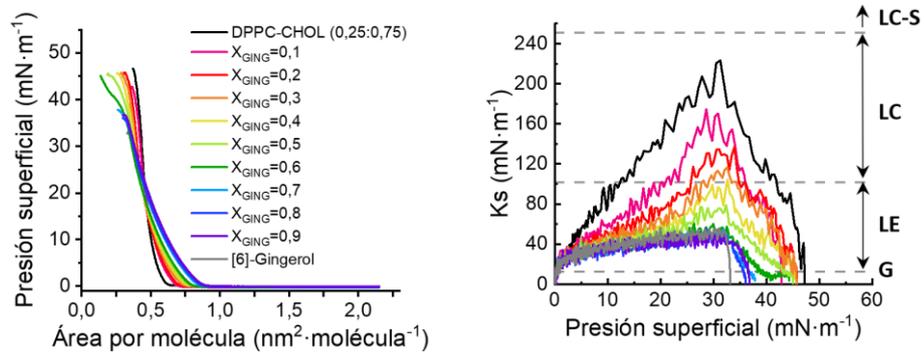
Según la primera aproximación, dado que se consideran dos fracciones molares (χ_{GING} y $\chi_{\text{DPPC-CHOL}}$), las **Ecuaciones 3, 4 y 5** se modifican de la siguiente manera:

$$A^E = A_{\text{mezcla}} - [A_{\text{GING}} \chi_{\text{GING}} + A_{\text{DPPC-CHOL}} (\chi_{\text{DPPC}} + \chi_{\text{CHOL}})] \quad (7)$$

$$\Delta G_m^E = \int_0^\pi A_{\text{mezcla}} d\pi - \left[\chi_{\text{GING}} \int_0^\pi A_{\text{GING}} d\pi + (\chi_{\text{DPPC}} + \chi_{\text{CHOL}}) \int_0^\pi A_{\text{DPPC-CHOL}} d\pi \right] \quad (8)$$

$$\Delta G_m = \Delta G_m^E + RT[\chi_{\text{GING}} \ln \chi_{\text{GING}} + (\chi_{\text{DPPC}} + \chi_{\text{CHOL}}) \ln(\chi_{\text{DPPC}} + \chi_{\text{CHOL}})] \quad (9)$$

Las isothermas π - A obtenidas para las distintas mezclas junto con sus respectivos valores de K_s se recogen en la **Figura 11**. En primer lugar, para la mezcla ternaria donde el binario DPPC-CHOL corresponde con una proporción 0,25:0,75 de estos componentes, se observa que la mezcla binaria DPPC-CHOL (0,25:0,75) tiene un máximo de K_s correspondiente a una fase condensada. La adición de [6]-Gingerol a dicha mezcla binaria aumenta la fluidez de la membrana de DPPC-CHOL. Este aumento es máximo a χ_{GING} mayor o igual a 0,6, fracción a la que se consigue una fluidez idéntica a aquella de la monocapa de [6]-Gingerol. Por el contrario, para la mezcla DPPC-CHOL (0,5:0,5), no se observa un aumento significativo de la fluidez de la monocapa de DPPC-CHOL (0,5:0,5) al introducir [6]-Gingerol en la mezcla. Finalmente, en la mezcla ternaria con contenido en DPPC-CHOL en proporción 0,75:0,25 se observa que [6]-Gingerol induce un aumento de la fluidez de la monocapa de DPPC-CHOL (0,75:0,25). La máxima fluidez se consigue a partir de χ_{GING} igual o mayor de 0,8.



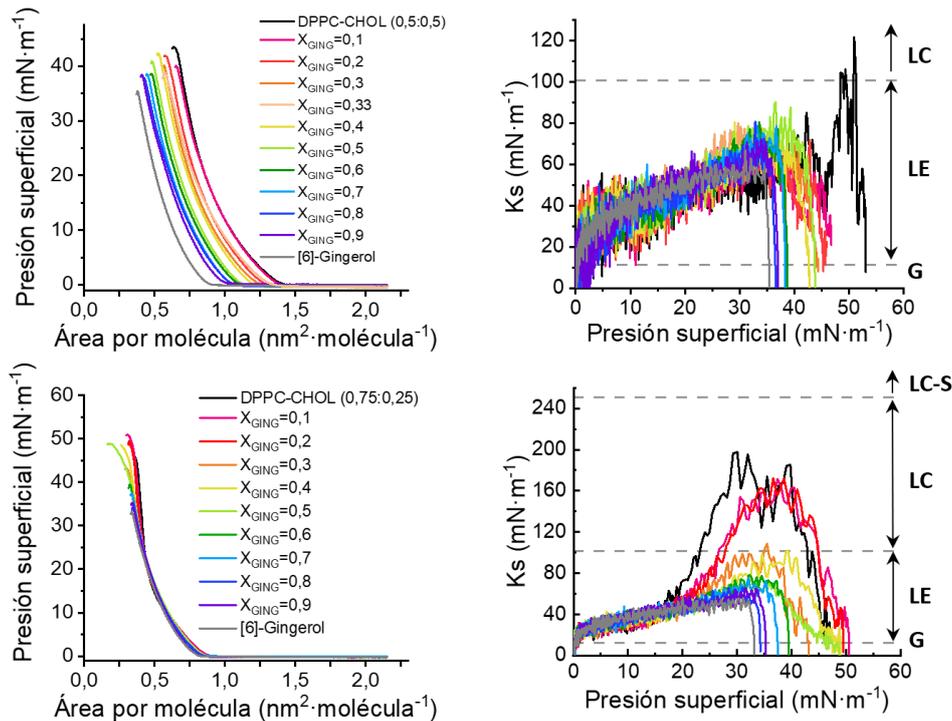


Figura 11. Izquierda: Isotermas π -A; derecha: Gráficas K_s - π para las mezclas indicadas.

Según la **Figura 12**, A^E disminuye al aumentar la presión para todas las mezclas. En el caso de DPPC-CHOL (0,25:0,75), A^E toma valores positivos a presiones entre 5-15 $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$ y a 20 $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$ cuando χ_{GING} es elevada, indicativo de interacciones repulsivas entre los tres componentes. A mayores presiones (30-33 $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$), A^E toma valores negativos, indicativo de interacciones atractivas, y el mínimo absoluto se ubica en $\chi_{\text{GING}}=0,6$. Para la mezcla DPPC-CHOL (0,5:0,5), se observan valores generalmente positivos de A^E para todas las presiones presentándose un máximo a $\chi_{\text{GING}}=0,33$. Los dos mínimos observados se encuentran a $\chi_{\text{GING}}=0,3$, donde A^E toma valores muy cercanos a cero (comportamiento ideal), y a $\chi_{\text{GING}}=0,5$ (mínimo absoluto), donde A^E toma valores ligeramente negativos. Finalmente, en el caso de DPPC-CHOL (0,75:0,25), se observan valores bajos de A^E en comparación con el resto de las mezclas con áreas de exceso próximas a cero para todas las χ_{GING} . El mínimo absoluto de A^E se corresponde con la mezcla de $\chi_{\text{GING}}=0,3$. Teniendo en cuenta todas las mezclas, la situación más favorable se presenta en DPPC-CHOL (0,25:0,75) a $\chi_{\text{GING}}=0,6$.

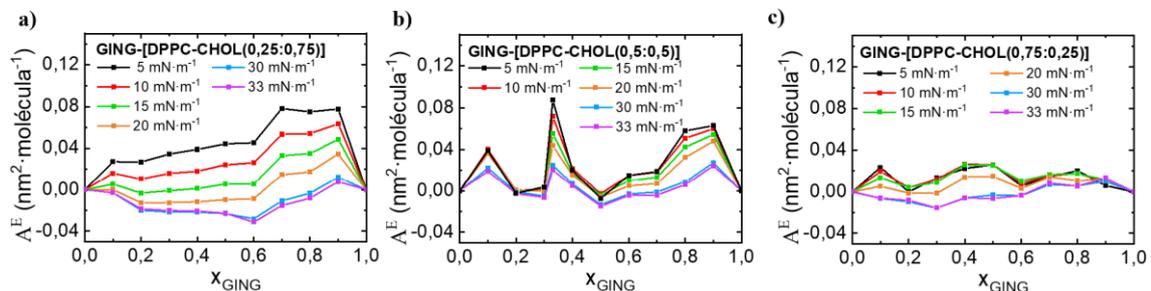


Figura 12. Representación A^E frente a χ_{GING} para las mezclas pseudo-binarias: a) GING-[DPPC-CHOL(0,25:0,75)]; b) GING-[DPPC-CHOL(0,5:0,5)]; c) GING-[DPPC-CHOL(0,75:0,25)].

En la **Figura 13** se recogen los valores de ΔG_m^E . De forma general, se observa que al aumentar la presión, aumenta ΔG_m^E para todas las mezclas, lo que se traduce en la presencia de interacciones repulsivas entre los componentes. En el caso de la mezcla DPPC-CHOL (0,25:0,75), se observan valores positivos de ΔG_m^E en todo el rango de χ_{GING} . Al llegar a una presión de 33 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ se produce una disminución de ΔG_m^E , rompiendo la tendencia descrita anteriormente. Las situaciones más favorables se observan en los dos mínimos a $\chi_{\text{GING}}=0,2$ y $0,6$, donde ΔG_m^E toma valores muy cercanos a cero. Respecto a la mezcla DPPC-CHOL (0,5:0,5), se observan valores generalmente positivos, excepto en dos mínimos, $\chi_{\text{GING}}=0,3$ y $0,5$, donde se presentan interacciones atractivas intercomponente. Destaca el máximo a $\chi_{\text{GING}}=0,33$ ya que se corresponde con una situación muy desfavorable debido a grandes interacciones repulsivas entre los componentes de la mezcla. Finalmente, se observa que la mezcla DPPC-CHOL (0,75:0,25) presenta los menores valores de ΔG_m^E respecto a las demás proporciones de DPPC-CHOL. Las situaciones más favorables desde un punto de vista termodinámico se producen cuando $\chi_{\text{GING}}=0,2$ y $0,3$, donde se observan valores negativos de energía, indicativo de interacciones atractivas. Teniendo en cuenta todas las mezclas, la situación más favorable se presenta en DPPC-CHOL (0,75:0,25) a $\chi_{\text{GING}}=0,2$.

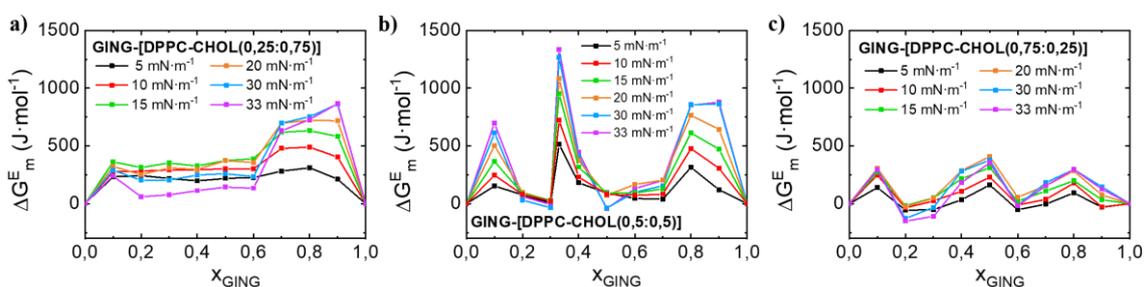


Figura 13. Representación ΔG_m^E frente a χ_{GING} para las mezclas pseudo-binarias: a) GING-[DPPC-CHOL(0,25:0,75)]; b) GING-[DPPC-CHOL(0,5:0,5)]; c) GING-[DPPC-CHOL(0,75:0,25)].

En la **Figura 14** se observan los valores de ΔG_m obtenidos. En general, se observan valores negativos de energía para todas las mezclas, así como de una tendencia de disminución de la energía al disminuir la presión. Para la mezcla de DPPC-CHOL (0,25:0,75), el mínimo absoluto se encuentra a $\chi_{\text{GING}} = 0,5$, correspondiéndose con la situación de más estabilidad energética. A diferencia de la tendencia mencionada anteriormente, este mínimo es absoluto a la mayor presión estudiada. En el caso de DPPC-CHOL (0,5:0,5), se observan dos mínimos a $\chi_{\text{GING}} = 0,3$ y $0,5$, donde las interacciones atractivas intercomponente son las más significativas. Destacan tres situaciones de menor estabilidad energética, como son las mezclas a $\chi_{\text{GING}}=0,1$, $0,33$ y $0,9$. En estos casos, se presentan valores de ΔG_m próximos a cero. Respecto a la mezcla DPPC-CHOL (0,75:0,25), se observan dos situaciones en las que las interacciones atractivas intercomponente son las más significativas: $\chi_{\text{GING}}=0,3$ y $0,6$, siendo este último el mínimo absoluto. Teniendo en cuenta todas las mezclas, la situación más favorable se presenta en DPPC-CHOL (0,5:0,5) a $\chi_{\text{GING}}=0,5$.

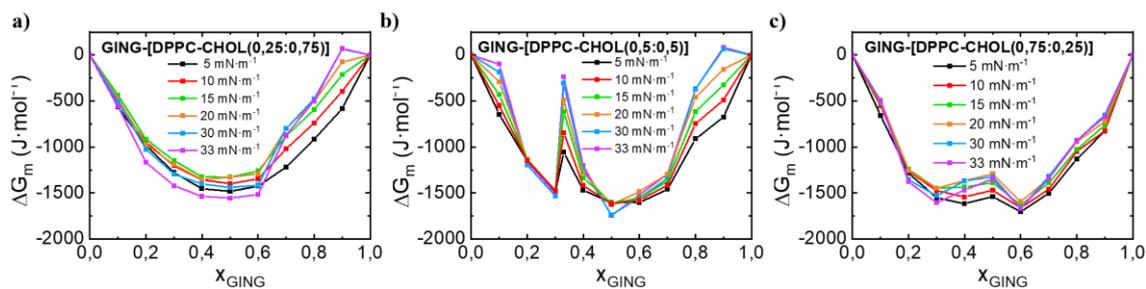


Figura 14. Representación ΔG_m frente a χ_{GING} de las mezclas pseudo-binarias: a) GING-[DPPC-CHOL(0,25:0,75)]; b) GING-[DPPC-CHOL(0,5:0,5)]; c) GING-[DPPC-CHOL(0,75:0,25)].

Para identificar las mezclas más miscibles y estables, se recopilan los mínimos más significativos observados para cada parámetro junto con su valor para cada mezcla a una presión de $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

Tabla 2. Recopilación de las mezclas ternarias más miscibles y estables observadas.

	χ_{GING}	$A^E \text{ (nm}^2\cdot\text{moléc}^{-1}\text{)}$	$\Delta G_m^E \text{ (J}\cdot\text{mol}^{-1}\text{)}$	$\Delta G_m \text{ (J}\cdot\text{mol}^{-1}\text{)}$
GING-[DPPC-CHOL(0,25:0,75)]	0,2	-0,02	203,43	-1023,90
	0,5	-0,02	260,75	-1439,33
	0,6	-0,03	235,76	-1414,93
GING-[DPPC-CHOL(0,5:0,5)]	0,3	-0,01	-34,02	-1532,28
	0,5	-0,01	-36,52	-1736,60
GING-[DPPC-CHOL(0,75:0,25)]	0,2	-0,01	-126,95	-1354,29
	0,3	-0,02	-31,85	-1530,11
	0,6	-0,00	-14,75	-1665,45

Según la **Tabla 2**, las mezclas de GING-[DPPC-CHOL(0,25:0,75)] son las más inestables debido a los valores positivos de ΔG_m^E que presentan. Respecto a las demás mezclas, destacan las siguientes por su mayor miscibilidad y estabilidad: $\chi_{\text{GING}}\text{-}\chi_{\text{DPPC}}\text{-}\chi_{\text{CHOL}}=0,5\text{-}0,25\text{-}0,25$, $\chi_{\text{GING}}\text{-}\chi_{\text{DPPC}}\text{-}\chi_{\text{CHOL}}=0,2\text{-}0,6\text{-}0,2$ y $\chi_{\text{GING}}\text{-}\chi_{\text{DPPC}}\text{-}\chi_{\text{CHOL}}=0,3\text{-}0,525\text{-}0,175$. Los valores de K_s para estas tres mezclas a una presión de $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ son $64,7$, $130,0$ y $90,3 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ respectivamente. Esto indica que las mezclas de $\chi_{\text{GING}}\text{-}\chi_{\text{DPPC}}\text{-}\chi_{\text{CHOL}}=0,5\text{-}0,25\text{-}0,25$ y $\chi_{\text{GING}}\text{-}\chi_{\text{DPPC}}\text{-}\chi_{\text{CHOL}}=0,3\text{-}0,525\text{-}0,175$ presentan monocapas en transición LE-LC, mientras que la monocapa de $\chi_{\text{GING}}\text{-}\chi_{\text{DPPC}}\text{-}\chi_{\text{CHOL}}=0,2\text{-}0,6\text{-}0,2$ se encuentra en fase LC, indicativo de interacciones atractivas o de un menor volumen debido a factores estéricos.

En conclusión, las mezclas más miscibles y estables a una presión de $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (valor habitual en el entorno membranar)²⁸ se corresponden con $\chi_{\text{GING}}\text{-}\chi_{\text{DPPC}}\text{-}\chi_{\text{CHOL}}=0,5\text{-}0,25\text{-}0,25$, $\chi_{\text{GING}}\text{-}\chi_{\text{DPPC}}\text{-}\chi_{\text{CHOL}}=0,2\text{-}0,6\text{-}0,2$ y $\chi_{\text{GING}}\text{-}\chi_{\text{DPPC}}\text{-}\chi_{\text{CHOL}}=0,3\text{-}0,525\text{-}0,175$, observando una monocapa más condensada en el caso de $\chi_{\text{GING}}\text{-}\chi_{\text{DPPC}}\text{-}\chi_{\text{CHOL}}=0,2\text{-}0,6\text{-}0,2$, por lo que se podría considerar la mezcla óptima desde un punto de vista estérico y energético. Además, las monocapas con DPPC-CHOL 0,5:0,5 son de interés biológico ya que se corresponden con la composición característica de la membrana plasmática en células eucariotas.¹ En este sentido, la mezcla ternaria de mayor estabilidad y miscibilidad es $\chi_{\text{GING}}\text{-}\chi_{\text{DPPC}}\text{-}\chi_{\text{CHOL}}=0,5\text{-}0,25\text{-}0,25$.

4.4.1 Estudio ternario

Se estudian los parámetros termodinámicos de las mezclas ternarias aplicando las Ecuaciones 3, 4 y 5 a diferentes presiones superficiales. Los resultados obtenidos se incluyen en diagramas ternarios junto con los resultados obtenidos de los binarios GING-DPPC y GING-CHOL, adquiriendo así una visión general del sistema GING-DPPC-CHOL. La Figura 15 proporciona una visión general de los valores de K_S presentes en mezclas de GING-DPPC-CHOL.

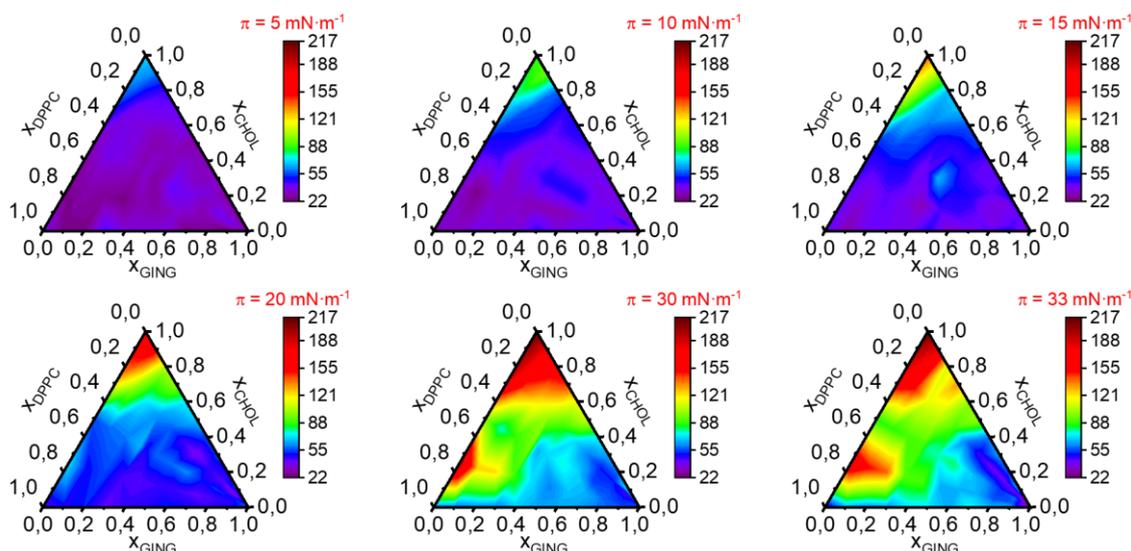


Figura 15. Módulo de Young (K_S) en sistemas binarios (ejes del triángulo) y ternarios de GING, DPPC y CHOL a las presiones superficiales indicadas.

En primer lugar, se observa una tendencia general de un aumento de los valores de K_S a mayor presión superficial, es decir, las monocapas se vuelven más condensadas. Cuando la presión es de $5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, la presencia de una fase LE es predominante (región azul oscura). Se observa una pequeña región donde se presenta la transición LE-LC, y es la correspondiente a valores altos de χ_{CHOL} ($0,8-1,0$) y bajos valores de DPPC ($\chi_{\text{DPPC}} < 0,25$). A una presión de $15 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, van apareciendo regiones de transición de fase LE-LC, y la región donde χ_{CHOL} toma valores de entre $0,8-1,0$ y $\chi_{\text{DPPC}} < 0,25$ alcanza la fase de LC. Cuando la presión superficial es de $30-33 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, se observa que la gran mayoría de las regiones del triángulo están o han pasado por la fase LC. Aparece una nueva zona donde se obtienen valores elevados de K_S con respecto al resto de las mezclas ternarias. Esta se encuentra a bajos valores de χ_{GING} . Destaca el punto donde $\chi_{\text{DPPC}}=0,75$ y $\chi_{\text{CHOL}}=0,25$, región que se encuentra en fase LC con valores relativamente elevados. Por tanto, se observa que cuanto mayor es χ_{GING} , más fluida es la mezcla. Este efecto es mayor cuando $\chi_{\text{GING}} > 0,5$ y cuando DPPC y CHOL están en proporción $0,5:0,5$.

Las mezclas ternarias más condensadas son $\chi_{\text{GING}}-\chi_{\text{DPPC}}-\chi_{\text{CHOL}}=0,1-0,675-0,225$ ($K_S=151,8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ a $33 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) y $\chi_{\text{GING}}-\chi_{\text{DPPC}}-\chi_{\text{CHOL}}=0,1-0,225-0,675$ ($K_S=150,8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ a $33 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$). Las mezclas más fluidas son $\chi_{\text{GING}}-\chi_{\text{DPPC}}-\chi_{\text{CHOL}}=0,3-0,525-0,175$ ($K_S=25,0 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ a $5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) y $\chi_{\text{GING}}-\chi_{\text{DPPC}}-\chi_{\text{CHOL}}=0,1-0,675-0,225$ ($K_S=25,9 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ a $10 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$).

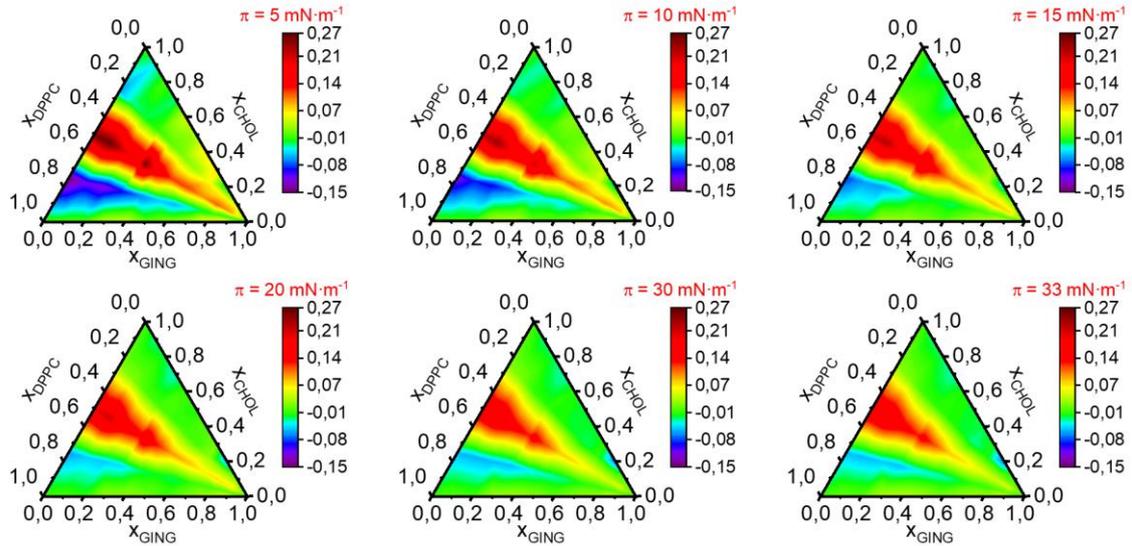


Figura 16. Área de exceso (A^E) en sistemas binarios (ejes del triángulo) y ternarios de GING, DPPC y CHOL a las presiones superficiales indicadas.

Según la **Figura 16**, A^E disminuye al aumentar la presión superficial. A bajas presiones ($5-15 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) se observan tanto valores positivos como negativos de A^E . Al aumentar la presión, los valores de A^E son ligeramente positivos predominantemente, y por tanto las mezclas presentan un comportamiento muy cercano al ideal: mezclas completamente miscibles o inmiscibles. Los valores más positivos de A^E se encuentran en $\chi_{\text{GING}}-\chi_{\text{DPPC}}-\chi_{\text{CHOL}}=0,1-0,45-0,45$ ($A^E=0,27 \text{ nm}^2\cdot\text{molécula}^{-1}$, $5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) y $\chi_{\text{GING}}-\chi_{\text{DPPC}}-\chi_{\text{CHOL}}=0,33-0,33-0,33$ ($A^E=0,26 \text{ nm}^2\cdot\text{molécula}^{-1}$, $5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$). Por contraste, los valores más negativos de las áreas de exceso, atribuibles a interacciones atractivas son $\chi_{\text{GING}}-\chi_{\text{DPPC}}-\chi_{\text{CHOL}}=0,2-0,6-0,2$ ($A^E= -0,12 \text{ nm}^2\cdot\text{molécula}^{-1}$, $5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) y $\chi_{\text{GING}}-\chi_{\text{DPPC}}-\chi_{\text{CHOL}}=0,1-0,675-0,225$, ($A^E= -0,11 \text{ nm}^2\cdot\text{molécula}^{-1}$, $5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) Estas proporciones presentan valores de A^E negativos a todas las presiones estudiadas.

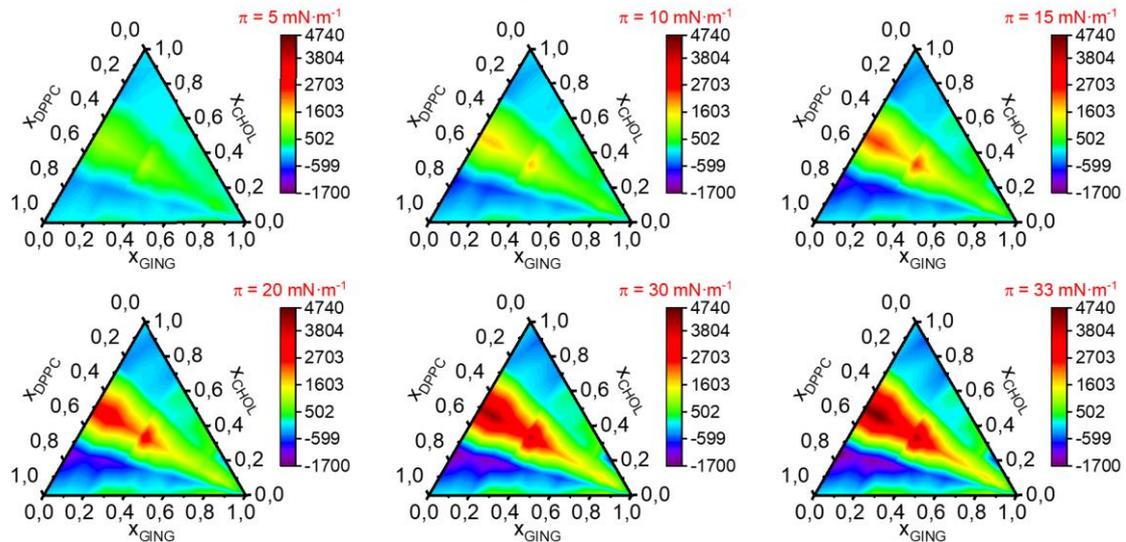


Figura 17. Energías de Gibbs de exceso de mezcla (ΔG_m^E) en sistemas binarios (ejes del triángulo) y ternarios de GING, DPPC y CHOL a las presiones superficiales indicadas.

Respecto a ΔG_m^E , según la **Figura 17**, a presiones bajas se observan valores próximos a cero predominantemente y determinadas regiones con valores ligeramente positivos. Al aumentar la presión hasta llegar a $33 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ se obtienen regiones con mayores interacciones atractivas entre los componentes. Los valores más positivos de ΔG_m^E correspondiente a las mezclas más inestables energéticamente se presentan en $\chi_{\text{GING}}-\chi_{\text{DPPC}}-\chi_{\text{CHOL}}=0,1-0,45-0,45$ ($\Delta G_m^E=4731 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$, $33 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) y $\chi_{\text{GING}}-\chi_{\text{DPPC}}-\chi_{\text{CHOL}}=0,33-0,33-0,33$ ($\Delta G_m^E=4292 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$, $33 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$). Las mezclas con presencia de interacciones atractivas entre sus componentes son aquéllas con valores negativos de energía de Gibbs de exceso: $\chi_{\text{GING}}-\chi_{\text{DPPC}}-\chi_{\text{CHOL}}=0,2-0,6-0,2$ ($\Delta G_m^E= -1508 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$, $33 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$), $\chi_{\text{GING}}-\chi_{\text{DPPC}}-\chi_{\text{CHOL}}=0,1-0,675-0,225$ ($\Delta G_m^E= -1236 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$, $33 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) y $\chi_{\text{GING}}-\chi_{\text{DPPC}}-\chi_{\text{CHOL}}=0,3-0,525-0,175$ ($\Delta G_m^E= -1297 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$, $33 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$).

Finalmente, se analizan los valores de ΔG_m , recogidos en la **Figura 18**. A presiones bajas ($5-15 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) se observa que en cualquier región ΔG_m es ligeramente negativa y por tanto, las mezclas serían estables, destacando dos zonas de mayor estabilidad. Estas se corresponden con las líneas DPPC-CHOL $0,75:0,25$ y $0,25:0,75$ cuando $\chi_{\text{GING}}=0,1-0,65$. A presiones intermedias y altas ($>15 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) se observa la aparición de zonas rojizas, lo que implica la presencia de valores positivos de ΔG_m . Los mayores valores de ΔG_m se encuentran en la línea de DPPC-CHOL $0,5:0,5$, sobre todo cuando $\chi_{\text{GING}}<0,5$. La línea de DPPC-CHOL $0,25:0,75$ presenta valores ligeramente negativos de ΔG_m cuando $\chi_{\text{CHOL}}=0,3-0,75$, mientras que la línea DPPC-CHOL $0,75:0,25$ presenta los valores más negativos de energía, en especial cuando $\chi_{\text{GING}}=0,1-0,7$. El mayor valor de ΔG_m se obtiene en la mezcla ternaria $\chi_{\text{GING}}-\chi_{\text{DPPC}}-\chi_{\text{CHOL}}=0,1-0,45-0,45$ ($\Delta G_m=2403 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$, $33 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$), correspondiente a la mezcla más inestable energéticamente. Por otro lado, los mínimos de energía se observan en las mezclas $\chi_{\text{GING}}-\chi_{\text{DPPC}}-\chi_{\text{CHOL}}=0,2-0,6-0,2$ ($\Delta G_m= -3838 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$, $33 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) y $\chi_{\text{GING}}-\chi_{\text{DPPC}}-\chi_{\text{CHOL}}=0,3-0,525-0,175$ ($\Delta G_m= -3761 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$, $33 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$).

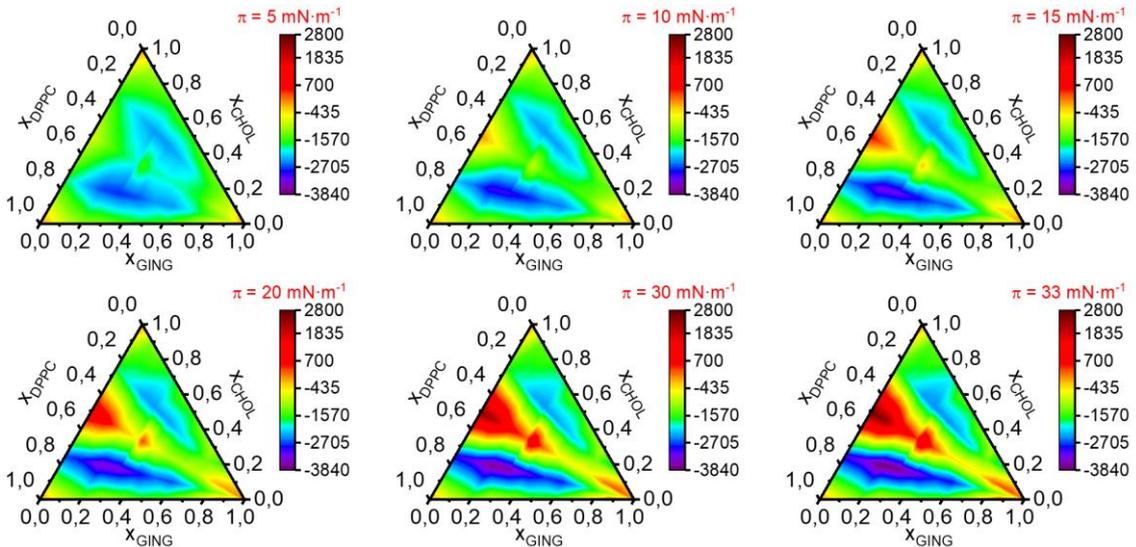


Figura 18. Energías de Gibbs de mezcla (ΔG_m) en sistemas binarios (ejes del triángulo) y ternarios de GING, DPPC y CHOL a las presiones superficiales indicadas.

En conclusión, existen varias mezclas ternarias de mayor estabilidad y miscibilidad. A una presión de $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (valor habitual en el entorno membranaral)²⁸, estas se corresponden con $\chi_{\text{GING}}-\chi_{\text{DPPC}}-\chi_{\text{CHOL}}=0,1-0,675-0,225$ ($A^E= -0,054 \text{ nm}^2\cdot\text{molécula}^{-1}$, $\Delta G_m^E= -1148 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta G_m= -3186 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$, $K_S= 126 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) y $\chi_{\text{GING}}-\chi_{\text{DPPC}}-\chi_{\text{CHOL}}=0,2-0,6-0,2$ ($A^E= -0,052 \text{ nm}^2\cdot\text{molécula}^{-1}$, $\Delta G_m^E= -1411 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta G_m= -3742 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$, $K_S= 123 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$). Dado al interés biológico de las monocapas que contienen DPPC-CHOL 0,5:0,5, se analiza la composición de máxima estabilidad y miscibilidad a $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Se observa que las mezclas más estables son las que tienen valores elevados de χ_{GING} ($>0,5$). Concretamente, la mezcla ternaria de mayor estabilidad y miscibilidad se corresponde con $\chi_{\text{GING}}-\chi_{\text{DPPC}}-\chi_{\text{CHOL}}=0,7-0,15-0,15$ ($A^E= 0,055 \text{ nm}^2\cdot\text{molécula}^{-1}$, $\Delta G_m^E= 1422 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta G_m= -586 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$, $K_S= 123 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$).

4.5 AFM

Para tener más información sobre la topología de las monocapas estudiadas en este TFG, corroborar la posible transferencia de las películas sobre soportes sólidos y complementar los datos obtenidos del análisis termodinámico, se realiza un estudio de algunas muestras seleccionadas. En concreto, se estudia la monocapa de [6]-Gingerol a cuatro presiones superficiales distintas ($10, 20, 30$ y $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) y las monocapas obtenidas de las mezclas binarias tanto de GING-CHOL como de GING-DPPC a varias fracciones molares, transferidas a una presión de $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Se incluyen a continuación las imágenes más representativas.

4.5.1 [6]-Gingerol

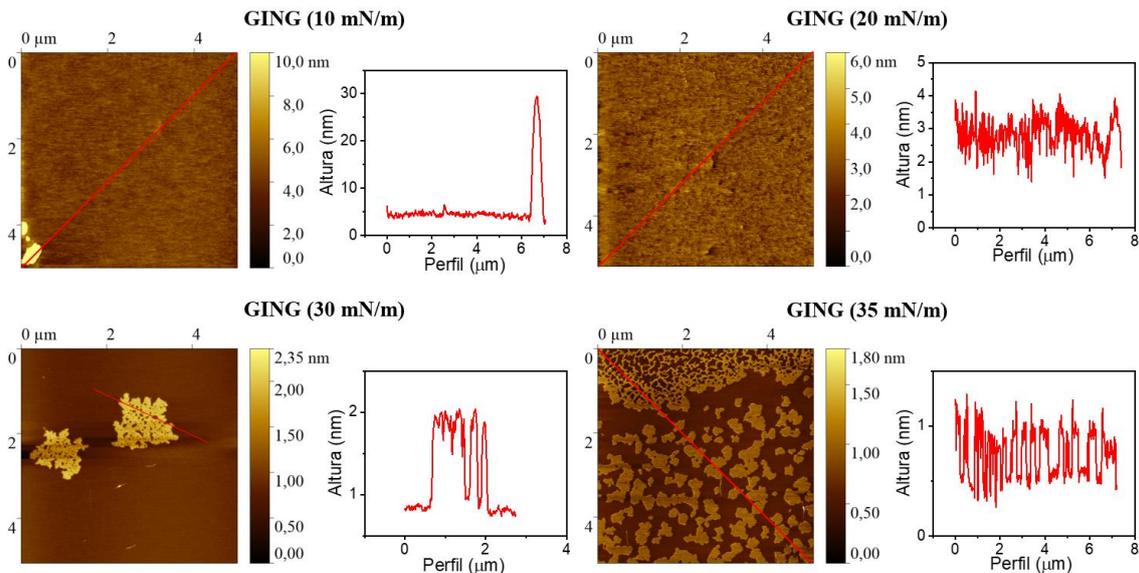


Figura 19. Imágenes de AFM de monocapas de [6]-Gingerol a $10, 20, 30$ y $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ con sus respectivos perfiles (líneas rojas).

La **Figura 19** muestra imágenes representativas de la topología de la monocapa de [6]-Gingerol a distintas presiones superficiales. A $10 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ y $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ se observa una película homogénea con algún agregado molecular tridimensional ocasional. A estas presiones las películas tienen una rugosidad muy baja (raíz cuadrática media, RMS, de la rugosidad de $0,48$

nm). Al llegar a una presión de $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, presión muy cercana al colapso de la monocapa de Langmuir, se observa la presencia de algunas estructuras de aspecto poroso con una altura de $1,08\pm 0,03 \text{ nm}$. Finalmente, al llegar a una presión de $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, se observa la aparición de un elevado número de estructuras con mayor altura a la del resto de la película (del orden de $0,69\pm 0,03 \text{ nm}$). Esto puede ser debido a la co-existencia de dos fases (acorde a los valores de K_s se podría tratar de dos estructuras en fase líquida expandida I y líquida expandida II con distinta orientación molecular), donde parte de las moléculas se encuentran en una posición más vertical, o incluso podría tratarse de colapsos locales relativamente ordenados (no se aprecian estructuras de gran altura características de colapsos desordenados).

4.5.2 GING-CHOL

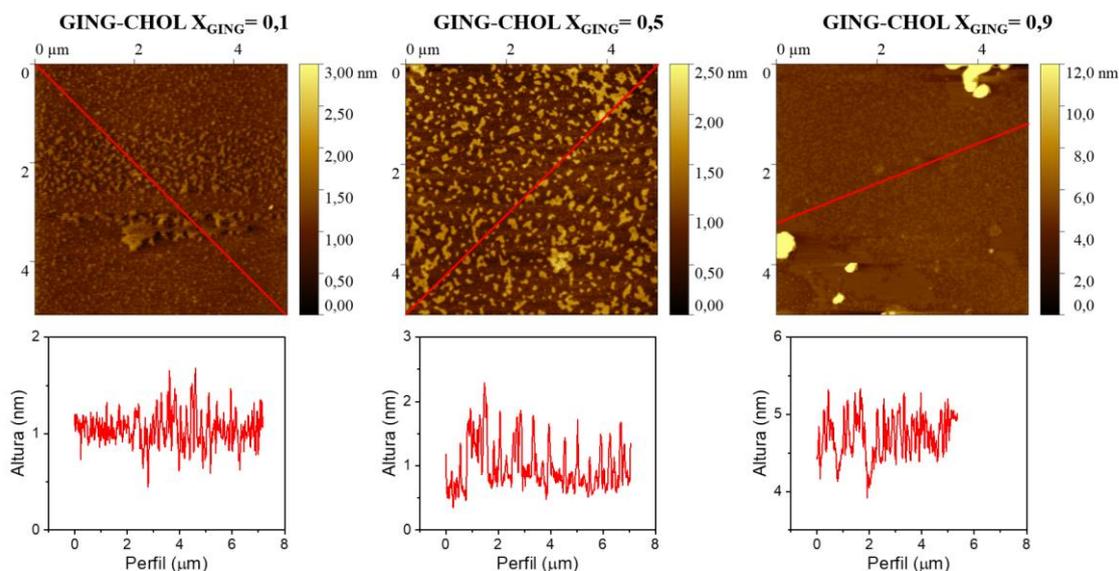


Figura 20. Imágenes de AFM de monocapas de GING-CHOL a $\chi_{\text{GING}}= 0,1, 0,5$ y $0,9$ transferidas a $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ con sus respectivos perfiles (líneas rojas).

La **Figura 20** muestra las imágenes de AFM de monocapas de Langmuir-Blodgett de tres mezclas de GING-CHOL a diferentes fracciones molares. A $\chi_{\text{GING}}= 0,1$ se observa una monocapa relativamente plana. Destaca la presencia de una banda en la zona intermedia de la imagen donde las estructuras son más grandes que en el resto. Esto puede ser debido a dos posibles causas o incluso la combinación de ellas: i) la coexistencia de fases líquidas expandidas y líquidas condensadas y/o ii) una segregación de fases entre el colesterol y el [6]-Gingerol, cosa que parece bastante probable a juzgar por la forma de las curvas de ΔG_m con un mínimo bastante acusado. La segregación de fases es más significativa a $\chi_{\text{GING}}= 0,5$. Esto explicaría el valor ligeramente positivo obtenido de ΔG_m^E y el valor cercano a $0 \text{ nm}^2\cdot\text{molécula}^{-1}$ de A^E , que indica que la mezcla es completamente inmiscible para esta fracción molar. A mayor concentración de [6]-Gingerol se aprecia una monocapa más homogénea con menos segregación de fases, aunque se observa la formación de agregados moleculares tridimensionales. Esto está en consonancia con los resultados termodinámicos obtenidos.

4.5.3 GING-DPPC

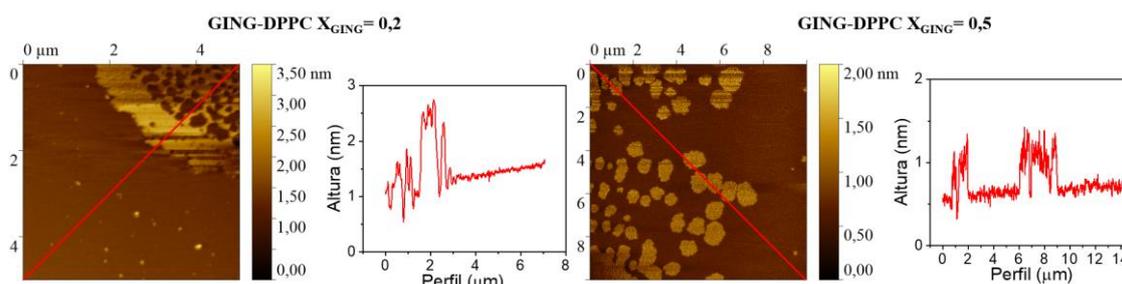


Figura 21. Imágenes de AFM de monocapas de GING-DPPC a $\chi_{\text{GING}} = 0,2$ y $0,5$ transferidas a $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ con sus respectivos perfiles (líneas rojas).

Según la **Figura 21**, a ambas fracciones molares se produce segregación de fases entre los compuestos. Esto es respaldado por los parámetros termodinámicos calculados: los valores de A^E cercanos a cero pueden ser indicativos de inmiscibilidad entre ellos.

5 Resumen y conclusiones

En este TFG se ha estudiado por un lado el comportamiento superficial del [6]-Gingerol puro en la interfase aire-agua y una vez transferido sobre un soporte sólido, película de Langmuir-Blodgett. Además, se ha analizado la interacción del [6]-Gingerol con dos componentes característicos de membranas celulares como son el colesterol y el DPPC para posteriormente ampliar dicho estudio a un sistema ternario que sea capaz de dar una visión general respecto al comportamiento de [6]-Gingerol en un entorno membranal.

El primer paso fue la optimización de las condiciones para la obtención de las isothermas de los compuestos puros, particularmente de [6]-Gingerol. Las isothermas de [6]-Gingerol son reproducibles y muestran una histéresis prácticamente nula. Son monocapas muy fluidas con un bajo módulo de Young. Se caracterizó además la monocapa de [6]-Gingerol mediante AFM, donde se observó una homogeneidad de su monocapa especialmente a presiones por debajo de $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, y se estudió su evolución frente al aumento de la presión superficial donde puede apreciarse o bien una transición hasta una fase en la que las moléculas adoptan una posición más vertical o bien, la formación de colapsos locales ordenados.

Tras un estudio de sistemas binarios GING-CHOL y GING-DPPC donde se obtuvieron y caracterizaron varias monocapas mediante AFM, se procedió a estudiar sistemas donde el análisis de los datos se enfocó a través de dos aproximaciones distintas. Según la aproximación del pseudo-binario se ha obtenido que la composición más estable en un entorno membranal de una célula eucariota (es decir, a una presión superficial de $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ y considerando que DPPC-CHOL 0,5:0,5) es de $\chi_{\text{GING}}-\chi_{\text{DPPC}}-\chi_{\text{CHOL}}=0,5-0,25-0,25$. Es decir, [6]-Gingerol interacciona con la mezcla DPPC-CHOL propia de células eucariotas de modo óptimo en dicha proporción. Según la aproximación del ternario, la mezcla más estable en las mismas condiciones es de $\chi_{\text{GING}}-\chi_{\text{DPPC}}-\chi_{\text{CHOL}}=0,7-0,15-0,15$. Esta sería la composición óptima a la hora de mezclar los componentes en la fabricación de liposomas que incorporen [6]-Gingerol, y que podrían ser utilizados como vehículos transportadores de fármacos, coadyuvantes, complementos alimenticios, etc.

Respecto a futuros experimentos con [6]-Gingerol, este estudio puede ser ampliado a más líneas de proporciones de DPPC-CHOL, y a partir de la caracterización de monocapas ternarias mediante AFM para comprobar su correlación con los cálculos termodinámicos realizados en este TFG. Finalmente, cabe mencionar la posible complementación con otras técnicas de caracterización para estudiar el ordenamiento de los componentes en la monocapa, como es la microscopía de ángulo de Brewster (BAM).

Por último, me gustaría añadir que este TFG me ha permitido la consolidación de habilidades y destrezas adquiridas durante el Grado de Química, así como de la familiarización con el mundo de la investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th ed.; 2004.
- (2) Overington, J. P.; Al-Lazikani, B.; Hopkins, A. L. How Many Drug Targets Are There? *Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5* (12), 993–996. <https://doi.org/10.1038/nrd2199>.
- (3) Alves, A. C.; Ribeiro, D.; Nunes, C.; Reis, S. Biophysics in Cancer: The Relevance of Drug-Membrane Interaction Studies. *Biochim. Biophys. Acta*, **2016**, *1858* (9), 2231–2244. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2016.06.025>.
- (4) Luchini, A.; Vitiello, G. Mimicking the Mammalian Plasma Membrane: An Overview of Lipid Membrane Models for Biophysical Studies. *Biomimetics* **2020**, *6* (1), 3. <https://doi.org/10.3390/biomimetics6010003>.
- (5) Ruiz-Rincón, S.; González-Orive, A.; De La Fuente, J. M.; Cea, P. Reversible Monolayer-Bilayer Transition in Supported Phospholipid LB Films under the Presence of Water: Morphological and Nanomechanical Behavior. *Langmuir* **2017**, *33* (30), 7538–7547. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b01268>.
- (6) Dotor, L.; García-Pinilla, J. M.; Martín, S.; Cea, P. Langmuir and Langmuir-Blodgett Technologies as Nanoarchitectonic Tools for the Incorporation of Curcumin in Membrane Systems. *Nanoscale* **2023**, *15* (6), 2891–2903. <https://doi.org/10.1039/d2nr06631a>.
- (7) Oliveira, O. N.; Caseli, L.; Ariga, K. The Past and the Future of Langmuir and Langmuir-Blodgett Films. *Chemical Reviews*, **2022**, *122* (6), 6459–6513. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00754>.
- (8) Bode Ann M.; Dong Zigang. The Amazing and Mighty Ginger. In *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. 2nd ed.; 2011.
- (9) Chang, K. W.; Kuo, C. Y. 6-Gingerol Modulates Proinflammatory Responses in Dextran Sodium Sulfate (DSS)-Treated Caco-2 Cells and Experimental Colitis in Mice through Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase (AMPK) Activation. *Food Funct* **2015**, *6* (10), 3334–3341. <https://doi.org/10.1039/c5fo00513b>.
- (10) Brown, A. C.; Shah, C.; Liu, J.; H Pham, J. T.; Gang Zhang, J.; Jadus, M. R. Ginger's (*Zingiber Officinale* Roscoe) Inhibition of Rat Colonic Adenocarcinoma Cells Proliferation and Angiogenesis In Vitro. *Phytother. Res.* **2009**, *23*, 640–645. <https://doi.org/10.1002/ptr.2677>
- (11) Prasad, S.; Tyagi, A. K. Ginger and Its Constituents: Role in Prevention and Treatment of Gastrointestinal Cancer. *Gastroenterology Research and Practice*. Hindawi Publishing Corporation 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/142979>.

- (12) Furlan, V.; Bren, U. Protective Effects of [6]-Gingerol against Chemical Carcinogens: Mechanistic Insights. *Int J Mol Sci* **2020**, *21* (3). <https://doi.org/10.3390/ijms21030695>.
- (13) Toimil, P.; Prieto, G.; Miñones, 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>.
- (14) Jurak, M. Thermodynamic Aspects of Cholesterol Effect on Properties of Phospholipid Monolayers: Langmuir and Langmuir-Blodgett Monolayer Study. *Journal of Physical Chemistry B* **2013**, *117* (13), 3496–3502. <https://doi.org/10.1021/jp401182c>.
- (15) Krause, M. R.; Regen, S. L. The Structural Role of Cholesterol in Cell Membranes: From Condensed Bilayers to Lipid Rafts. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47* (12), 3512–3521. <https://doi.org/10.1021/ar500260t>.
- (16) Pubchem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/442793> (Acceso mayo, 2023)
- (17) Pubchem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/160339> (Acceso mayo, 2023)
- (18) Pubchem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5997> (Acceso mayo, 2023)
- (19) Hanwell, M. D.; Curtis, D. E.; Lonie, D. C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.; Hutchison, G. R. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminform*; **2012**, *4* (17). <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>
- (20) Gil, A. Membranas celulares simuladas para aplicaciones en el campo de la salud. TFG, Universidad de Zaragoza, 2022.
- (21) Adamson, A. W.; Gast, A.P. *Physical Chemistry of Surfaces*, 6th ed.; Wiley: New York, 1997.
- (22) Pagano, R. E.; Gershfeld, N. L.; Physical chemistry of lipid films at the air–water interface. II. Binary lipid mixtures. Principles governing miscibility of lipids in surfaces. *J. Phys. Chem.* **1972**, *76*, 1238–1243. <https://doi.org/10.1021/j100653a002>
- (23) Haro, M.; Cea, P.; Gascón, I.; Royo, F. M.; López, M. C. Mixed Langmuir and Langmuir-Blodgett Films of a Proton Sponge and a Fatty Acid: Influence of the Subphase Nature on the Interactions between the Two Components. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (11), 2845–2855. <https://doi.org/10.1021/jp065954b>.
- (24) Dynarowicz-Łątka, P.; Kita K. Molecular interaction in mixed monolayers at the air-water interface. *Adv Colloid Interface Sci* **1999**, *79* (1), 1–17. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(98\)00064-5](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(98)00064-5).
- (25) Davies, J. T.; Rideal, E. K. *Interfacial Phenomena*; Academic Press: New York, 1963.
- (26) Kontomaris, S. V; Stylianou, A. Atomic force microscopy for university students: Application in biomaterials. *Eur. J. Phys.* **2017**, *38* (3), 033003; DOI: 10.1088/1361-6404/aa5cd.
- (27) Zick, S. M.; Ruffin, M. T.; Djuric, Z.; Normolle, D.; Brenner, D. E. Quantitation of 6-, 8- and 10-Gingerols and 6-Shogaol in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *Int. J. Biomed. Sci.* **2010**, *6* (3), 233–240. PMID: 21072137.
- (28) Marsh, D. Lateral pressure in membranas. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1286* (3), 183–223. [https://doi.org/10.1016/s0304-4157\(96\)00009-3](https://doi.org/10.1016/s0304-4157(96)00009-3)

ANEXO I

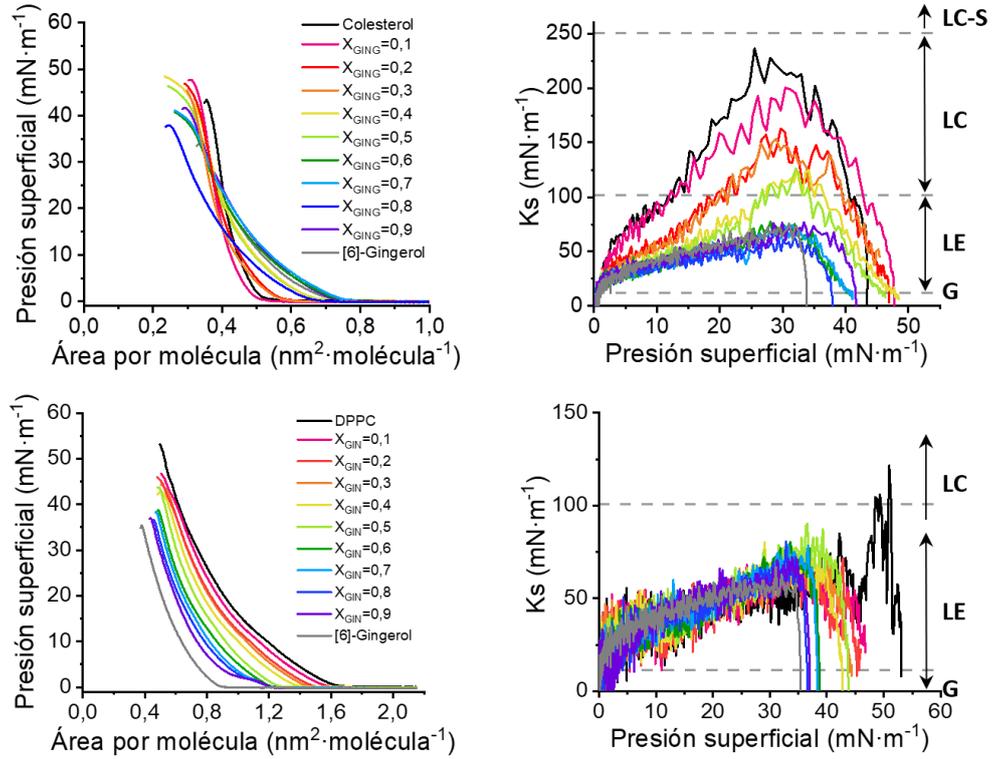


Figura 1. Izquierda: Isothermas π - A de las mezclas binarias [6]-Gingerol-Colesterol y [6]-Gingerol-DPPC; Derecha: Gráficas K_s - π de las mezclas binarias [6]-Gingerol-Colesterol y [6]-Gingerol-DPPC.

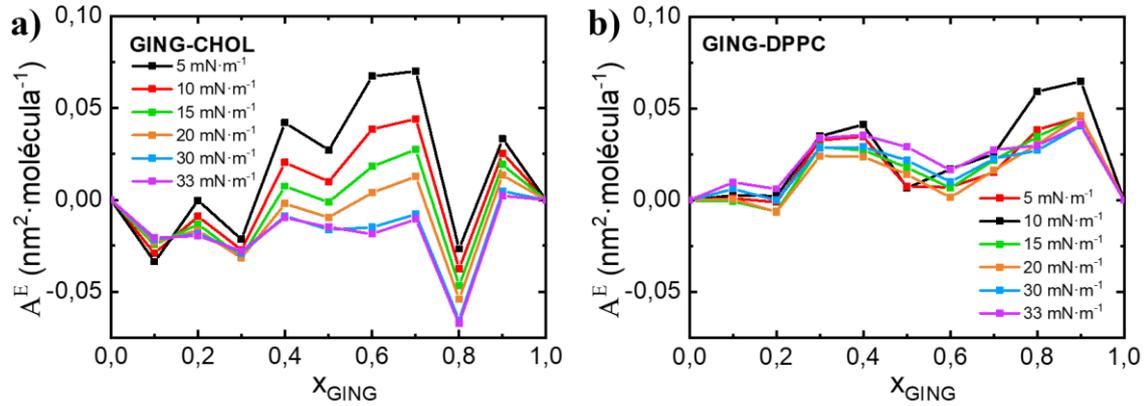


Figura 2. Representación A^E frente a χ_{GING} para las mezclas binarias a) GING-CHOL y b) GING-DPPC.

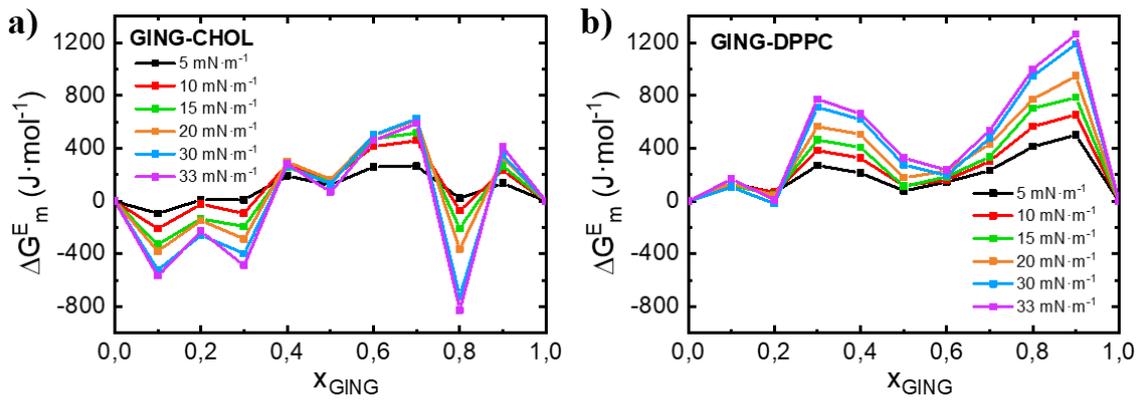


Figura 3. Representación ΔG_m^E frente a χ_{GING} para las mezclas binarias a) GING-CHOL y b) GING-DPPC.

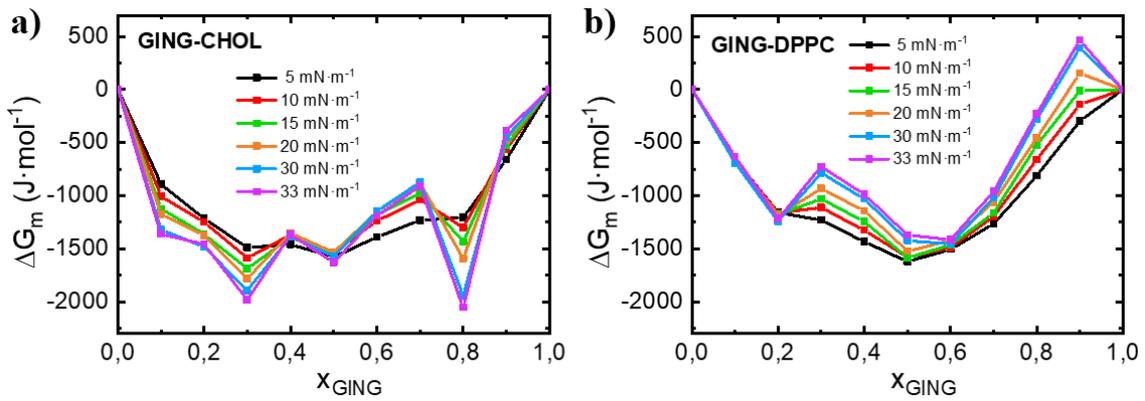


Figura 4. Representación ΔG_m frente a χ_{GING} para las mezclas binarias a) GING-CHOL y b) GING-DPPC.

ANEXO II

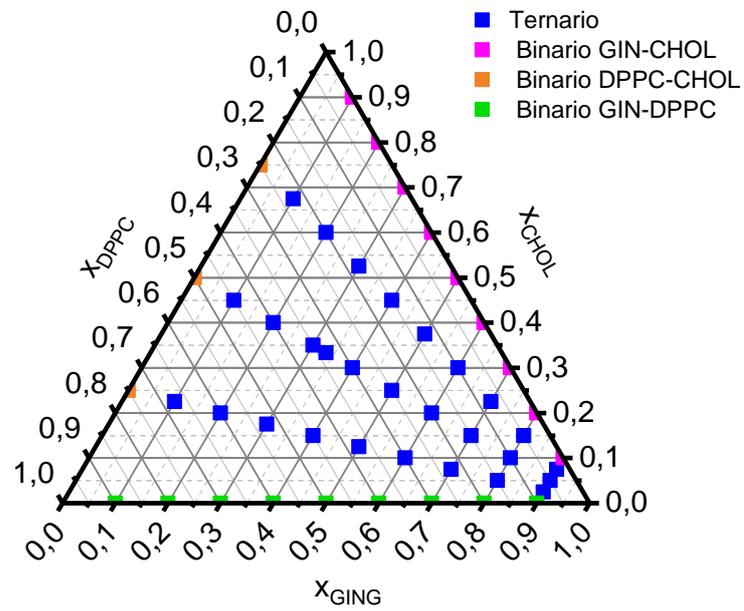


Figura 1. Representación gráfica de las mezclas binarias y ternarias en un diagrama ternario.