

# Trabajo Fin de Grado

Fabricación y caracterización de sistemas  
membranales artificiales para aplicaciones en el  
campo de la salud: Estudio de la arctiina

Autor

Martín Guarini Román

Directoras

Pilar Cea Mingueza

Laura Dotor Delgado

Departamento de Química Física

Facultad de Química

2023-2024

## Contenido

1.	Introducción.....	1
2.	Objetivos.....	2
3.	Parte experimental .....	3
3.1.	Reactivos y disolventes .....	3
3.2.	Equipos e instrumentos .....	3
3.3.	Métodos .....	4
3.3.1.	Espectroscopía Ultravioleta-Visible en disolución .....	4
3.3.2.	Isotermas de Langmuir y transferencias de Langmuir-Blodgett.....	4
3.3.3.	Microscopía de Ángulo de Brewster (BAM) .....	7
3.3.4.	Potencial superficial .....	8
3.3.5.	UV-VIS en sólido .....	8
3.3.6.	Microbalanza de cristal de cuarzo (QCM).....	8
3.3.7.	Ángulo de contacto .....	9
3.3.8.	Microscopía de fuerza atómica (AFM) .....	10
4.	Resultados y discusión .....	11
4.1.	UV-Vis en disolución.....	11
4.2.	Isotermas de Langmuir: optimización de las condiciones.....	12
4.3.	Caracterización de la interfase aire-agua.....	14
4.4.	Caracterización en sustratos sólidos.....	17
5.	Conclusión.....	22

## Resumen

La arctiina, glucósido del lignano arctigenina, es un compuesto de gran interés farmacológico por sus propiedades antiinflamatorias, como antitumoral y sus prometedoras aplicaciones en el tratamiento de enfermedades crónicas. Sin embargo, su baja biodisponibilidad oral dificulta su uso como fármaco. En este TFG se han preparado y caracterizado monocapas de Langmuir de arctiina pura como punto de partida para la futura obtención de liposomas para la vehiculización del fármaco. Además, estudios de la interacción de la arctiina con modelos de membrana celular en la interfase aire-agua podrían aportar luz sobre el mecanismo de acción del compuesto. Para todo ello, es necesario analizar el comportamiento superficial de este compuesto puro. El estudio realizado ha confirmado que la arctiina presenta actividad superficial, y las monocapas de Langmuir obtenidas son estables y presentan histéresis casi nula. Por medio de la caracterización de la película por distintas técnicas se ha determinado que la monocapa es fluida, presentando dos fases diferenciadas de líquido expandido. Las monocapas se han transferido sobre soportes sólidos y se ha estudiado su recubrimiento superficial mediante una microbalanza de cuarzo, así como la topografía de las películas que se ha revelado como muy homogénea, siempre que se transfiera antes del colapso de la monocapa en la interfase aire-agua.

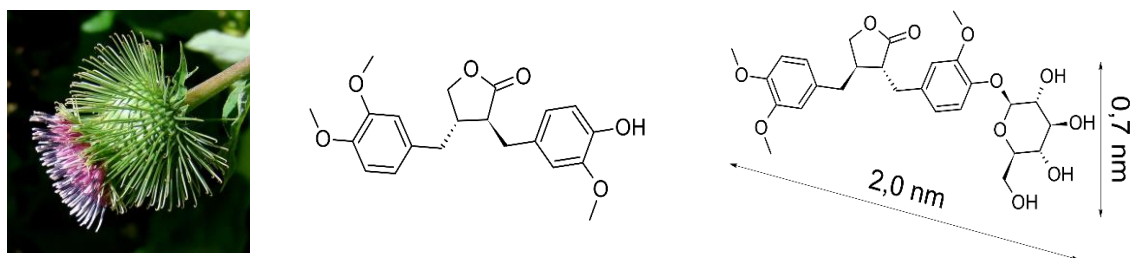
Arctiin, glucoside of the lignan arctinogenin, is a compound of great pharmacological relevance because of its anti-inflammatory properties and its promising applications in the treatment of chronic diseases and cancer. However, its low oral bioavailability hinders its use as a drug. In this final project, pure arctiin Langmuir monolayers were prepared and characterized as a starting point for the future obtention of arctiin liposomes for the drug's vehiculation. Furthermore, studies of arctiin's interaction with model cell membranes at the air-water interphase might shed light on the compound's action mechanism. For all of this, it's necessary to analyze superficial behaviour of the pure compound. The performed studies confirmed that arctiin shows superficial activity, and the observed Langmuir monolayers are stable and show almost no hysteresis. Through the film's characterization by several techniques, it was determined that the monolayer is fluid, showing two distinct expanded liquid phases. The monolayers were transferred to solid substrates and their superficial coating was studied using a quartz microbalance, as well as the films' topography which was found to be very homogeneous, as long as the film was transferred before the collapse in the air-water interphase.

# 1. Introducción

Desde tiempos prehistóricos el ser humano ha empleado remedios medicinales provenientes de plantas para tratar distintas dolencias y enfermedades, acumulando conocimientos por experiencia, pero sin comprender el verdadero mecanismo de acción de los tratamientos. La medicina moderna, la farmacia y la bioquímica han permitido entender los mecanismos detrás de determinadas enfermedades, así como sus correspondientes tratamientos, y afrontarlos de forma más directa y consciente.

En las últimas décadas se está poniendo el foco sobre los remedios tradicionales para buscar tratamientos menos tóxicos y de origen natural. En concreto, la medicina tradicional china incluye un gran número de tratamientos que, si bien no han sido estudiados todavía desde una perspectiva científica, han sido utilizados durante siglos por su efectividad a la hora de combatir distintas dolencias. La comunidad científica tanto en China como en el resto del mundo está volcando esfuerzos en dilucidar por medio del método científico qué remedios son realmente efectivos y cuál es su mecanismo de acción.

Uno de los remedios investigados es el que hace uso de la planta *Arctium Lappa L.*, cuyo empleo en Asia se remonta a hace más de 1800 años por sus potentes efectos antiinflamatorios.<sup>1,2</sup> Su uso para combatir la gripe es frecuente en China, y ha sido científicamente probado.<sup>3</sup> También se ha estudiado su potencial como fármaco auxiliar en el tratamiento de enfermedades crónicas como desórdenes metabólicos y disfunciones del sistema nervioso central<sup>1</sup> e incluso como antitumoral.<sup>2</sup> Sus dos principios activos principales son el lignano arctigenina y su glucósido, la arctiina (Figura 1).



**Figura 1. Izquierda: Flor de *Arctium Lappa L.* Centro: Estructura de la arctigenina. Derecha: Estructura de la arctiina. Distancias medidas con el programa Avogadro<sup>4</sup>**

La arctigenina ha demostrado tener un efecto terapéutico más potente que la arctiina. Sin embargo, su biodisponibilidad oral es muy baja debido a que es metabolizada muy rápidamente por enzimas en el intestino, el hígado y la sangre. La arctiina es transformada por glucosidación a arctigenina en el intestino, para sufrir a continuación las mismas transformaciones metabólicas, resultando en el mismo problema de biodisponibilidad.

Por otro lado, la arctiina es una molécula anfipática, con una “cola” relativamente apolar y una cabeza polar constituida por la molécula de glucosa. Esta propiedad le confiere actividad superficial en el agua. Como tal, podrían obtenerse monocapas o bicapas<sup>5</sup> a partir del compuesto. Mezclando la arctiina con fosfolípidos y colesterol, también podrían obtenerse liposomas (bicapas esféricas), que podrían vehiculizar el

fármaco hasta el tejido diana sin sufrir metabolización, lo cual aumentaría notablemente la biodisponibilidad del fármaco.<sup>6</sup> La obtención de monocapas de arctiina combinadas con fosfolípidos y colesterol también podría servir como modelo de membrana celular para estudiar la interacción de la arctiina con membranas celulares en un entorno controlado, y así contribuir a investigar su mecanismo de acción.<sup>7</sup>

<b>Fórmula molecular</b>	<b>C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>O<sub>11</sub></b>
<b>Masa molecular (g·mol<sup>-1</sup>)</b>	534,6
<b>Aspecto</b>	Sólido blanco
<b>log P (calculado)*</b>	1,8
<b>Carga formal</b>	0
<b>Nº de át. dadores en enlaces de H</b>	4
<b>Nº de át. aceptores en enlaces de H</b>	11
<b>Nº de enlaces rotables</b>	10

**Tabla 1. Propiedades físico-químicas de la arctiina<sup>8</sup>**

\* logP es una medida de la hidrofobicidad o hidrofiliidad de un compuesto, y se define como:

$$\log P = \log \left( \frac{\text{solubilidad en } n\text{-octanol}}{\text{solubilidad en agua}} \right)$$

En este TFG se han obtenido monocapas de arctiina pura por medio de la técnica de Langmuir-Blodgett y se han caracterizado por diversas técnicas tanto en la interfase aire-agua como sobre sustratos sólidos. Un liposoma es una bicapa esférica, que dista mucho de las monocapas planas obtenidas en este TFG. No obstante, los estudios aquí presentados constituyen un primer paso en el estudio de la actividad superficial de la arctiina, que podría llevar a la obtención de liposomas de arctiina combinada con fosfolípidos y colesterol en el futuro.

## 2. Objetivos

Los objetivos principales de este trabajo son académicos y formativos, como corresponde a un TFG del Grado en Química. En su elaboración, he desarrollado mis habilidades tanto de trabajo en laboratorio como de búsqueda bibliográfica, escritura y presentación de resultados. Este TFG me ha permitido formarme en un amplio rango de técnicas propias de la Química de Superficies que no forman parte de los contenidos obligatorios del Grado, y profundizar en la técnica de Langmuir-Blodgett que se imparte en la asignatura de Química Física II. Más allá de los conocimientos adquiridos sobre técnicas concretas, también me ha enseñado a trabajar de forma autónoma, a conocer las medidas de seguridad de trabajo en un laboratorio químico, a enfrentarme a la resolución de problemas en laboratorio, interpretar resultados y el diseño de experimentos.

Por otro lado, este TFG constituye un proyecto de investigación en laboratorio y por tanto tiene también objetivos científicos. Estos se centran en el estudio de la actividad superficial de la arctiina y en la formación de monocapas de arctiina pura en la interfase

aire-agua por medio de la técnica de Langmuir-Blodgett. Dichas monocapas se han caracterizado en la interfase aire-agua, con técnicas como el potencial superficial y la Microscopía de Ángulo de Brewster (BAM). También se han transferido a sustratos sólidos y caracterizado con Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM), Espectroscopía UV-Visible y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), entre otras.

### 3. Parte experimental

#### 3.1. Reactivos y disolventes

Compuesto	CAS	Proveedor	Pureza
Arctiina	20362-31-6	PhytoLab	98%
Acetona	67-64-1	Panreac	99,5%
Cloroformo	67-66-3	Merck	99%
Etanol	64-17-5	Panreac	99,5%
Agua Milli-Q	7732-18-5	Destilador Facultad	Resistividad 18,2 MΩ·cm

Tabla 2. Reactivos y disolventes

La disolución de arctiina empleada se prepara a partir de una muestra adquirida de Phytolab. Se disuelve la totalidad de la muestra en 50 mL de cloroformo. La muestra es de 10,67 mg, por lo que se obtiene una disolución  $4 \cdot 10^{-4}$  M. A partir de esta disolución madre se preparan el resto de disoluciones de menor concentración por dilución. Previamente, ésta se introduce 5 minutos en un baño de ultrasonidos para asegurar que no haya agregados. Todas las disoluciones se almacenan en la nevera después de su uso.

#### 3.2. Equipos e instrumentos

- Cuba KSV NIMA KN 2003 (145 x 580 mm<sup>2</sup>). Cuba de Teflón y barreras de Delrin (POM). Consta de un pozo y brazo móvil para transferir las películas formadas a un sustrato sólido.
- Cuba KSV NIMA 720 (100 x 720 mm<sup>2</sup>). Cuba y barreras de Teflón. Se le han acoplado módulos para medir con Microscopía de Ángulo de Brewster (BAM) y potencial superficial. No permite hacer transferencias.
- Cuba doble KSV (145 x 580 mm<sup>2</sup>). Cuba y barreras de Teflón. Permite realizar dos isotermas/transferencias simultáneas. Se utilizó únicamente como cuba simple.
- Espectrofotómetro UV Varian Cary 50 Bio, con 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). Multimode 8, de la empresa Veeco-Bruker, equipado con una unidad de control Nanoscope V. Cantilevers RTESPA-150 (Bruker), con una frecuencia de resonancia nominal de 150 kHz y una constante de Spring nominal de  $5 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ .

- Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM) Stanford Research Systems modelo QCM200 con sensores QCM25, cuya frecuencia de resonancia fundamental es próxima a los 5 MHz.
- Tensiómetro de la marca Attension modelo Theta Lite.
- Microjeringuillas Hamilton de 1 y 2,5 mL. Empleadas para dispersar y para preparar disoluciones.

### 3.3. Métodos

#### 3.3.1. Espectroscopía Ultravioleta-Visible en disolución

La espectroscopía UV-Vis nos permite estudiar la absorbancia de luz de compuestos químicos en disolución, en el rango de longitud de onda ( $\lambda$ ) de entre 190 y 1100 nm. La absorbancia depende de la concentración según la ley de Beer-Lambert:<sup>9</sup>

$$Abs = \varepsilon \cdot C \cdot l \quad (1)$$

donde *Abs* es la absorbancia, *C* la concentración de compuesto en mol·L<sup>-1</sup>, *l* la longitud del paso óptico en cm (distancia que atraviesa la luz dentro de la cubeta) y  $\varepsilon$  es la absorptividad molar característica del compuesto en el disolvente en L·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

Esta técnica es relevante para caracterizar el comportamiento de la arctiina libre en disolución. La linealidad de la representación *Abs* vs *C* a una misma longitud de onda puede proporcionarnos información sobre la formación de agregados intermoleculares, que dificultarían la obtención de una monocapa. Además, como veremos más adelante, podemos comparar el espectro UV-Vis medido en disolución con el de la monocapa obtenida por Langmuir-Blodgett.

#### 3.3.2. Isotermas de Langmuir y transferencias de Langmuir-Blodgett

La técnica de Langmuir<sup>10</sup> permite obtener monocapas en la interfase aire-agua y estudiar sus interacciones intermoleculares y propiedades químico-físicas. Todas las monocapas de este TFG han sido preparadas a partir de esta técnica.

Los experimentos se realizan en una cuba de unos pocos milímetros de profundidad de material hidrófobo, en nuestro caso teflón. La cuba se llena de una subfase acuosa, para nosotros agua Milli-Q, y se dispersa una disolución de las moléculas que formarán la monocapa en la superficie. Las moléculas deben ser anfipáticas e insolubles en la subfase para que permanezcan en la superficie, mientras que el disolvente debe ser inmisible con el agua, dispersarse fácilmente sobre ésta y ser volátil para evaporarse poco después de la dispersión; tanto la arctiina como el cloroformo cumplen estas condiciones, respectivamente.

La Figura 2 muestra las partes de la cuba de Langmuir. A cada lado de la cuba hay una barrera móvil también de material hidrófobo. Durante el experimento, las barreras se acercan hacia el centro, arrastrando a las moléculas sobre la superficie del agua. Así, las moléculas se encuentran cada vez más cerca entre sí e interaccionan las unas con las otras. Dicha interacción se cuantifica a través de la presión superficial ( $\pi$ ), definida como:

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

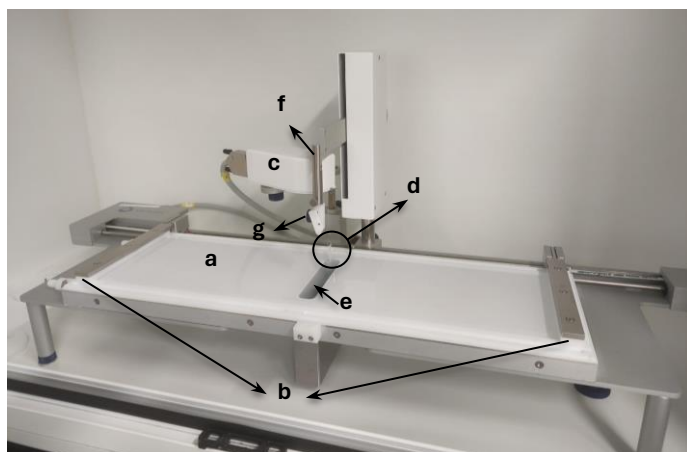
donde  $\gamma_0$  es la tensión superficial de la subfase (antes de dispersar) y  $\gamma$  la tensión superficial a lo largo del experimento, la cual disminuirá conforme las barreras se cierran debido al aumento en la concentración superficial del surfactante. En nuestro caso  $\gamma_0$  es la tensión superficial del agua pura a 20 °C: 72,8 mN·m<sup>-1</sup>. Como  $\pi$  es diferencia de tensiones superficiales, sus unidades también se expresan en mN·m<sup>-1</sup>.

Para registrar el valor de  $\pi$  a lo largo del proceso de compresión, el equipo cuenta con una balanza de Wilhelmy, un dispositivo constituido en nuestro caso por un papel de filtro en la superficie del agua sujeto por un gancho a un sensor de posición previamente calibrado.

Tanto el área como el número de moléculas en la superficie es conocido, por lo que a lo largo del experimento conocemos también el área por molécula (A), calculado mediante la ecuación:

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

donde el Área entre las barreras está en nm<sup>2</sup>, C es la concentración de la disolución dispersada en mol·L<sup>-1</sup>, V el volumen dispersado en L y N<sub>A</sub> el número de Avogadro. Así, las unidades de A son nm<sup>2</sup>·molécula<sup>-1</sup>.



**Figura 2. Partes de la cuba KN 2003**

- a) Cuba de Teflón
- b) Barreras móviles de Delrin
- 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

Así, representando presión superficial vs área por molécula obtenemos lo que se conoce como isoterma  $\pi$ -A o isoterma de Langmuir (Figura 3). En dichas isotermas pueden observarse variaciones en la pendiente, que se corresponden con cambios en la organización de las moléculas en la monocapa. Dichos cambios se describen por analogía con los estados de agregación de un sistema en tres dimensiones (gas, líquido, sólido). A áreas muy grandes, las moléculas están muy separadas entre sí y no interactúan ( $\pi = 0$ ); esta se considera la fase gas (G). En el punto en el que las moléculas empiezan a interactuar se observa un aumento de  $\pi$ . A dicho punto se le denomina el *lift-off* o “despegue” de la isoterma. A áreas menores, las moléculas interactúan, pero tienen cierta libertad conformacional; corresponde a la fase de líquido expandido (LE). Si seguimos comprimiendo, forzamos a las moléculas a reordenarse de forma más rígida dando un líquido condensado (LC). Si se comprime todavía más, se obtiene un estado sólido (S), en el que las moléculas apenas tienen libertad de movimiento, como en una red cristalina. Si insistimos en reducir el área teniendo una monocapa sólida, ésta colapsa y típicamente se observa que la isoterma o bien se “tumba” o bien cae a 0. Cada una de estas fases tiene

una pendiente característica y relacionada con la resistencia de la monocapa a ser comprimida, que es mayor cuanto mayor es el grado de ordenación de las moléculas.

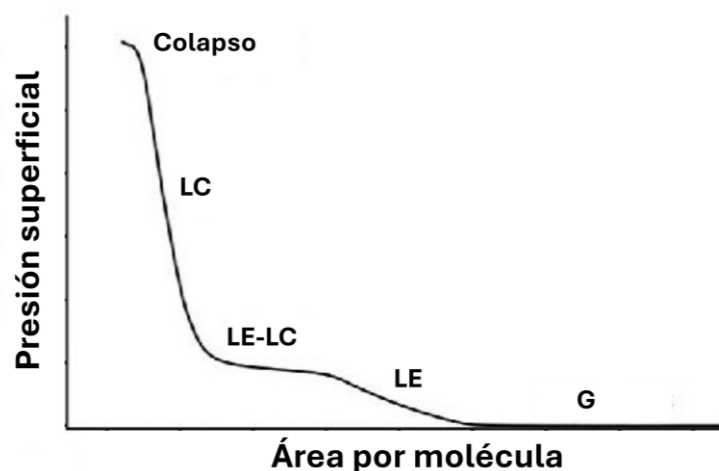


Figura 3. Isoterma  $\pi$ -A genérica. Adaptada de Oliveira et al.<sup>11</sup>

La magnitud que mide la resistencia de la monocapa a ser comprimida es el módulo de Young  $K_s$ ,<sup>12</sup> que tiene unidades de tensión superficial y está definido como:

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

Valores de  $K_s$  entre  $10$ - $50 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  corresponden a una fase líquido expandido,  $100$ - $250 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  a una fase líquido condensado y valores mayores de  $250 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  a una fase sólido.

Cada sustancia o mezcla de sustancias tiene una isoterma característica (a las mismas condiciones experimentales: temperatura, humedad y cuba empleada), que no tiene por qué incluir todas las fases mencionadas en el párrafo anterior, puede presentar varias de cada tipo (por ejemplo LE (I), LE (II)...) y también regiones transitorias entre unas y otras.

Además de los elementos ya mencionados, algunas cubas presentan un pozo en su centro y un brazo móvil, lo que permite transferir las monocapas de la superficie del agua a un sustrato sólido. A este proceso se le denomina transferencia de Langmuir-Blodgett (LB) cuando el sustrato se sitúa perpendicular a la superficie acuosa. Para este TFG, se transfirieron las monocapas emergiendo verticalmente un sustrato de mica del agua, manteniendo  $\pi$  constante. También es posible hacer la transferencia por inmersión, o incluso horizontalmente (isotermas de Langmuir-Schaffer).

A continuación, se describen la metodología y parámetros empleados en este TFG para realizar las isotermas de Langmuir y las transferencias de Langmuir-Blodgett:

En primer lugar, cabe señalar que las isotermas se registraron a  $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ . Como trabajamos con concentraciones tan pequeñas, también es muy importante evitar cualquier contaminación. Los laboratorios de LB son salas semi-blancas en las que se trabaja con calzas, bata y guantes, y que se limpian diariamente para eliminar el polvo.

Antes de cada experimento se limpian tanto la cuba como las barreras con acetona para arrastrar contaminantes orgánicos, y tras su evaporación se lavan de nuevo con

cloroformo, que además de limpiar favorece la hidrofobicidad del teflón. Después, se realizan tres ciclos de llenado de la cuba con agua Milli-Q, vaciándola entre ciclos con ayuda de una bomba de vacío. Tras el tercer llenado se realiza un blanco, cerrando las barreras a alta velocidad. Durante el blanco, la presión no debe variar en más de  $1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ; de lo contrario, esto indicaría la presencia de un contaminante y la necesidad de iniciar el protocolo de limpieza de nuevo.

Paralelamente a la limpieza, se prepara el papel de filtro de la balanza de Wilhelmy, que debe tener la misma anchura (en nuestro caso 0,8 cm) en todos los experimentos. Se limpia con etanol, y tras su evaporación se sumerge en agua Milli-Q.

Una vez la cuba está lista, puede dispersarse la disolución de arctiina en cloroformo, que previamente se ha mantenido 5 minutos en un baño de ultrasonidos para deshacer posibles agregados intermoleculares. La dispersión se realiza con una jeringuilla Hamilton de 1 mL, gota a gota y a una velocidad de  $5 \text{ min}\cdot\text{mL}^{-1}$  para evitar la saturación de la superficie con cloroformo.

Finalmente, programamos el experimento para que una vez finalizada la dispersión el equipo espere 15 minutos y después cierre las barreras a una velocidad constante de  $10 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$  hasta llegar al área mínima, registrando de este modo la isoterma de presión superficial vs área por molécula.

Asimismo, se pueden programar otro tipo de experimentos, como medir la estabilidad de la monocapa o realizar ciclos de histéresis. El primero se basa en estudiar las modificaciones en el área por molécula cuando la monocapa se mantiene a una  $\pi$  constante, durante un tiempo prolongado. El segundo se basa en comprimir y descomprimir la monocapa para registrar la histéresis del proceso de compresión-descompresión.

Para complementar la información que nos proporcionan las isotermas de Langmuir, se acoplaron otras técnicas que se describen a continuación:

### **3.3.3. Microscopía de Ángulo de Brewster (BAM)**

Esta técnica se fundamenta en el principio formulado por David Brewster<sup>13</sup> en 1815. Dicho principio dicta que, al incidir un haz de luz p-polarizada (polarizada en la dirección del plano de la interfase) sobre la propia interfase entre dos medios, hay un ángulo concreto para el cual la reflexión es mínima, idealmente nula. Este es el llamado ángulo de Brewster, que depende de los índices de refracción de los dos medios y para la interfase aire-agua es  $53^\circ$ .

En BAM<sup>14</sup> se emplea un láser que incide sobre la superficie del agua precisamente con este ángulo. Una cámara CCD (dispositivo de carga acoplada) con una resolución lateral de  $12 \mu\text{m}$  capta la luz reflejada por el agua, que para agua pura es casi nula. Debajo de la cámara se coloca una lámina de obsidiana que absorbe la luz transmitida en el agua y evita que llegue hasta la cámara. Si sobre la superficie del agua se forma una película orgánica, como es el caso durante una isoterma de LB, la luz se refleja sobre ella y es detectada por la cámara. Así, podemos observar la formación de la monocapa en tiempo real conforme se realiza la isoterma, y relacionar los cambios en la superficie con el área por molécula y la presión superficial.

### 3.3.4. Potencial superficial

El estudio de las isothermas de potencial superficial vs área por molécula ( $\Delta V-A$ ) puede darnos información valiosa sobre la organización de las moléculas en la monocapa de Langmuir. Para la realización de este experimento, se empleó la cuba NIMA 720 (siguiendo la metodología descrita en el apartado anterior) y se realizó el siguiente montaje: se sitúan dos electrodos a ambos lados de la interfase aire-agua: un electrodo de trabajo, lo más cerca posible de la superficie del agua pero sin tocarla, y un electrodo auxiliar sumergido. Tras aplicar una diferencia de potencial, se produce una acumulación de cargas, de tal forma que la interfase actúa como un condensador. Haciendo vibrar ligeramente uno de los electrodos, las cargas pueden pasar de un electrodo a otro, y se genera una corriente alterna cuya intensidad podemos medir y nos permite calcular el potencial superficial del sistema.<sup>15</sup> La variación del potencial superficial depende en buena medida de la orientación de las moléculas. Además, la técnica es muy sensible y hace posible observar transiciones de fase antes de que se detecten en las isothermas  $\pi-A$ .

### 3.3.5. UV-VIS en sólido

La transferencia de una película de Langmuir sobre un sustrato de cuarzo permite obtener el espectro UV-VIS de la película transferida.

A priori, el espectro una película de Langmuir de un compuesto puro debería presentar los mismos máximos de absorbancia que su espectro en disolución (ignorando el efecto del disolvente). Sin embargo, la formación de agregados intermoleculares puede desplazar estos máximos o provocar el ensanchamiento de las bandas de absorción, lo que permitiría detectar dichos agregados.

Por otro lado, la intensidad en el máximo o, mejor aún, el área bajo la banda de absorción, permiten cuantificar el ángulo de inclinación de las moléculas respecto al sustrato.

Para hidrofilar el cuarzo se siguió el siguiente protocolo extraído de Deng et al.:<sup>16</sup>

- Se limpió el sustrato con agua y jabón, y después con EtOH.
- Se introdujo en un frasco con diclorometano y se mantuvo en baño de ultrasonidos durante 10 minutos.
- Se repitió el anterior paso introduciendo el sustrato en MeOH.
- Se introdujo en MeOH:H<sub>2</sub>O 3:1 con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M y se mantuvo en baño de ultrasonidos durante 30 minutos, tras lo que finalmente se dejó evaporar al aire.

Este procedimiento de hidrofiliación se lleva a cabo para funcionalizar la superficie del cuarzo con grupos -OH, de tal forma que se vuelva mucho más hidrofílica que el cuarzo desnudo y las moléculas de arctiina, que son anfipáticas, se transfieran mejor.

### 3.3.6. Microbalanza de cristal de cuarzo (QCM)

El cuarzo es un material piezoeléctrico, lo que significa que al ser deformado se desplazan las cargas en su estructura y se genera un campo electrostático. Ocurre lo mismo a la inversa: un campo electrostático puede generar una deformación en el cuarzo.

Si sometemos al cuarzo a un campo eléctrico alterno,<sup>17</sup> inducimos un movimiento de vibración con una frecuencia de resonancia específica. Dicha frecuencia de resonancia es extremadamente sensible a la masa del sistema, por lo que puede usarse como balanza para medir variaciones de masa muy pequeñas, del orden de los nanogramos. En este TFG hemos empleado como sensor un disco de cuarzo y oro QCM25 como el mostrado en la Figura 4 Derecha. Consta de una superficie de oro sobre la que pueden adsorberse moléculas orgánicas, y que además actúa como electrodo para generar el campo eléctrico alterno.



**Figura 4. Izquierda: Microbalanza de Cristal de Cuarzo. Derecha: Sensor de QCM.**

La siguiente ecuación relaciona la variación de frecuencia de resonancia con la variación de masa:

$$\Delta f = -C_f \cdot \phi \quad (3)$$

donde  $\Delta f$  es la variación de frecuencia en Hz,  $\phi$  es la variación de masa en  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  y  $C_f$  es el factor de sensibilidad característico del cristal, que para el tipo de sustrato empleado en este trabajo tiene un valor de  $56,6 \text{ Hz}\cdot\text{cm}^2\cdot\mu\text{g}^{-1}$ .

Para este TFG, usamos la técnica de QCM para determinar el ratio de transferencia (RT) resultante de un experimento de LB, definido como:

$$RT = \frac{\text{moléculas}\cdot\text{cm}^{-2} \text{ en el sustrato}}{\text{moléculas}\cdot\text{cm}^{-2} \text{ en la interfase}} \quad (4)$$

donde el término en el numerador se obtiene a partir de la  $\phi$  determinada por QCM y el del denominador se obtiene directamente de los datos de la isoterma  $\pi$ -A. Un RT de 1 indicaría que la monocapa se ha transferido al sustrato perfectamente, y con el mismo empaquetamiento de las moléculas que el que tenía en la interfase aire-agua.

Previamente a la transferencia de la película al sustrato de QCM, se siguió un protocolo de limpieza del sustrato: introducción en cloroformo durante 3 h, lavado con agua tras la evaporación del cloroformo e introducción en EtOH:H<sub>2</sub>O 1:1 durante un día.

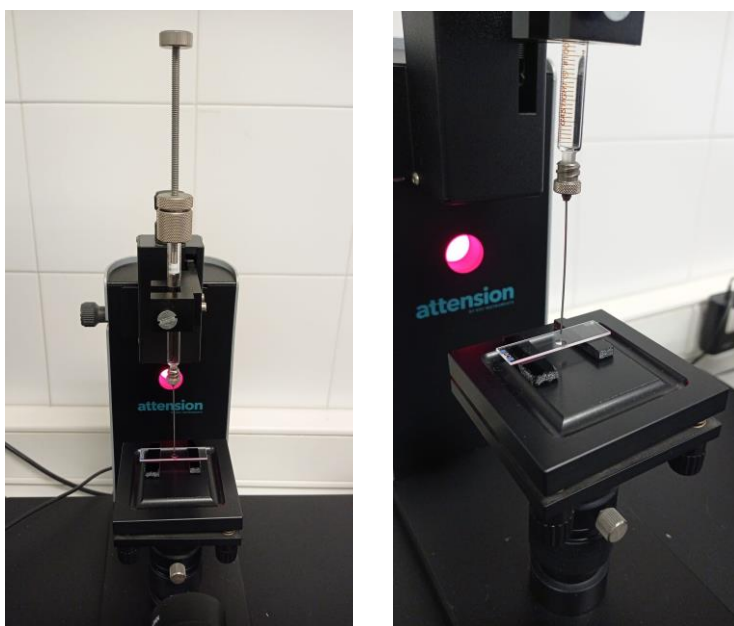
### **3.3.7. Ángulo de contacto**

La forma de una gota de agua sobre una superficie plana está determinada por el equilibrio entre la cohesión de las moléculas de agua entre sí y la adherencia del agua a la superficie. Cuanto más hidrofílica sea la superficie, más “achatada” será la forma de la gota, pues el agua tenderá a extenderse todo lo posible sobre el sustrato para maximizar la superficie de contacto y las interacciones hidrofílicas. Por el contrario, si la superficie es

hidrofóbica la forma de la gota se aproximará a una esfera, minimizando la superficie de contacto.

Esta tendencia puede cuantificarse con el ángulo de contacto entre la gota y la superficie sobre la que se encuentra, y es por tanto una forma de estimar la hidrofiliidad o hidrofobicidad de dicha superficie.

El dispositivo empleado para dejar formar la gota sobre el sustrato y medir el ángulo de contacto es muy sencillo. Se llama tensiómetro y se muestra en la Figura 5:



**Figura 5. Tensiómetro empleado para medir el ángulo de contacto**

En este TFG usamos la técnica del ángulo de contacto para confirmar la transferencia de una película de Langmuir de la interfase aire-agua al sustrato, y para caracterizar el grado de hidrofiliidad o hidrofobicidad de dicha película.

### **3.3.8. Microscopía de fuerza atómica (AFM)**

La microscopía de fuerza atómica se fundamenta en las fuerzas atractivas y repulsivas que actúan sobre una punta móvil, llamada cantiléver.<sup>18</sup> Cuando se acerca el cantiléver a la muestra, este siente atracción por fuerzas de Van der Waals y se deforma hacia ella. Cuando está lo suficientemente cerca, se imponen las fuerzas de repulsión electrónicas y el cantiléver se aleja de nuevo. Este equilibrio entre las fuerzas atractivas y repulsivas genera una vibración del cantiléver.

Existen varios modos de utilización del AFM, pero en este TFG hemos empleado el *tapping mode*. Esta técnica consiste en fijar la frecuencia de vibración del cantiléver y monitorizar la amplitud a la que oscila al desplazarse sobre la muestra. De esta forma la punta nunca está en contacto prolongado con la muestra, y se minimiza la erosión (tanto de la muestra como de la punta). La amplitud se monitoriza gracias a un láser que incide sobre la parte de arriba del cantiléver y se refleja a un fotodiodo con un ángulo que depende de la posición de la punta. El equipo de AFM y su funcionamiento se ilustran en la Figura 6.

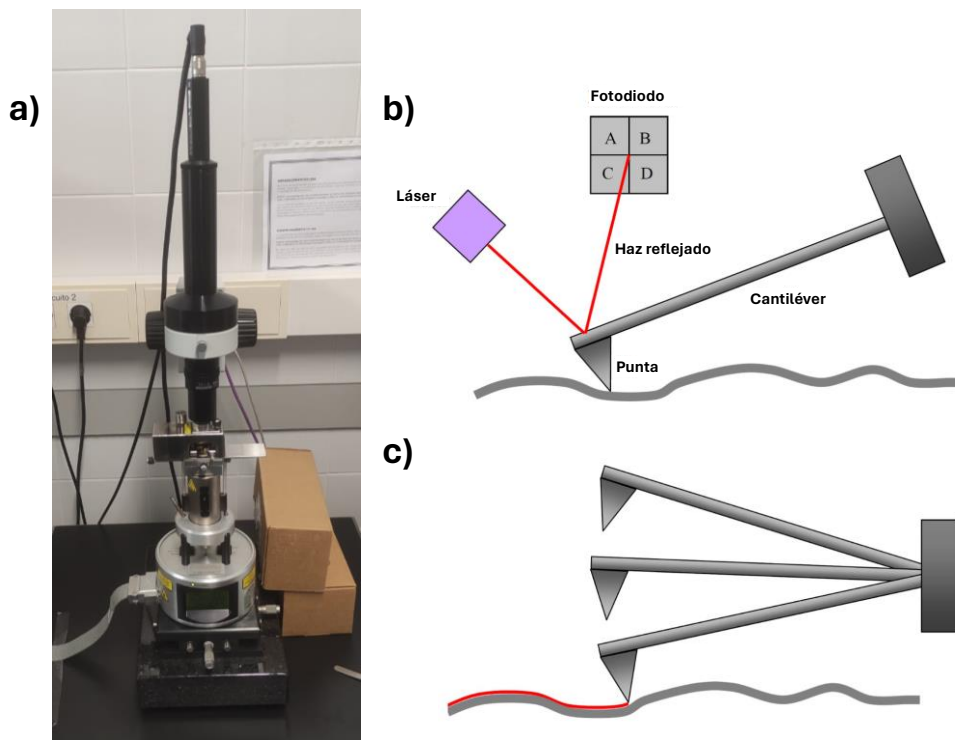


Figura 6. a) Equipo de AFM empleado b) Esquema del funcionamiento básico del AFM c) Esquema del modo *tapping* (Figuras adaptadas de Kontomaris et al.)<sup>19</sup>

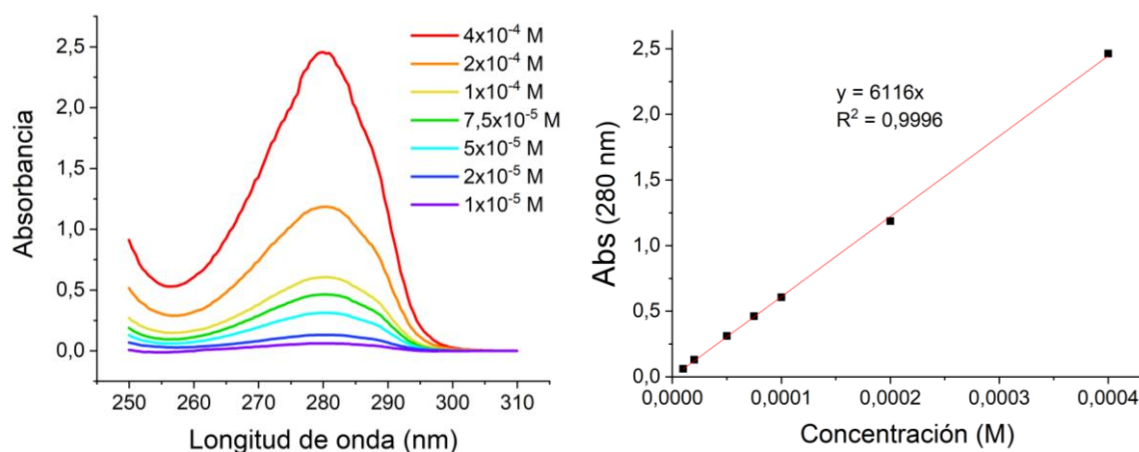
El resultado es un mapa topológico de la muestra con una resolución en el eje z de menos de 0,1 nm. Las imágenes obtenidas nos permiten estudiar la morfología de las monocapas transferidas por LB. Uno de los parámetros más importantes es el espesor del material depositado, ya que está relacionado con la orientación de las moléculas y con la posible formación de multicapas.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. UV-Vis en disolución

Se ha estudiado la absorbancia de la arctiina en disolución a distintas concentraciones, desde  $4 \cdot 10^{-4}$  a  $10^{-5}$  M. Debido al pequeño volumen de disolución madre de arctiina disponible, las disoluciones se prepararon por dilución seriada, empleando cada disolución, una vez medida, para preparar la siguiente. Antes de medir su absorbancia, la disolución se somete a ultrasonidos durante 30 segundos. Los resultados del espectro de absorción  $Abs-\lambda$  y la recta  $Abs(\lambda_{max})$ -Concentración se muestran en la Figura 7:

En el espectro se observa claramente un único máximo de absorción a 280 nm. Esta longitud de onda es coherente con la presencia de grupos aromáticos en la molécula de arctiina (Figura 1). Estos son los grupos cromóforos. Como no hay picos de absorción en el espectro visible, la arctiina es blanca en sólido e incolora en disolución de cloroformo.



**Figura 7. Izquierda: Espectro de absorción UV-Vis de disolución de arctiina a distintas concentraciones en cloroformo. Derecha: Recta Abs ( $\lambda=280\text{nm}$ ) vs Concentración de arctiina**

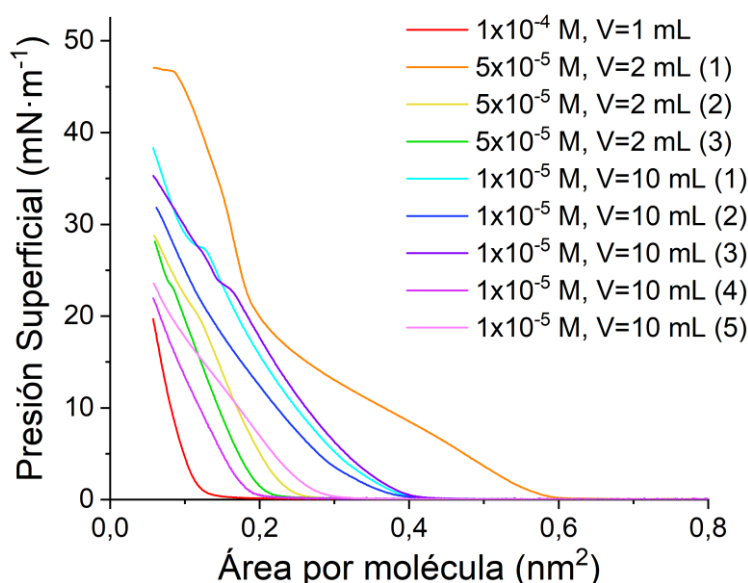
Los datos de absorbancia a 280 nm vs concentración obtenidos se ajustan a la recta  $y = (6116 \pm 55)x$ , con un  $R^2 = 0,9996$ . Es un ajuste muy bueno, lo que nos indica que la ley de Beer-Lambert se cumple en todo el rango de concentraciones estudiado. Esto a su vez confirma que las moléculas de arctiina no forman agregados en disolución, o que estos se deshacen con el tratamiento de ultrasonidos.

Empleando la ley de Beer-Lambert (Ecuación 1) y sustituyendo la pendiente de la recta y el paso óptico  $l = 1$  cm obtenemos un valor de absortividad molar para la arctiina en cloroformo:  $\varepsilon = 6116 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ . No hemos encontrado en la literatura valores publicados de la  $\varepsilon$  de la arctiina, por lo que no podemos contrastarlo.

#### **4.2. Isotermas de Langmuir: optimización de las condiciones**

Tras una búsqueda bibliográfica exhaustiva, no se han encontrado publicaciones en las que se hayan registrado isotermas de Langmuir para la arctiina. En consecuencia, no se ha contado con condiciones o isotermas de referencia para este TFG, y ha sido necesario optimizarlas partiendo de cero.

Los parámetros a optimizar son la concentración de arctiina y el volumen dispersado. Aunque teóricamente la forma de la isoterma debería ser independiente de dichos parámetros, en la práctica no es así, pues se pueden formar agregados u otro tipo de estructuras impredecibles que empeoran la reproducibilidad de las isotermas. Así, se realizaron isotermas de arctiina en una variedad de condiciones (aunque todas en la cuba KN 2003), y se repitieron varias veces. Las isotermas  $\pi$ -A obtenidas se muestran en la Figura 8.



**Figura 8. Isotermas de Langmuir realizadas en búsqueda de las condiciones óptimas**

La isoterma preparada dispersando 1 mL de una disolución  $10^{-4}$  M está muy desplazada hacia la izquierda, motivo por el cual se decidió continuar el proceso de optimización con disoluciones más diluidas.

Con una concentración más baja de  $5 \cdot 10^{-5}$  M o  $10^{-5}$  M, la presión sube a áreas mayores. Sin embargo, todas las isotermas están mucho más comprimidas de lo que es habitual para compuestos de tamaño similar a la arctiina.<sup>6</sup>

Por otro lado, se observa reproducibilidad bastante baja. Para las mismas condiciones, el *lift-off* se desplaza entre 0,2 y 0,4 nm<sup>2</sup>. La forma de la isoterma también varía, aunque el valor de la pendiente ( $K_S$ ) es similar en la mayoría de ellas. En algunas se observan cambios de pendiente, lo que podría indicar transiciones de fase.

La estructura del compuesto estudiado (Figura 1) no se ajusta perfectamente al de una molécula anfipática, con seis oxígenos en su parte “hidrófoba”, los cuales son aceptores de enlaces de hidrógeno, además de los grupos hidroxilo de la molécula de glucosa, que son dadores de hidrógeno. Es decir, no dispone de un grupo fuertemente polar y una zona extensa de la molécula con carácter totalmente apolar. Esto se suma a que la gran flexibilidad conformacional de la molécula puede dar lugar a gran diversidad de interacciones con el agua y entre moléculas de arctiina. Estos dos factores se traducen en que las monocapas de arctiina se encuentran en fases poco condensadas donde las moléculas pueden disponerse con distintas orientaciones, por lo que atribuimos la variabilidad de las isotermas fundamentalmente a estos factores.

Las isotermas a  $5 \cdot 10^{-5}$  M, V=2 mL y  $10^{-5}$  M, V=10 mL se entrecruzan entre sí, y no parece haber una diferencia sistemática entre ellas. A partir de este punto, las condiciones empleadas para la preparación de las monocapas fueron  $5 \cdot 10^{-5}$  M, V=2 mL por ser más rápido y menos problemático en cuanto a saturación de la superficie, al dispersar un menor volumen de cloroformo.

### 4.3. Caracterización de la interfase aire-agua

Las isothermas expuestas en el apartado anterior nos proporcionan información sobre las propiedades de la película formada en la interfase aire-agua. Sin embargo, la correcta caracterización de esta película requiere de complementar la información obtenida de la isoterma con otras técnicas.

El estudio del potencial superficial acoplado a una isoterma  $\pi$ -A nos permite identificar los cambios de fase de la película durante la compresión, y relacionar dichos cambios de fase con la orientación de las moléculas. Esta orientación se relaciona a su vez con el momento dipolar de las moléculas, de acuerdo con el modelo de Helmholtz.<sup>20</sup> Dicho modelo describe la monocapa como un condensador de placas paralelas constituido por dipolos uniformemente distribuidos, y expresa el potencial superficial como:

$$\Delta V = \frac{\mu_n}{A \cdot \epsilon_r \cdot \epsilon_0} + \Psi_0 \quad (5)$$

donde  $\Delta V$  es el potencial superficial,  $A$  es el área por molécula,  $\epsilon_0$  es la permitividad del vacío,  $\epsilon_r$  es la constante dieléctrica relativa,  $\mu_n$  es el momento dipolar por molécula en la dirección perpendicular a la interfase (medido en Debyes o D) y  $\Psi_0$  es la contribución en bicapas ionizadas, en nuestro caso nula por trabajar con una monocapa no ionizada.

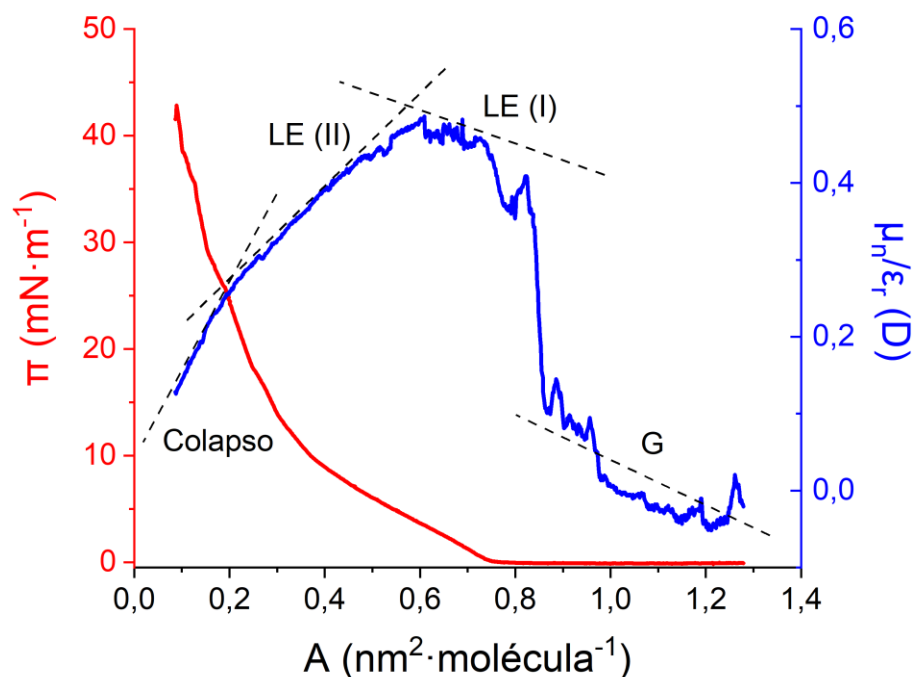
Despejando y teniendo en cuenta las distintas contribuciones a  $\mu_n/\epsilon_r$  se llega a la ecuación:<sup>15</sup>

$$\Delta V \cdot A \cdot \epsilon_0 = \frac{\mu_n}{\epsilon_r} = \frac{\mu_1}{\epsilon_1} + \frac{\mu_2}{\epsilon_2} + \frac{\mu_3}{\epsilon_3}$$

donde  $\mu_1/\epsilon_1$  es la contribución por la reorientación de las moléculas de agua, y  $\mu_2/\epsilon_2$  y  $\mu_3/\epsilon_3$  corresponden a la parte hidrofílica e hidrofóbica de las moléculas anfipáticas, respectivamente.

Los resultados del experimento se exponen en la Figura 9. Puede observarse que el potencial superficial es coherente con la isoterma. Presenta los mismos cambios de pendiente, pero un poco antes, como era de esperar.

Entre 1,3 y 0,85 nm<sup>2</sup>, las moléculas de agua orientadas aleatoriamente proporcionan la principal contribución a  $\mu_n/\epsilon_r$ , por lo que es cercana a cero. Cerca de 0,8 nm<sup>2</sup> las moléculas de arctiina comienzan a interactuar entre sí, como indica el lift-off de la isoterma  $\pi$ -A. Esto provoca que los grupos hidrofílicos de la arctiina y las moléculas de agua a su alrededor se ordenen, y consecuentemente  $\mu_n/\epsilon_r$  aumente repentinamente hasta 0,4 D y continúe aumentando hasta llegar a 0,5 D en 0,6 nm<sup>2</sup>. A continuación la pendiente se vuelve negativa, y cerca de los 0,2 nm<sup>2</sup> se hace más pronunciada, coincidiendo con sucesivos cambios de pendiente en la isoterma  $\pi$ -A. En esta zona la monocapa está ya muy cercana al colapso que se produce a 0,1 nm<sup>2</sup>, y es posible que se estén dando pequeños colapsos locales.



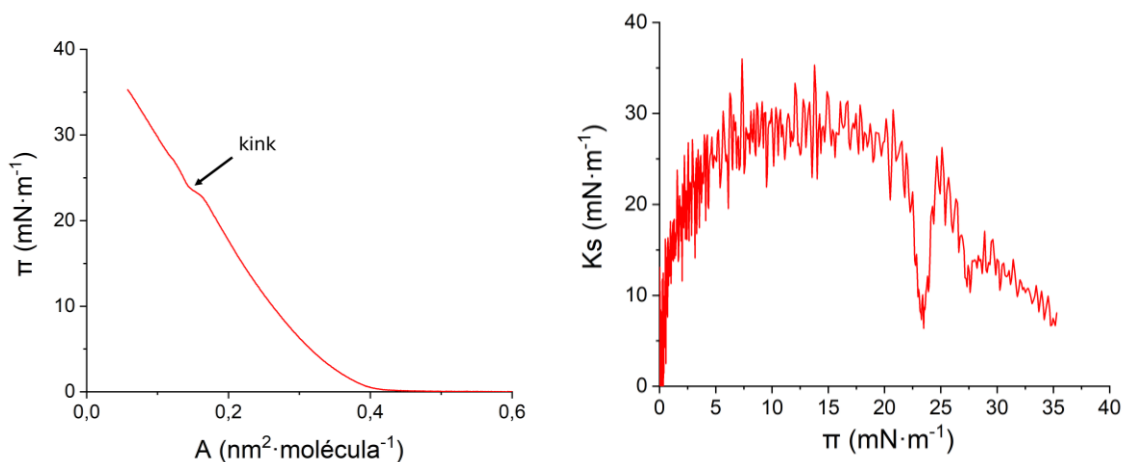
**Figura 9. Isoterma  $\pi$ -A y potencial superficial normalizado. Se indican las distintas pendientes correspondientes a fases de la monocapa**

Una vez identificados los cambios de pendiente de la isoterma, es necesario asignar a cada región entre ellos un estado de agregación. Esto podemos hacerlo mediante el estudio de  $K_s$ .

Pese a la baja reproducibilidad entre isotermas, podemos ver en la Figura 8 que la mayoría de ellas tienen una forma y una pendiente similar, lo cual se aprecia más claramente con las representaciones  $K_s$ - $\pi$ . En la Figura 10 se muestra una de las isotermas  $\pi$ -A junto a su representación  $K_s$ - $\pi$  correspondiente.

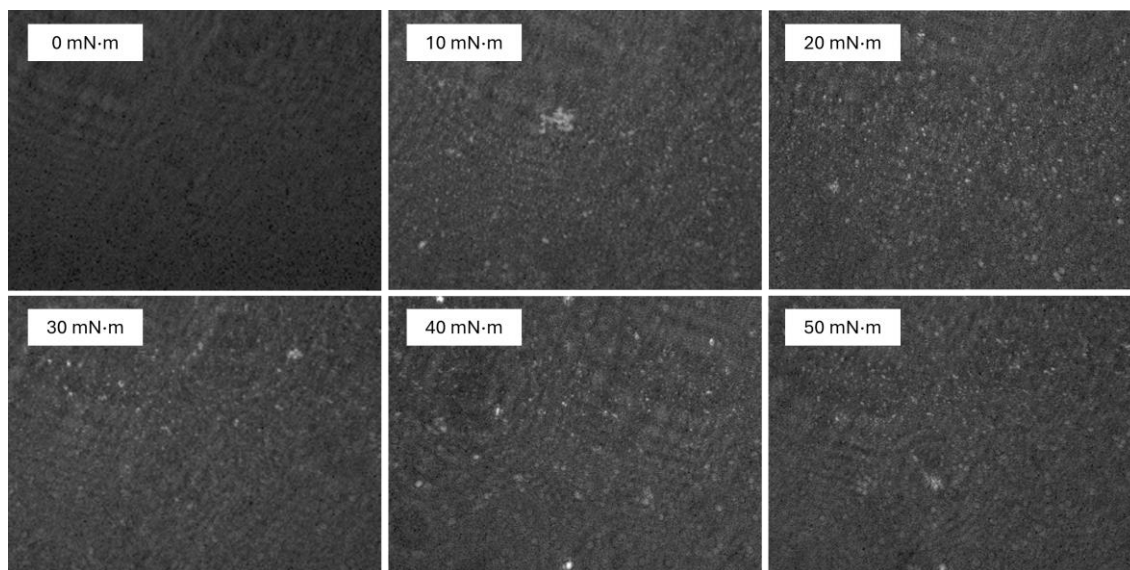
Antes del lift-off, el sistema se encuentra en fase gas y  $K_s$  es 0. Durante el lift-off,  $K_s$  aumenta rápidamente hasta alcanzar un máximo de 25-30  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , que al ser menor de 50  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$  corresponde a una fase de líquido expandido. Este máximo se alcanza en nuestro caso a presiones superficiales de 5-10  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ . Así, las dos fases diferenciadas detectadas por medio del estudio del potencial superficial (Figura 9) son LE (I) y LE (II).

Tras alcanzar el máximo,  $K_s$  se mantiene constante hasta presiones superficiales de 15-25  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , a las cuales se produce una caída brusca. Esta caída se presenta como un pequeño llano o “kink” en la isoterma  $\pi$ -A, y puede corresponder a un colapso local. A presiones mayores que la de este colapso,  $K_s$  se recupera y vuelve a caer poco después. Por último,  $K_s$  sigue disminuyendo poco a poco, pero sin llegar a 0. Este comportamiento podría indicar pequeños colapsos locales sucesivos, que darían lugar a multicapas poco ordenadas.



**Figura 10. Izquierda: Isoterma  $\pi$ -A registrada en condiciones 10 mL  $10^{-5}$  M. Derecha: Representación  $K_s$ - $\pi$  obtenida a partir de los datos de esta misma isoterma**

Gracias a la técnica de BAM, es posible visualizar la formación de la monocapa en la interfase aire-agua a lo largo del proceso de compresión. En la Figura 11 se muestran las imágenes de BAM de la película de arctiina a distintas presiones. Comparando la imagen a  $0 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  con las demás, se observan claramente los dominios de arctiina de la película en formación. No hay diferencias significativas entre las imágenes a distintas presiones, y en todas ellas observamos que la película es homogénea y no presenta estructuras tridimensionales.



**Figura 11. Imágenes de BAM de la película de Langmuir de arctiina a las presiones superficiales indicadas. Todas las imágenes tienen unas dimensiones de  $3620 \mu\text{m} \times 2564 \mu\text{m}$**

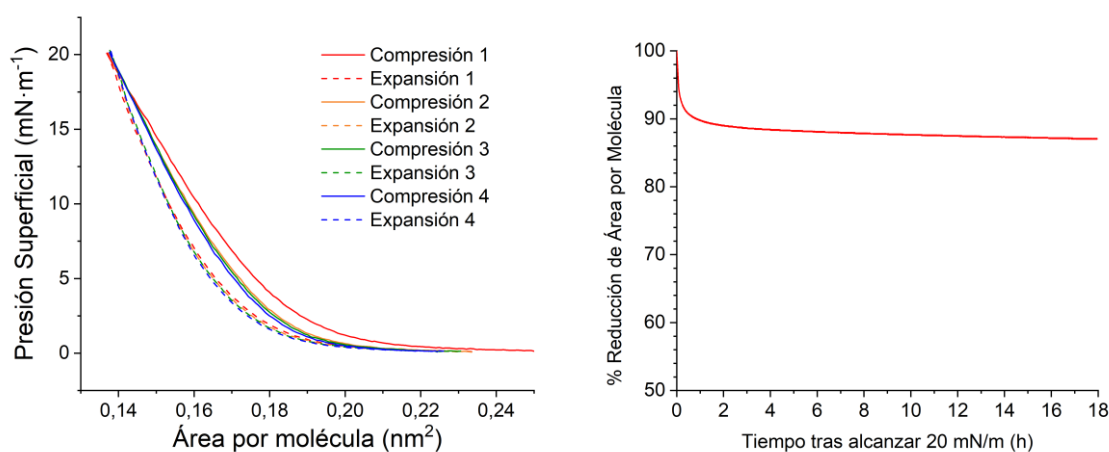
Otros aspectos importantes de una película de Langmuir son su reversibilidad y estabilidad. Ambas propiedades se estudiaron en la cuba KN 2003.

Para evaluar la reversibilidad, se realizó un experimento de histéresis, consistente en realizar una isoterma en la que se comprimieron las barreras hasta alcanzar una presión de  $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , y posteriormente se expandieron hasta que la presión volviera a caer hasta 0. Se repitió el ciclo un total de 4 veces.

En la Figura 12 Izquierda vemos que el efecto de histéresis es mínimo, pues la curva de expansión se desplaza no más de 0,04 nm<sup>2</sup> a la izquierda respecto a la de compresión. Entre el primer y segundo ciclo de compresión también hay un pequeño desplazamiento, pero el resto de los ciclos de compresión se superponen entre sí, y lo mismo puede decirse de todos los ciclos de expansión. Todo esto implica buena reversibilidad de la película.

Para evaluar la estabilidad, se realizó una isoterma en la que, una vez alcanzada, se mantuvo la presión a 20 mN·m<sup>-1</sup> durante 18 horas y se monitorizó también la caída del área por molécula (lo cual se relaciona con la compresión de las barreras necesaria para mantener la presión constante).

En la Figura 12 Derecha podemos apreciar una reducción del 10% del área por molécula durante la primera hora de experimento, y una posterior reducción constante y muy lenta durante las horas restantes, llegando a reducirse hasta el 12% a las 18 h. Estos resultados son indicativos de una buena estabilidad de la película.



**Figura 12.** Izquierda: Isoterma  $\pi$ -A del experimento de histéresis entre 20 y 0 mN·m<sup>-1</sup>. Derecha: Representación de la reducción de A vs tiempo para el experimento de estabilidad a 20 mN·m<sup>-1</sup>

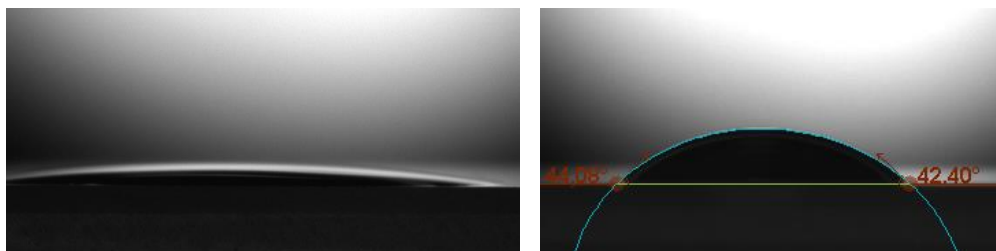
#### 4.4. Caracterización en sustratos sólidos

La organización molecular de la arctiina en películas de Langmuir-Blodgett se ha estudiado mediante diversas técnicas que implican la transferencia previa de la película a un sustrato sólido.

Para determinar el ratio de transferencia, se realizó una transferencia a sustrato de QCM a 20 mN·m<sup>-1</sup>. Se midió la frecuencia de vibración del sustrato antes y después de la transferencia, obteniendo una  $\Delta f = -68$  Hz. Teniendo en cuenta las ecuaciones 3 y 4, y el hecho de que el material se transfiere por ambos lados del sustrato, la masa molar de la arctiina, y el área por molécula de la isoterma en el momento de realizar la transferencia (0,1509 nm<sup>2</sup>·molécula<sup>-1</sup>), se obtiene un RT = 1,021. Este RT indica que la monocapa ha sido transferida de la interfase aire-agua al sustrato de oro manteniendo la misma organización molecular.

Para explorar en mayor profundidad la orientación de las moléculas y la deposición, también se realizó una transferencia a  $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  sobre sustrato de cuarzo hidrofílico para medir la absorbancia en UV-Vis de la película de LB.

Se estudió la hidrofiliidad de la superficie antes y después de la transferencia mediante la técnica del ángulo de contacto. En la Figura 13 Izquierda apreciamos que la gota de agua se extiende totalmente sobre la superficie de cuarzo, demostrando que la hidrofiliización ha sido efectiva. Una vez se ha transferido la monocapa, el resultado del experimento es distinto, y una vez la gota se estabiliza se obtiene un ángulo medio de  $43 \pm 1^\circ$ .



**Figura 13. Ángulo de contacto con gota de agua del sustrato de cuarzo hidrofílico antes (izquierda) y después (derecha) de la transferencia de una monocapa de arctiina a  $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$**

Como este ángulo es inferior a  $90^\circ$ , se considera que la superficie es hidrofílica,<sup>21</sup> aunque mucho menos que antes de la transferencia. Este ángulo nos confirma que la arctiina se ha transferido al sustrato, probablemente anclándose por medio de la molécula de glucosa y dejando al descubierto los grupos éter de la parte “hidrófoba”, lo que justifica el cambio de hidrofiliidad observado.

En cuanto al espectro UV-Vis de la película transferida sobre el sustrato de cuarzo, si bien se distingue un pico cerca de  $280 \text{ nm}$ , la absorbancia es muy baja y no está bien resuelto, por lo que no pueden hacerse interpretaciones cuantitativas.

Para poder estudiar su topología en la escala nanoscópica, se transfirieron sobre sustrato de mica películas de arctiina a  $10, 15, 20, 25$  y  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  y se tomaron imágenes de dichas películas en AFM.

En la Figura 14 vemos que la película a  $10 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  presenta dos tipos de dominios con diferencias de alturas de entre  $0,6$  y  $1 \text{ nm}$  entre ellos. En la imagen zoom de  $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$  podemos apreciar poros en ambos dominios, lo que nos indica que lo que observamos no es mica en ninguno de los dos, sino material depositado que se ha organizado de forma distinta. La zona más baja correspondería a moléculas de arctiina más “tumbadas”, mientras que en la más elevada las moléculas se habrían dispuesto de forma más vertical. Estos dos dominios pueden relacionarse con los estados LE (I) y LE (II) que detectábamos en las isotermas en la sección anterior.

En la Figura 15 observamos que la película a  $15 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  es muy homogénea y plana. Pueden apreciarse algunos pequeños poros distribuidos por la película. Las estructuras apreciadas en las imágenes nos indican que las moléculas de arctiina están muy ordenadas en dos tipos de fase LE, con una orientación inclinada respecto a la superficie y ligeramente distinta entre sí.

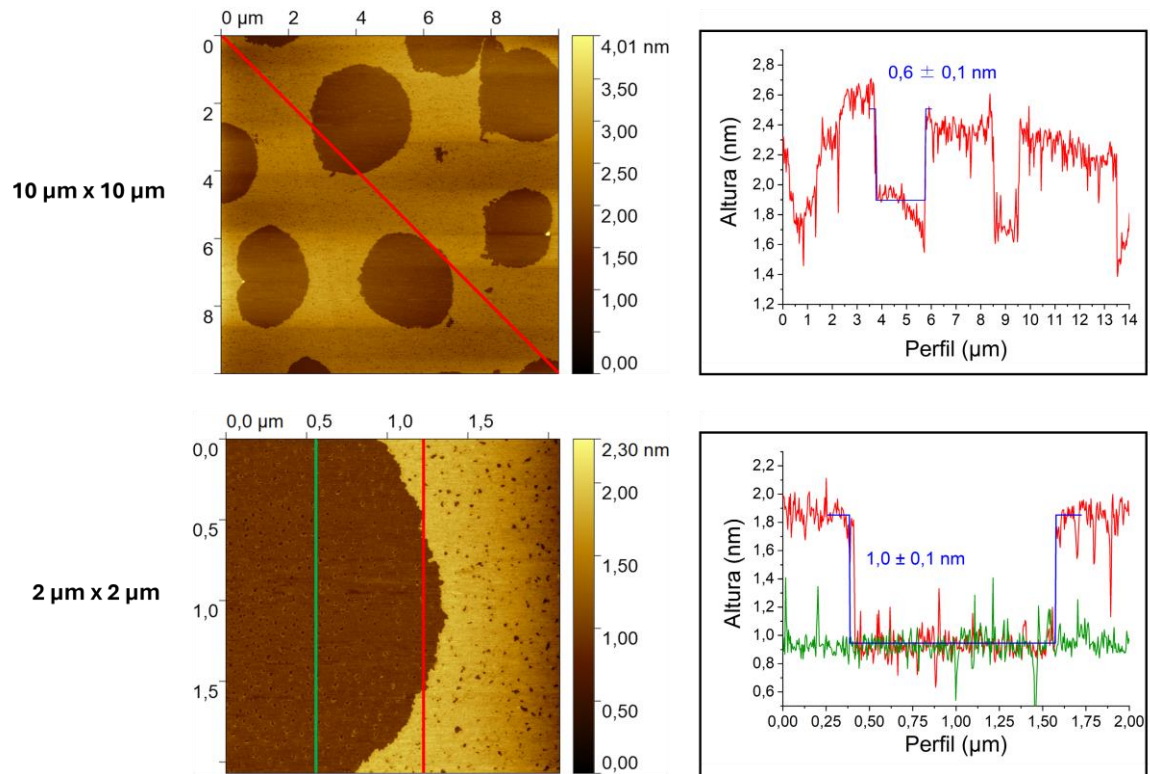


Figura 14. Imágenes de AFM de la película de arctina transferida a  $10 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , con sus respectivos perfiles marcados con una línea en la imagen. En los perfiles se indica la diferencia de altura entre dominios

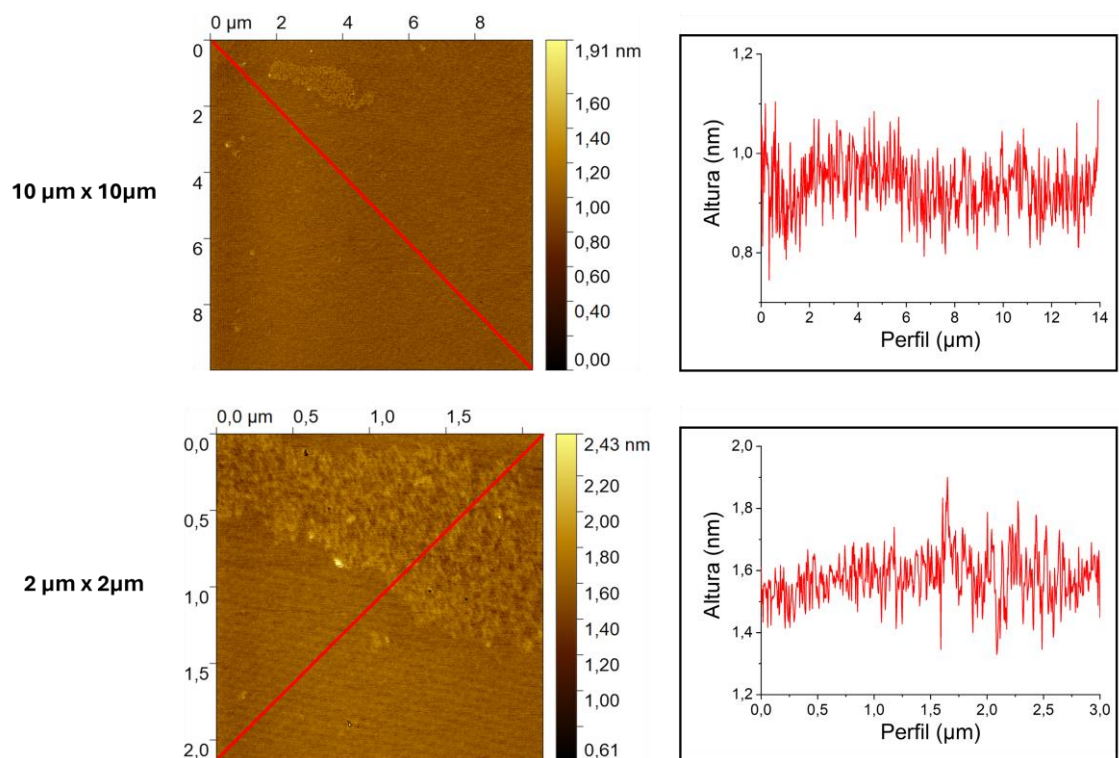
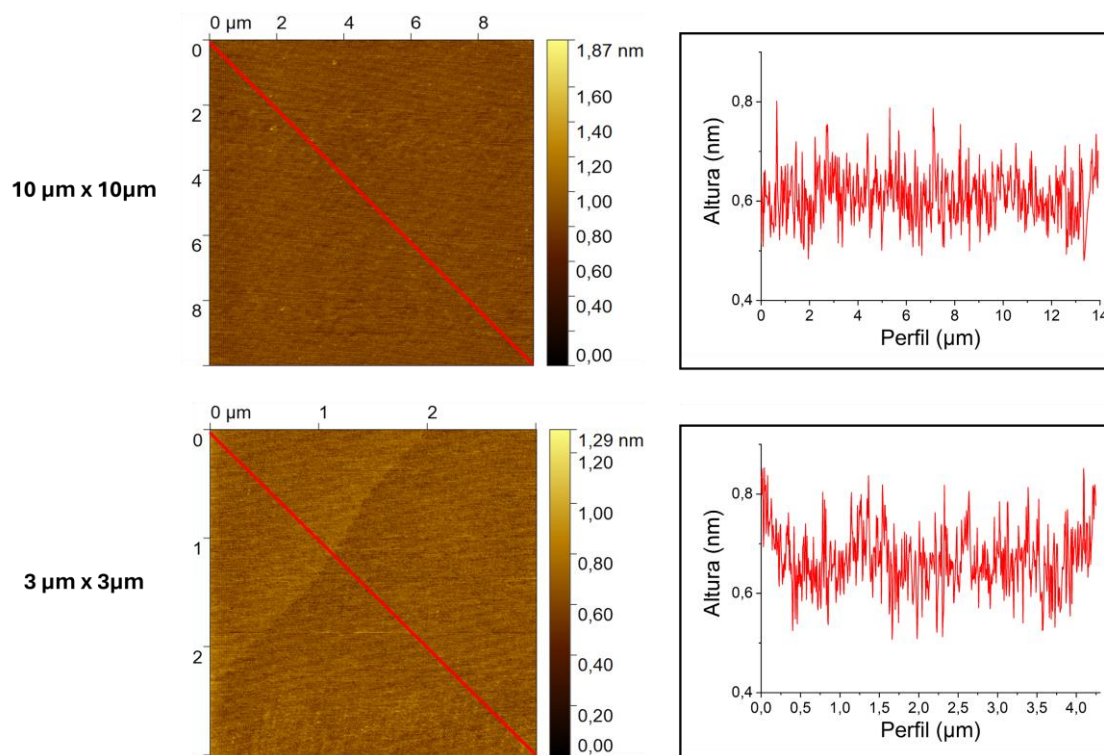


Figura 15. Imágenes de AFM de la película de arctina transferida a  $15 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , con sus respectivos perfiles marcados con una línea en la imagen

En la Figura 16 vemos que la película a  $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  es también muy homogénea, y no presenta poros, por lo que no pudo obtenerse una estimación de su espesor. Se exploraron varias zonas de la muestra tomando imágenes  $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$  y no se apreciaron diferencias respecto a la imagen expuesta. Aparentemente toda la película está organizada en una única fase de LE.



**Figura 16. Imágenes de AFM de la película de arctiina transferida a  $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , con sus respectivos perfiles marcados con una línea en la imagen**

En la Figura 17 podemos observar que la película a  $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  es una vez más bastante homogénea y no presenta poros, aunque sí algunas estructuras tridimensionales que se identifican como picos de hasta 2 nm de altura. Al igual que con la película a  $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , no conocemos su espesor. También pueden identificarse dos dominios LE distintos, siendo uno muy mayoritario frente al otro.

En la Figura 18 se aprecia una topología muy distinta a las anteriores para la película a  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ . La superficie es mucho más rugosa, y hay numerosos pozos con un agregado en el centro. Estos pozos podrían corresponder a colapsos locales en la membrana, formando estructuras líquidas ordenadas similares a las balsas lipídicas de las membranas celulares (*lipid rafts*).<sup>22</sup> La profundidad de estos pozos varía notablemente a lo largo de la muestra, yendo desde los 2 hasta los 6 nm. Los agregados en el centro de cada uno de los pozos pueden estar a la altura de la película o por encima de ella.

Las películas a presiones entre  $10$  y  $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  son muy homogéneas y planas, y los espesores medidos por medio de los poros son menores a 2 nm; la longitud de la arctiina en su conformación extendida. Estas observaciones confirman que dichas películas son monocapas de Langmuir, sin formación de multicapas o agregados supramoleculares importantes. Por otro lado, la película a  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  corresponde a una estructura de multicapas desordenadas resultante de una serie de colapsos locales en la monocapa.

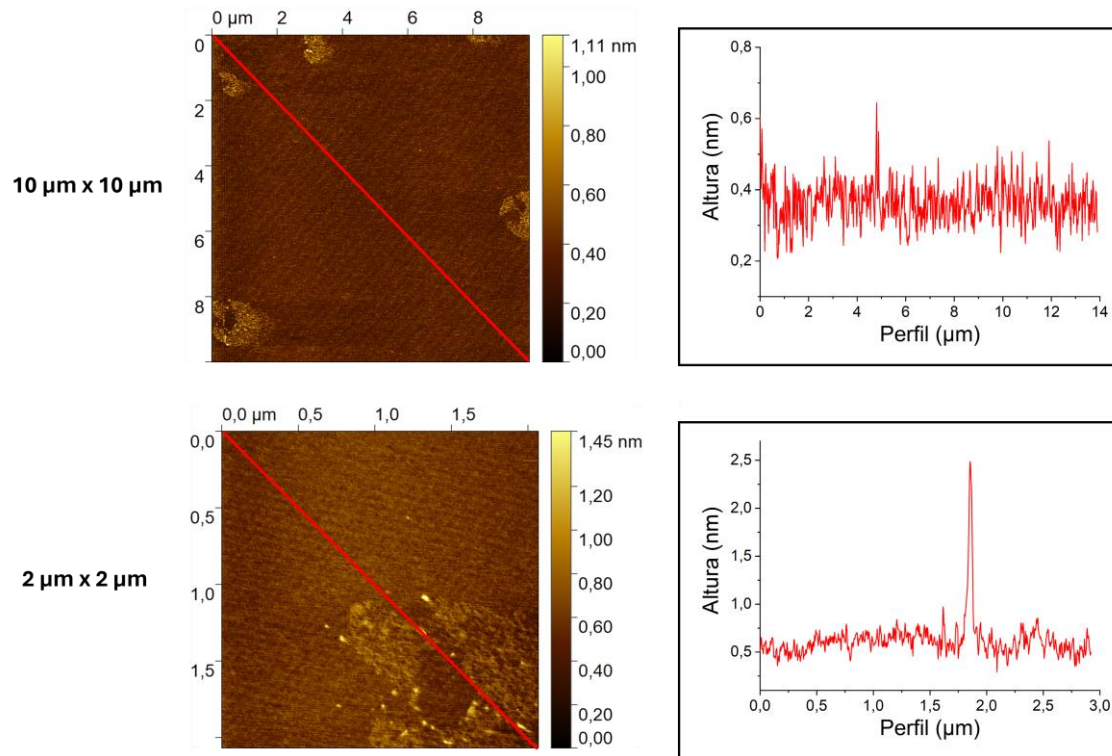


Figura 17. Imágenes de AFM de la película de arctiina transferida a  $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , con sus respectivos perfiles marcados con una línea en la imagen

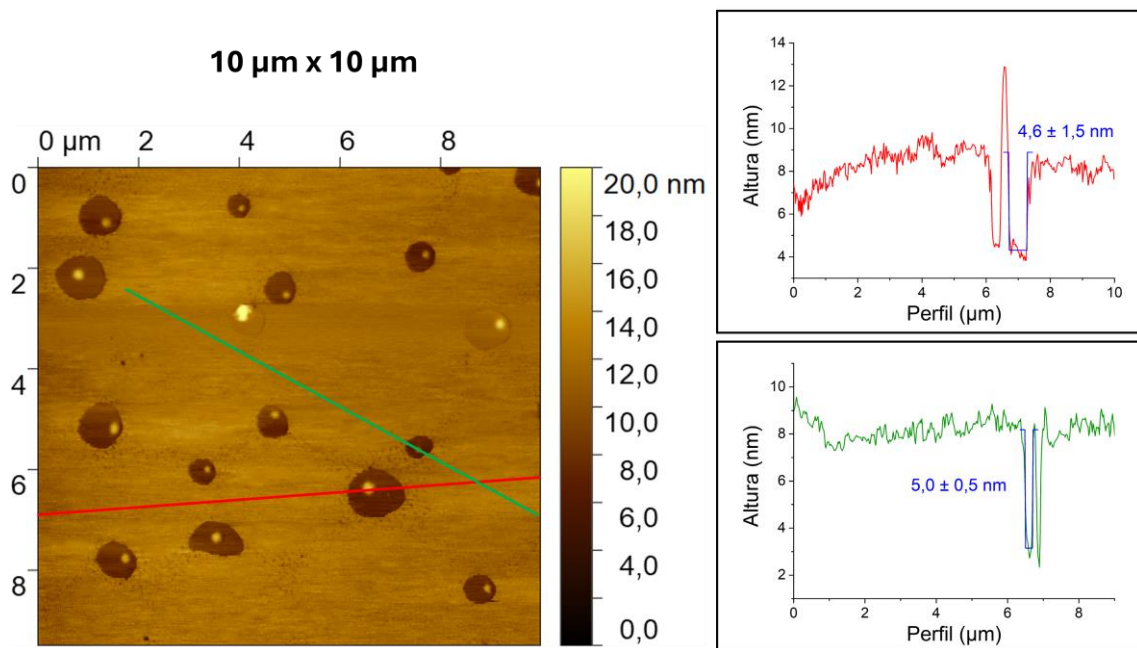


Figura 18. Imágenes de AFM de la película de arctiina transferida a  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , con sus respectivos perfiles marcados con una línea en la imagen. En los perfiles se indica la profundidad de los pozos

## 5. Conclusiones

El objetivo científico de este TFG era realizar estudios sobre la actividad superficial de la arctiina. En primer lugar, se ha confirmado que la arctiina presenta actividad superficial y es capaz de formar monocapas en la interfase aire-agua. Por otro lado, el estudio de la absorbancia UV-Vis de la arctiina en disolución ha descartado la formación de agregados que pudieran dificultar la formación de películas.

Se han estudiado las condiciones experimentales para obtener películas de arctiina por medio de la técnica de Langmuir, encontrando que pueden prepararse monocapas empleando 2 mL de disolución de arctiina  $5 \cdot 10^{-5}$  M. Las isotermas  $\pi$ -A obtenidas son poco reproducibles, lo cual es coherente con el hecho de que la “cola” de la molécula de arctiina no es totalmente apolar y además presenta gran flexibilidad conformacional. También como consecuencia de estos factores, las moléculas de arctiina se organizan formando monocapas en estado fluidizado G-LE. El carácter de LE de las películas ha sido confirmado por el estudio de  $K_s$ , cuyo máximo es de tan sólo  $30 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ .

El estudio del potencial superficial ha permitido distinguir entre dos estados de LE distintos LE (I) y LE (II), relacionados con una distinta orientación de las moléculas de arctiina respecto a la superficie. Se ha observado la coexistencia de estos dos estados en las imágenes de AFM de las películas a distintas presiones. Las películas son considerablemente ordenadas, pues ni en AFM ni en BAM se han observado agregados tridimensionales significativos.

Se ha caracterizado en mayor profundidad la película de arctiina a presión superficial de  $20 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ . En la interfase aire-agua, se ha encontrado que presenta muy buena estabilidad e histéresis casi nula. El estudio por QCM dio un RT muy cercano a 1, indicando que las películas pueden transferirse sobre soportes sólidos, manteniendo el mismo ordenamiento que en la interfase acuosa. Además, estas películas son bastante homogéneas en el rango de  $15$  a  $25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ , lo que es consistente con los valores de  $K_s$  obtenidos. A presiones más altas se aprecian estructuras compatibles con la formación de multicapas y agregados. El estudio del ángulo de contacto entre la película transferida y una gota de agua sugiere que las moléculas de arctiina se anclan al sustrato por medio de la molécula de glucosa, dejando hacia el aire una cola relativamente polar.

En este TFG se ha encontrado que las monocapas de arctiina son considerablemente estables y homogéneas, lo que abre la puerta a futuros estudios que impliquen la incorporación de este compuesto a modelos de membrana celular y la optimización de condiciones para la fabricación de liposomas. Un siguiente paso en la investigación podría ser la preparación y caracterización de películas mezcla de arctiina, fosfolípidos y colesterol.

## Bibliografía

- (1) Gao, Q.; Yang, M.; Zuo, Z. Overview of the Anti-Inflammatory Effects, Pharmacokinetic Properties and Clinical Efficacies of Arctigenin and Arctiin from *Arctium Lappa* L. *Acta Pharmacologica Sinica*. Nature Publishing Group May 1, **2018**, pp 787–801. <https://doi.org/10.1038/aps.2018.32>.
- (2) Jin, X.; Liu, S.; Chen, S.; Wang, L.; Cui, Y.; He, J.; Fang, S.; Li, J.; Chang, Y. A Systematic Review on Botany, Ethnopharmacology, Quality Control, Phytochemistry, Pharmacology and Toxicity of *Arctium Lappa* L. Fruit. *Journal of Ethnopharmacology*. Elsevier Ireland Ltd May 23, **2023**. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.116223>.
- (3) Hayashi, K.; Narutaki, K.; Nagaoka, Y.; Hayashi, T.; Uesato, S. Therapeutic Effect of Arctiin and Arctigenin in Immunocompetent and Immunocompromised Mice Infected with Influenza A Virus. *Biol Pharm Bull* **2010**, 33 (7), 1199–1205. <https://doi.org/10.1248/BPB.33.1199>.
- (4) 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 (8), 1–17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17/FIGURES/14>.
- (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) 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>
- (8) *Arctiin* | *C27H34O11* | *CID 100528* - *PubChem*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Arctiin#section=Isomeric-SMILES> (accessed 2024-06-04).
- (9) Mayerhöfer, T. G.; Pahlow, S.; Popp, J. The Bouguer-Beer-Lambert Law: Shining Light on the Obscure. *ChemPhysChem* **2020**, 21 (18), 2029–2046. <https://doi.org/10.1002/CPHC.202000464>.
- (10) Schwartz, D. K. *Langmuir-Blodgett Film Structure*; 1997; Vol. 27.
- (11) Oliveira, O. N.; Caseli, L.; Ariga, K. The Past and the Future of Langmuir and Langmuir-Blodgett Films. *Chem Rev* **2022**, 122 (6), 6459–6513. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00754>

- (12) Davies, J.; Rideal, E. *Interfacial Phenomena: Spontaneous Emulsification*; 1963.
- (13) Right, H.; Sir, J.; Banks, B. K. B. P. S. IX. On the Laws Which Regulate the Polarisation of Light by Reflexion from Transparent Bodies. By David Brewster, LL. D. F. R. S. Edin. and F. S. A. Edin. In a Letter Addressed to Right Hon. Sir Joseph Banks, Bart. K. B. P. R. S. *Philos Trans R Soc Lond* **1815**, *105*, 125–159. <https://doi.org/10.1098/RSTL.1815.0010>.
- (14) Stine, K. J. Brewster Angle Microscopy. In *Supramolecular Chemistry*; Wiley, **2012**. <https://doi.org/10.1002/9780470661345.smc040>.
- (15) Oliveira, O. N.; Bonardi, C. The Surface Potential of Langmuir Monolayers Revisited. *Langmuir* **1997**, *13* (22), 5920–5924. <https://doi.org/10.1021/LA970272O>.
- (16) Deng, Y.; Wu, Q.; Li, Z.; Huang, X.; Rao, S.; Liang, Y.; Lu, H. Crystal Face Dependent Wettability of  $\alpha$ -Quartz: Elucidation by Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry Techniques Combined with Molecular Dynamics. *J Colloid Interface Sci* **2022**, *607* (Pt 2), 1699–1708. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2021.09.047>.
- (17) Na Songkhla, S.; Nakamoto, T. Overview of Quartz Crystal Microbalance Behavior Analysis and Measurement. *Chemosensors* **2021**, *9*, 350. <https://doi.org/10.3390/chemosensors9120350>
- (18) Kumar, C. S. S. R. (Challa S. S. R. ). *Nanosystem Characterization Tools in the Life Sciences*; Wiley-VCH, 2006.
- (19) Kontomaris, S. V.; Stylianou, A. Atomic Force Microscopy for University Students: Applications in Biomaterials. *Eur J Phys* **2017**, *38* (3). <https://doi.org/10.1088/1361-6404/AA5CD6>.
- (20) Helmholtz, H. Ueber Einige Gesetze Der Vertheilung Elektrischer Ströme in Körperlichen Leitern Mit Anwendung Auf Die Thierisch-Elektrischen Versuche. *Ann Phys* **1853**, *165* (6), 211–233. <https://doi.org/10.1002/ANDP.18531650603>.
- (21) *Angulo de contacto: Definición y equipos de medición*. <https://www.linseis.com/es/propiedades/angulo-de-contacto/> (accessed 2024-04-29).
- (22) Orsini, F.; Cremona, A.; Arosio, P.; Corsetto, P. A.; Montorfano, G.; Lascialfari, A.; Rizzo, A. M. Atomic Force Microscopy Imaging of Lipid Rafts of Human Breast Cancer Cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2012**, *1818* (12), 2943–2949. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2012.07.024>.