



REIAL ACADÈMIA
DE FARMÀCIA
DE CATALUNYA



DISCURS

LLEGIT EN L'ACTE D'INGRÉS DE L'ACADÈMICA CORRESPONENT
IL·LUSTRE SRA. DRA. MONTSERRAT PUJOL CUBELLS
CELEBRAT EL DIA 17 DE JUNY DE 2026

BARCELONA
2026

PRESENTACIÓ A CÀRREC DE L'ACADÈMICA NUMERARIA
EXCEL·LENTÍSSIMA SRA. DRA. M. LLUISA GARCÍA LÓPEZ

**MEMBRANES LIPÍDIQUES MODEL
INTERFÍCIES BIOFÍSQUES PER COMPRENDRE
LA VIDA I L'ACCIÓ FARMACOLÒGICA**

DISCURS

llegit a l'acte d'ingrés de l'Acadèmica Corresponent

Il·lustre Sra. Dra. Montserrat Pujol Cubells

Celebrat el dia 17 de juny de 2026

PRESENTACIÓ

a càrrec de l'Acadèmica Numeraria

Excel·lentíssima Sra. Dra. M. Lluisa García López

Barcelona

2026

*L'Acadèmia no es fa solidària de
les opinions que s'exposen en les publicacions,
de les quals és responsable l'autor.*



Generalitat de Catalunya
Departament de Salut

Amb la col·laboració del Departament
de Salut de la Generalitat de Catalunya

Dipòsit legal: B-11135-2026
GAM DIGITAL

PRESENTACIÓ

a càrrec de l'Acadèmica Numeraria

Excel·lentíssima Sra. Dra. M. Lluisa García López

**Excel·lentíssim Senyor President
de la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya,
Excel·lentíssims i Il·lustres Senyores i Senyors Acadèmics,
Senyores i Senyors,**

Vull agrair la deferència que ha tingut la Junta de la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya, en designar-me per a fer la presentació de la Dra. Montserrat Pujol Cubells, Acadèmica Corresponent electa, en aquest acte solemne i protocol·lari d'ingrés en aquesta docta corporació, que em dona l'oportunitat de posar en relleu la seva brillant trajectòria professional.

La Dra. Pujol va néixer a Corbera d'Ebre a Tarragona l'any 1956, en el si d'una família profundament arrelada a la comarca de la Terra Alta, essent la petita de dos germans. La seva infantesa i els primers anys de formació van transcórrer al poble, on va cursar l'ensenyament primari a l'escola pública Jaume Ferran. Posteriorment, va continuar els estudis a l'Institut Julio Antonio de Móra d'Ebre, on va realitzar el batxillerat i el Curs d'Orientació Universitària per traslladar-se a Barcelona per cursar els estudis universitaris. Es va llicenciar en Farmàcia per la Universitat de Barcelona el 1982, on va obtenir, un any després, el grau de llicenciatura en la modalitat de tesina. El 1986 va obtenir el Certificat d'Aptitud Pedagògica per l'ICE de la Universitat Politècnica de Catalunya i, el 1990, el títol de doctora en Farmàcia. Posteriorment, el 2003, va obtenir el títol de farmacèutica especialista en Anàlisi de Medicaments i Drogues pel Ministeri d'Educació, Cultura i Esport. El seu interès per ampliar l'horitzó del coneixement la va portar a cursar la Llicenciatura en Humanitats i el títol d'Especialista en Estudis de Pensament a la Universitat Oberta de Catalunya (UOC). Aquests estudis, finalitzats el 2011, li han permès desenvolupar habilitats crítiques, analítiques i comunicatives des d'una perspectiva interdisciplinària, les quals ha aplicat amb èxit en la seva

trajectòria acadèmica, tant en la docència i la recerca com en la gestió institucional.

Va iniciar la seva trajectòria científica a la Secció Departamental de Físicoquímica del Departament de Farmàcia, Tecnologia Farmacèutica i Físicoquímica de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació de la Universitat de Barcelona l'any 1983, amb la realització de la tesina de llicenciatura en l'àmbit de l'estabilitat de medicaments. Posteriorment, va continuar aquesta línia de recerca amb la seva tesi doctoral sobre l'estabilitat i l'estudi cinètic dels processos de degradació de l'azlocilina sòdica, la qual va merèixer la qualificació d'excel·lent *cum laude*. Durant el temps que vam coincidir al departament, vaig poder constatar les seves qualitats innates per a la investigació: la perseverança, la creativitat i el rigor intel·lectual. El seu interès per ampliar coneixements la va portar a realitzar, el 1990 i un cop finalitzada la tesi, una estada postdoctoral d'un any al Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), on va aprofundir en el camp dels processos fotoquímics aplicats a l'estabilitat de medicaments.

Posteriorment, la Dra. Pujol sense deixar el seu interès per l'estabilitat de medicaments i va orientar la seva recerca sobre l'interacció de fàrmacs amb models de membrana, camp al que s'ha dedicat al llarg de tres dècades. En aquest temps, ha estat membre del grup de recerca *Virus Entèrics* i principalment del *grup de Pèptids i Proteïnes: Estudis Físicoquímics* al llarg de més de vint anys essent coordinadora entre el 2018 i el 2021, any en que es va incorporar al grup de recerca consolidat *Sistemes Nanoestructurats d'Alliberament Controlat de Fàrmacs*, on duu a terme estudis d'interacció de nanopartícules amb models de membrana. Al llarg de la seva carrera, ha dirigit nombrosos treballs d'investigació repartits entre tesines de llicenciatura, tesis de màster, treballs de recerca i dues tesis doctorals —les quals han merescut la màxima qualificació d'excel·lent *cum laude*—, i actualment col·labora en la co-direcció de dues més. Així mateix, ha participat en trenta projectes de recerca de l'administració pública (dos dels quals com a IP) i en dos projectes no competitius (un com a IP). Els resultats d'aquestes investigacions es recullen en nombrosos articles en revistes científiques de factor d'impacte elevat (la majoria dintre del primer quartil) i cinc capítols de llibre. Ha participat com a ponent o

presentant comunicacions en més de cent congressos científics. En l'àmbit organitzatiu, va exercir de secretària d'organització del *Primer Congrés Internacional d'Educació Superior en Ciències Farmacèutiques* (2004) i del *XV International Symposium on Luminescence Spectrometry* (2012).

Finalment, cal destacar que la tasca d'investigació ha estat sempre compaginada amb l'activitat docent que va començar a exercir l'any 1998, primer com associada substituta, seguidament com a Ajudant d'Universitat (1988-1994) i des del 1994 com a Professora titular. La docència impartida, en el Departament de Farmàcia, Tecnologia Farmacèutica y Fisicoquímica s'ha centrat en les diferents assignatures de llicenciatura i grau de l'àrea de Química Física aplicades a Farmàcia i en diferents programes de doctorat i màster en què ha participat des de l'any 1988 contribuint en tasques de coordinació i el disseny del pla docent de les diferents assignatures. L'interès per la millora i la innovació docent l'ha portat a participar en dos Grups d'innovació docent, essent actualment membre del Grup d'Innovació Docent en Anàlisi Instrumental Farmacèutic, GIDAIFAR i en més de **deu** projectes d'innovació docent, sis dels quals com a IP. Ha col·laborat en publicacions docents i congressos docents i així com en el projecte *Aula de Formació del Professorat de la Facultat de Farmàcia* del que va estar coordinadora (2006-2018) i va ser mereixedor de la *Distinció Jaume Vicens Vives - 2011* a la *Qualitat Universitària*. És editora de la revista d'educació superior en Farmàcia: *Edusfarm* des de la seva creació l'any 2004. Cal esmentar també la seva participació en els tribunals de proves d'accés a la universitat (PAU) per la UB exercint com a presidenta des de el 1997 fins al dia d'avui.

A més de la trajectòria de docència i recerca, el compromís de la Dra. Pujol amb la Universitat la va portar a desenvolupar una intensa tasca de gestió, fonamental per al correcte funcionament i desenvolupament de la institució acadèmica que li ha comportat el reconeixement de tres trams de gestió per la UB. Com a *cap d'estudis de l'ensenyament de Farmàcia*, càrrec que va exercir durant set anys (1997-2004), cal destacar el suport per al desenvolupament de la formació i consolidació del *Pla d'acció tutorial* de l'ensenyament de Farmàcia, del qual encara participa com a tutora en l'actualitat; el treball en el model de reconeixement de centres receptors de l'assignatura Practi-

ques Tutelades del mateix ensenyament, i la contribució al disseny i la implementació de dos plans d'estudis. L'any 2000 va ser nomenada *Membre del Comitè intern d'avaluació de la llicenciatura de Farmàcia*. Des del 2008 fins al 2012 va ser directora del departament de Físicoquímica destacant l'impuls a l'adaptació de la docència del departament a *l'Espai Europeu d'Educació Superior* coordinant el projecte *Adaptació metodològica de les assignatures de Físicoquímica a l'EEES*. Paral·lelament, en el període 2006-2018 va ser *Coordinadora de Formació del professorat de la Facultat de Farmàcia*.

La seva trajectòria personal i professional no es pot entendre sense fer esment de l'entorn familiar que la va sostenir i impulsar des dels primers anys. Els seus pares, fills de la postguerra a la Terra Alta, van créixer en un context especialment dur. Amb treball constant, sacrifici i una confiança profunda en el valor de l'educació, van aconseguir que els seus fills estudiessin, prosperessin i poguessin obrir-se camí. Aquesta herència familiar va ser sens dubte un dels fonaments essencials de la seva vida. En la seva trajectòria s'hi reconeix la força discreta però decisiva d'una família que, des de la senzillesa i l'esforç quotidià, i una profunda cultura del treball, va saber transformar les dificultats en futur pròsper.

En aquesta breu presentació de la trajectòria professional de la Dra. Pujol, ha quedat palès que té mèrits més que suficients per ser admesa com a acadèmica corresponent d'aquesta Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya i tinc la seguretat que sabrà correspondre a l'honor que li atorga l'Acadèmia, enriquint-la amb la seva experiència científica i professional i amb el seu saber-fer. És per això que, una vegada hagi llegit el discurs reglamentari, demano al Excm. Sr. President que tingui a bé d'imposar a la Dra. Montserrat Pujol la medalla i l'estola així com, de lliurar-li el títol acreditatiu d'acadèmica corresponent d'aquesta corporació.

Moltes gràcies

**MEMBRANES LIPÍDIQUES MODEL
INTERFÍCIES BIOFÍSQUES PER COMPRENDRE
LA VIDA I L'ACCIÓ FARMACOLÒGICA**

**Excel·lentíssim Senyor President
de la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya,
Excel·lentíssims i Il·lustres Senyores i Senyors Acadèmics,
Distingides autoritats acadèmiques i professionals,
Estimats familiars, amics i companys,
Senyores i Senyors,**

Preàmbul

Abans d'endinsar-me en el contingut d'aquest discurs d'ingrés, voldria expressar el meu agraïment més sincer a la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya per haver acceptat la meua candidatura com a acadèmica corresponent, i molt particularment als il·lustres acadèmics que la van recolzar i van tenir la generositat de proposar-la: la Dra. M. Luisa Garcia López, el Dr. Oriol Valls Planells i la Dra. Elena Sánchez López. La seva confiança m'honora profundament i és, per a mi, motiu de gratitud i també de responsabilitat. És, alhora, un veritable orgull poder formar part d'aquesta prestigiosa institució, i confio saber correspondre dignament a les responsabilitats que aquest nomenament comporta.

Aquest moment em porta també a recordar totes aquelles persones que, d'una manera o altra, han deixat empremta en la meua trajectòria personal, acadèmica i professional: mestres i col·legues, companys i companyes de feina, autoritats acadèmiques i institucionals, amics, i tantes altres persones amb qui he compartit etapes, aprenentatges, responsabilitats i afectes. Són moltes, i no m'atreviria a fer-ne una relació de noms, tant pel risc d'un oblit involuntari com perquè seria una enumeració massa llarga.

Permeteu-me, tanmateix, un reconeixement especial als companys i companyes de la Secció de Fisicoquímica de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona, amb qui he compartit tants anys de treball, de docència, de recerca i de responsabilitats institucionals. En

la vida universitària, feta d'exigència, compromís i dedicació sostinguda, he trobat al seu costat no sols col·laboració i professionalitat, sinó també companyonia i suport.

No puc deixar d'esmentar tampoc els amics, que ocupen un lloc molt especial en aquest agraïment. Han estat fonamentals en la meua vida, pel suport que m'han donat en l'àmbit personal i per la fidelitat d'uns vincles que, en alguns casos, s'estenen des de la infantesa a Corbera d'Ebre, el meu poble; des dels anys d'universitat que ja en fa gairebé cinquanta, o bé són més recents, però no menys importants. Voldria que tots ells se sentissin avui presents en aquestes paraules, dites amb gratitud profunda i amb una gran estimació.

I, d'una manera molt especial, voldria adreçar aquest agraïment a la meua família. El meu pensament va avui, de manera singular, als meus pares, pels valors que m'han transmès, pel seu suport constant i per haver estat el meu punt de referència més ferm; al meu germà, per haver estat sempre present, amb suport incondicional, i per haver fet possible el vincle profund que ens uneix; i al meu company de vida, pel seu acompanyament, per la seva estimació i per la serenor, la paciència i la generositat amb què ha compartit el camí que m'ha dut fins aquí. I, en aquest record, hi vull incloure també, als meus nebots Joan i Francesc per ser-hi sempre i ben sincerament, a la resta de la meua família, que ha format part, cadascú a la seva manera, del teixit d'afectes i de complicitats que sosté una vida.

A tots ells, i a totes les persones que m'han ajudat a créixer al llarg dels anys, els dec molt més del que les paraules poden expressar. Arribo avui a aquest moment amb la consciència plena que cap reconeixement no és mai només individual, perquè en allò que som hi habiten també els exemples rebuts, els estímuls trobats en el camí, les complicitats viscudes i els afectes que ens sostenen. Així, en tota trajectòria hi ressonen, d'una manera o altra, moltes presències estimades. A totes elles, el meu agraïment més profund.

La trajectòria que m'ha portat avui aquí es va iniciar en l'àmbit de la Farmàcia, amb els estudis de llicenciatura i doctorat a la Universitat de Barcelona, i es va anar enriquint amb altres camins formatius que han ampliat la meua mirada, com l'especialització en Estudis de

Pensament i la llicenciatura en Humanitats. Aquesta doble fidelitat, a l'exigència rigorosa de la ciència i al desig de comprendre més àmpliament la condició humana, m'ha dut a veure en la membrana no sols un objecte d'estudi privilegiat, sinó també un espai de significació, una estructura que separa i relaciona, que protegeix i comunica, que delimita i fa possible l'intercanvi.

La meva activitat docent, desenvolupada durant dècades a la Universitat de Barcelona, principalment en l'àmbit de la fisicoquímica aplicada a la Farmàcia, m'ha permès transmetre a moltes generacions d'estudiants una convicció profunda, que alguns dels fenòmens més decisius de la vida tenen lloc, precisament, a les interfícies. En les assignatures impartides principalment de *Fisicoquímica* també *Biomembranes*, i *Estabilitat de Medicaments*, he intentat mostrar que la Farmàcia no pot limitar-se a descriure substàncies o formulacions, sinó que ha d'entendre també els processos, les interaccions i els equilibris que en determinen el comportament. La docència, en aquest sentit, ha estat per a mi una manera d'ordenar el pensament, d'aprofundir en les preguntes essencials i de compartir una determinada passió pel coneixement.

Però ha estat sobretot la recerca la que m'ha anat portant, amb una coherència que avui puc reconèixer amb més nitidesa, cap al nucli mateix del tema que he escollit. Des dels primers estudis sobre estabilitat i degradació de medicaments, passant pels treballs sobre citostàtics, pèptids, liposomes i monocapes, fins als estudis sobre biointerfícies, dominis lipídics i interacció de nanopartícules amb membranes model, el fil conductor ha estat sempre el mateix: comprendre com les propietats fisicoquímiques de les molècules i de les estructures supramoleculares condicionen la seva activitat biològica i farmacològica. Les membranes s'han anat revelant, així, com un escenari central on es decideixen processos de reconeixement, fusió, permeació, estabilitat, toxicitat i eficàcia.

També la meva dedicació a la gestió universitària i a la innovació docent ha contribuït a consolidar aquesta mirada. Les responsabilitats assumides al llarg dels anys, en la Direcció d'Estudis de l'ensenyament de Farmàcia, en la Direcció del Departament, en la coordinació de projectes docents i en iniciatives de formació del professorat,

m'han fet encara més conscient que el coneixement només adquireix tot el seu sentit quan és compartit, estructurat i posat al servei d'una comunitat.

Al llarg dels anys, he anat comprenent que hi ha alguns temes que no s'escullen només per interès científic, sinó perquè, d'una manera gairebé silenciosa però persistent, ens acompanyen, ens interpel·len i acaben esdevenint una part essencial de la nostra manera de mirar i d'entendre la realitat. Per a mi, aquest és el cas de les membranes lipídiques. He volgut dedicar aquest discurs a les *membranes lipídiques model: interfícies biofísiques per a comprendre l'acció farmacològica i la vida* perquè en aquest tema hi convergeixen, d'una manera especialment clara, la meva formació, la meva activitat docent, la meva recerca i també una determinada concepció de la Farmàcia com a ciència de frontera, situada sempre entre la matèria i la funció, entre la molècula i l'efecte, entre l'estructura i la vida.

He triat, doncs, aquest tema perquè resumeix fidelment una part molt significativa de la meua vida acadèmica. Les membranes lipídiques representen, per a mi, una realitat científica d'una gran bellesa i d'una enorme fecunditat explicativa: són estructures materials i, alhora, espais de relació; són límit i obertura; són condició de la vida i lloc privilegiat de l'acció farmacològica. En elles hi he trobat una manera d'unir els meus interessos per la fisicoquímica, per la biofísica, per la formulació farmacèutica i per la comprensió de la vida com a fenomen organitzat, dinàmic i profundament relacional. Per això aquest discurs no respon només a una tria temàtica, sinó a una convicció intel·lectual madurada al llarg dels anys: **comprendre les membranes és, en una certa manera, comprendre millor la vida i comprendre millor també com els fàrmacs poden intervenir-hi.**

Índex

| | |
|---|----|
| 1. Introducció | 17 |
| 2. Fonaments fisicoquímics de l'organització de les membranes ..21 | |
| 2.1 Composició, estructura i funció de les membranes cel·lulars | 21 |
| 2.1.1. Lípids de membrana..... | 28 |
| 2.1.1.1. Organització estructural dels lípids en medi aquós | 29 |
| 2.1.1.2. Segregació lipídica: diagrames de fases..... | 30 |
| 2.1.1.3. Forma estructural i relació amb la fase lipídica | 31 |
| 2.1.1.4. Organització lipídica a la membrana..... | 34 |
| 2.2. Propietats de la bicapa lipídica | 37 |
| 2.2.1. Permeabilitat | 37 |
| 2.2.2. Fluidesa | 38 |
| 2.2.3. Heterogeneïtat | 38 |
| 2.2.4. Asimetria | 39 |
| 2.2.5. Càrrega elèctrica | 39 |
| 2.2.6. Curvatura..... | 41 |
| 2.3. Processos biofísics a la membrana | 42 |
| 2.3.1. Fusió de membranes | 43 |
| 2.3.2. Difusió transversal de lípids | 49 |
| 2.3.3. Difusió lateral dels lípids: formació de dominis | 54 |
| 3. Models de membrana lipídica com a eines de coneixement ...57 | |
| 3.1. Antecedents històrics i necessitat de models | 57 |
| 3.2. Tipus de membranes model | 59 |
| 3.2.1. Monocapes lipídiques i micel·les..... | 61 |
| 3.2.2. Bicapes lipídiques | 67 |
| 3.2.2.1. Vesícules lipídiques | 67 |
| 3.2.2.2. Bicapes lipídiques suportades(SLBs) | 72 |
| 3.2.2.3. Nanodiscs | 76 |
| 3.2.3. Models de membrana “ <i>in sílico</i> ” | 77 |
| 4. Tècniques biofísiques d'anàlisi | 79 |
| 4.1. Microscòpia de força atòmica (AFM) | 79 |
| 4.2. Tècniques de fluorescència | 80 |

| | |
|--|------------|
| 4.3. Calorimetria diferencial d'escombratge (DSC)..... | 80 |
| 4.4. Ressonància magnètica nuclear (RMN) i ressonància paramagnètica electrònica (EPR) | 81 |
| 4.5. Altres tècniques complementàries | 81 |
| 5. La membrana com a diana biofísica: aplicacions a la recerca farmacèutica | 83 |
| 5.1. Interacció de molècules amb activitat farmacològica | 83 |
| 5.1.1. Bases fisicoquímiques de la interacció | 83 |
| 5.1.2. Significança farmacèutica | 87 |
| 5.1.3. Desenvolupament de fàrmacs i avaluació de la toxicitat | 90 |
| 6. Aportació de la recerca desenvolupada | 93 |
| 6.1. Interacció pèptid-lípid | 93 |
| 6.1.1. Interacció de seqüències VP3 del virus de l'hepatitis A amb membranes model | 93 |
| 6.1.2. Modulació de la fusió viral: estudis amb pèptids potencials inhibidors del pèptid de fusió de virus de la immunodeficiència humana (HIV)..... | 96 |
| 6.1.3. Interacció d'antibiòtics amb membranes model | 103 |
| 6.1.4. Interacció de nanopartícules amb membranes model .. | 107 |
| 6.1.4.1. Nanopartícules polimèriques per a la inflamció ocular | 107 |
| 6.1.4.2. Nanopartícules lipídiques per a malalties cutànies hiperproliferatives | 111 |
| 7. De la interfície biofísica a la metàfora de la vida | 115 |
| 8. Referències | 121 |

1. INTRODUCCIÓ

La comprensió profunda dels mecanismes moleculars que regeixen les interaccions entre els fàrmacs i les membranes biològiques constitueix, sens dubte, un dels pilars fonamentals sobre els quals descansa la ciència farmacèutica contemporània. En efecte, cap molècula terapèutica pot desplegar plenament la seva acció sense, d'una manera o d'una altra, establir contacte amb les estructures lipídiques que delimiten, protegeixen i organitzen les cèl·lules. Aquest principi, aparentment intuïtiu, adquireix una magnitud i una complexitat extraordinàries quan és examinat en tota la seva dimensió biofísica, estructural i funcional.

La membrana biològica, en la seva doble condició de frontera i plataforma d'activitat, pot esdevenir, per a nombrosos fàrmacs, la seva diana principal. Per a d'altres molècules, representa la porta d'accés cap a l'espai intracel·lular, on es despleguen les rutes metabòliques i les maquinàries moleculars que cal modular amb precisió terapèutica. En tots dos casos, la bicapa lipídica i les proteïnes que n'articulen l'arquitectura assumeixen un paper decisiu, garantint no només la coherència estructural, sinó també la regulació fina i necessària per al manteniment de la vida cel·lular. La capacitat dels fàrmacs per alterar subtilment o de vegades de manera notable, la curvatura, la fluïdesa o l'organització d'aquest entramat lipídic, evidencia fins a quin punt la membrana pot convertir-se en un autèntic modulador terapèutic, capaç d'influir en processos tan essencials com la senyalització cel·lular, l'expressió gènica o la resposta adaptativa de la cèl·lula.

Ara bé, les interaccions entre fàrmacs i membranes no es limiten a la simple penetració o unió molecular. La seva influència s'estén a propietats com la viscositat local, la mobilitat dels lípids, la càrrega superficial o l'ordre estructural de la bicapa, i totes aquestes variables poden modificar, de manera profunda, la permeabilitat de la membrana i l'activitat de les seves proteïnes. Les repercussions d'aquests canvis afecten directament la fisiologia cel·lular i, per tant, el conjunt de processos que sostenen la seva funció. L'estudi acurat d'aquestes interaccions esdevé, per això, molt més que un exercici teòric: és una eina indispensable per al disseny racional de nous medicaments, per a la comprensió de la seva farmacocinètica i, finalment, per a l'anticipació i prevenció dels seus efectes adversos.

No obstant això, les membranes biològiques, extraordinàriament riques en diversitat composicional i dinàmiques en la seva organització, presenten una complexitat que sovint dificulta l'anàlisi experimental directa. Davant d'aquest repte, la comunitat científica ha impulsat el desenvolupament de models lipídics simplificats que reproduïxen, amb fidelitat selectiva, les propietats fonamentals de les membranes cel·lulars.

La literatura científica recent mostra amb claredat com aquests models *in vitro* permeten examinar aspectes essencials de la interacció fàrmac-membrana com la lipofilicitat, la permeabilitat, la toxicitat, els mecanismes de transport i l'activitat farmacològica. Mitjançant tècniques biofísiques cada vegada més precises i sofisticades, les membranes model s'han convertit en una finestra privilegiada que ens permet desxifrar la relació íntima entre estructura molecular i resposta biològica, i que obre noves vies per entendre fenòmens que, fins fa unes dècades, eren difícilment accessibles.

És per això que, en el marc d'aquest discurs, voldria, en primer lloc, recuperar i reivindicar la importància de la membrana biològica com a entitat central en la fisiologia cel·lular. En faré un breu recordatori de la seva composició, organització i funció, tot destacant el paper que els lípids, massa sovint considerats secundaris davant de les proteïnes, exerceixen en la regulació estructural i funcional de la cèl·lula. A continuació, aprofundiré en els processos biofísics que tenen lloc en aquesta interfase dinàmica i que condicionen la interacció amb els fàrmacs.

Seguidament, em centraré en els principals models de membrana disponibles i en la necessitat de seleccionar amb rigor les metodologies que millor s'adeqüin a les propietats que es desitgi analitzar. Només a partir d'aquesta tria fonamentada podem avançar amb solidesa en la comprensió d'un camp que, n'estic convençuda, continuarà essent decisiu en el futur del desenvolupament farmacèutic i de la terapèutica de precisió.

És en aquest diàleg constant entre la complexitat biològica i l'elegància de la simplificació experimental on la farmàcia científica troba una de les seves vocacions més nobles: la de transformar

el coneixement en salut. Transformar-lo en benestar, en qualitat de vida, en esperança fonamentada en l'evidència.

Finalment, permeteu-me avançar que el concepte de membrana no s'esgota en la seva definició bioquímica o en la seva funció cel·lular. La membrana pot i potser ha de ser també entesa des d'una perspectiva humanística, com a metàfora de límits que protegeixen però que també comuniquen; de fronteres que delimiten però que, alhora, fan possible l'intercanvi; d'espais on el contacte transforma. És per això que per acabar el discurs m'agradara compartir una reflexió sobre la **membrana metafòrica**, una idea que, en el seu simbolisme, ens interpel·la com a científics però també com a persones.

2. FONAMENTS FISICOQUÍMICS DE L'ORGANITZACIÓ DE LES MEMBRANES

2.1. Composició, estructura i funció de les membranes cel·lulars

Les membranes biològiques constitueixen estructures essencials i omnipresents en tots els éssers vius, ja que delimiten tant les cèl·lules com els orgànuls intracel·lulars, mitocòndries, cloroplasts, nucli, lisosomes o aparell de Golgi, i fan possible l'organització compartimentada pròpia de la vida cel·lular [1]. Aquesta compartimentació permet la creació de microambients químics diferenciats indispensables per al desenvolupament coordinat dels processos metabòlics, establint així el principi funcional que sosté l'arquitectura cel·lular [2–3]. La membrana plasmàtica separa el medi intracel·lular del medi extracel·lular i manté gradients específics d'ions, proteïnes i altres soluts, mentre que les membranes dels orgànuls asseguren condicions fisicoquímiques distintes entre el citosol i els seus compartiments interns, garantint el funcionament especialitzat de cada estructura.

Lluny de ser estructures homogènies, les membranes presenten una organització lateral heterogènia amb microdominis especialitzats. Entre aquests destaquen els lipid rafts, dominis enriquits en colesterol i esfingolípid que presenten una organització més compacta i menys fluida que la resta de la bicapa lipídica [4–5]. Aquests dominis actuen com a plataformes funcionals implicades en processos essencials com la transducció de senyals, el trànsit vesicular i l'adhesió cel·lular [6].

La funció de compartimentació i regulació selectiva és conseqüència directa de la naturalesa dels lípids de membrana, que constitueixen un dels seus components principals. Aquests lípids són molècules amfifíliques, caracteritzades per la presència d'una regió polar hidrofílica i una regió apolar hidrofòbica.

El terme lípid engloba un conjunt heterogeni de substàncies definides per la seva solubilitat en dissolvents orgànics no polars i formades principalment per carboni, hidrogen i oxigen, tot i que poden contenir fòsfor, nitrogen o sofre. Entre els lípids biològicament més rellevants

destaquen els greixos, els fosfolípids i els esteroides.

Els greixos o triacilglicèrids resulten de l'esterificació del glicerol amb àcids grassos (Figura 2-1), els quals poden ser saturats o insaturats (Figura 2-2). La presència d'insaturacions, especialment en configuració *cis*, introdueix flexions en la cadena hidrocarbonada que modulen les propietats físiques dels lípids. La combinació de diferents àcids grassos genera una gran diversitat estructural i funcional.

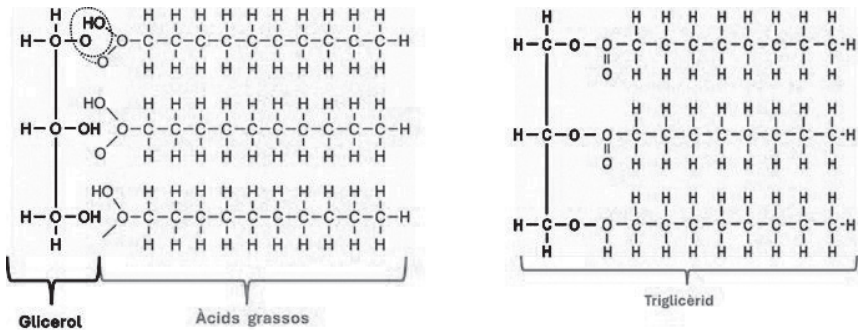


Figura 2-1. L'esterificació d'una molècula de glicerol amb tres d'àcids grassos formen una molècula de triglicèrid.

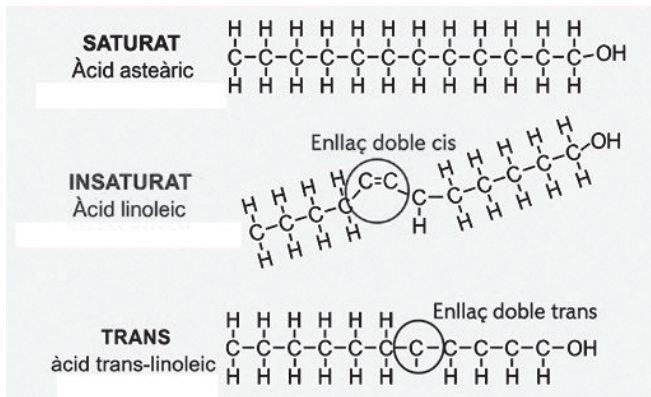


Figura 2-2. Exemples d'àcids grassos saturats i insaturats.

Els fosfolípids constitueixen els principals elements estructurals de les membranes. Deriven del glicerol esterificat amb dos àcids grassos en les posicions sn-1 i sn-2 i amb un grup fosfat en la posició sn-3, que constitueix l'àcid fosfatídic, el qual pot unir-se a diferents radicals polars (Figura 2-3).

Aquesta estructura confereix a la molècula un caràcter amfipàtic que en medi aquós afavoreix l'autoorganització espontània en bicapes, amb les cues hidrofòbiques orientades cap a l'interior i els caps polars en contacte amb l'aigua.

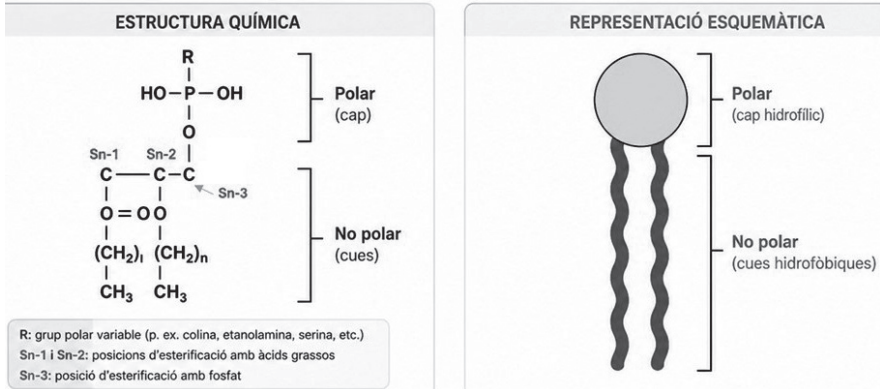


Figura 2-3. Estructura química i representació esquemàtica d'un fosfolípid tipus glicero-fosfolípid, amb un cap polar hidrofílic unit a un esquelet de glicerol (posició sn-3) i dues cadenes hidrofòbiques d'àcids grassos esterificades (posicions sn-1 i sn-2). L'esquema il·lustra el caràcter amfipàtic de la molècula i la seva base estructural per a la formació de bicapes lipídiques. Elaboració pròpia, generada per IA, a partir de recursos docents en Físicoquímica.

Segons el substituent del grup fosfat es generen diferents fosfolípids, com la fosfatidilserina, la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilcolina o la fosfatidilinositol, aquesta última implicada en processos de senyalització cel·lular.

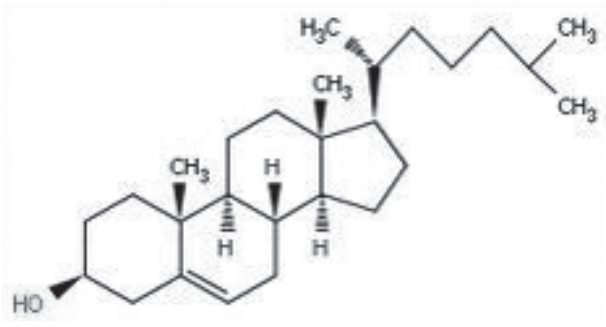


Figura 2-4. Molècula de colesterol

Els esteroides constitueixen un altre component essencial de les membranes. El colesterol (Figura 2-4), amb un esquelet tetracíclic

característic, pot representar fins al 30% dels lípids de la membrana plasmàtica. El seu grup hidroxil s'orienta cap a la interfície aquosa, mentre que l'estructura hidrofòbica s'insereix en la bicapa, modulant la fluïdesa, l'estabilitat i la permeabilitat de la membrana.

Altres lípids presents en menor proporció, però funcionalment rellevants, inclouen els glicolípids i els esfingolípids (Figura 2-5). Aquests darrers deriven de l'esfingosina i, mitjançant l'amidació amb un àcid gras, formen ceramides, que constitueixen la base estructural dels esfingofosfolípids i dels esfingoglicolípids. Els glicolípids, que incorporen residus glucídics, presenten una elevada polaritat i participen en processos de reconeixement cel·lular.

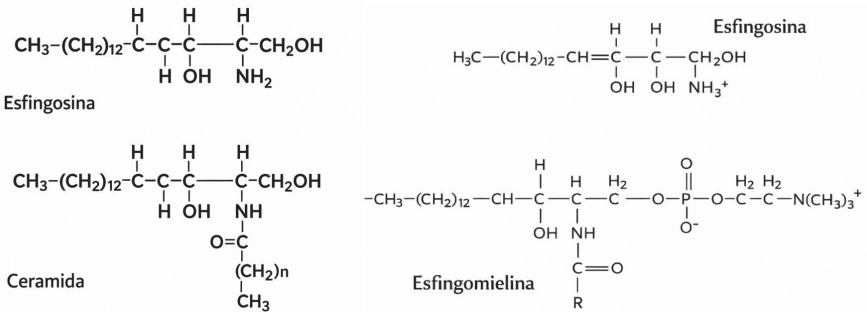


Figura 2-5. Formació de la ceramida i l'esfingomielina a partir de l'esfingosina

En medi aquós, els lípids de membrana s'organitzen principalment en bicapes (Figura 2-6), amb les regions hidrofòbiques orientades cap al centre i les regions polars en contacte amb el medi aquós.

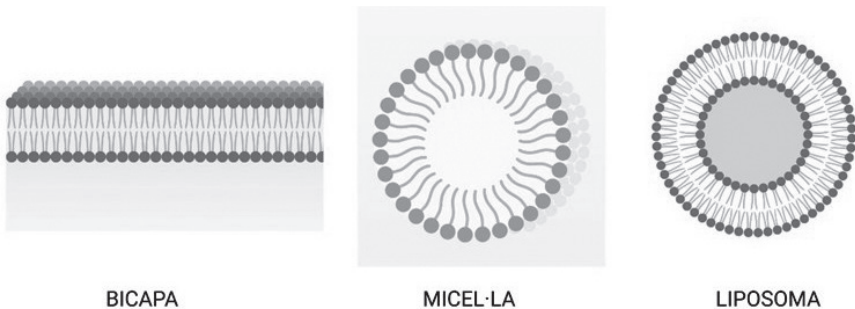


Figura 2-6. Estructura esquemàtica de l'autoensamblatge de fosfolípids en micel·les, liposomes i bicapes planes. El cap polar i les cues no polars determinen l'organització amfíflica i la forma d'aquestes estructures. Created in BioRender. (2026) <https://BioRender.com/zj1nckk>.

Aquesta estructura pot tancar-se sobre si mateixa formant vesícules, configuració característica de les membranes biològiques. La continuïtat de la bicapa impedeix el pas lliure de macromolècules i bloqueja pràcticament la difusió d'ions inorgànics i de soluts polars, mentre que molècules hidrofòbiques poden difondre-hi amb relativa facilitat.

Tanmateix, la compartimentació no implica aïllament funcional. La supervivència cel·lular exigeix intercanvis continus de matèria, energia i informació a través de la membrana, processos que són possibles gràcies a les proteïnes de membrana, el segon gran component estructural. Aquestes proteïnes presenten una gran diversitat estructural i funcional i poden classificar-se en integrals, perifèriques o ancorades a lípids.

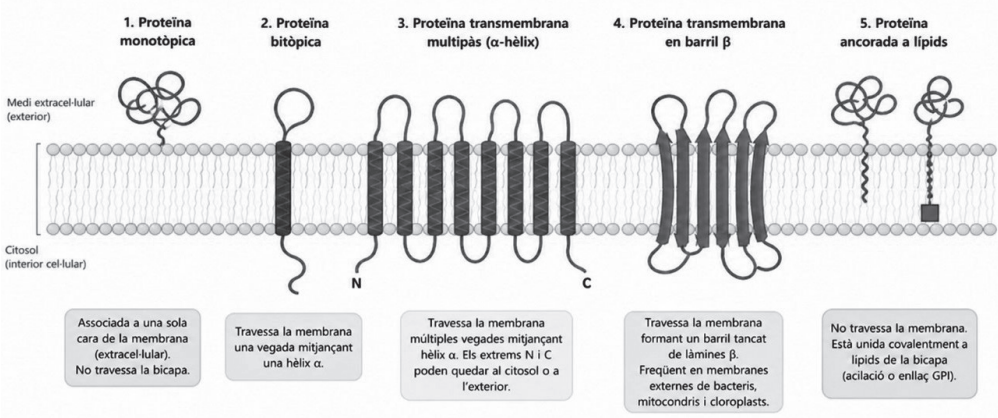


Figura 2-7. Tipus de proteïnes de membrana segons la seva topologia: monotòpiques (cara extracel·lular), bitòpiques, multipàs (α -hèlix), barril β i ancorades a lípids. Elaboració pròpia generada per IA, a partir de la classificació clàssica descrita en Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 6a ed. New York: Garland Science; 2015 [29]

Les proteïnes integrals s'insereixen de manera permanent en la bicapa i poden ser monotòpiques, bitòpiques o politòpiques segons la seva topologia. Les proteïnes perifèriques s'associen de forma reversible a la superfície de la membrana mitjançant interaccions electrostàtiques o ponts d'hidrogen, mentre que les proteïnes ancorades a lípids s'uneixen covalentment a molècules lipídiques, fet que els confereix estabilitat i flexibilitat funcional. Aquestes proteïnes són essencials per al transport de soluts, la transducció de senyals, la comunicació intercel·lular i l'organització de microdominis lipídics (Figura 2-7).

Els carbohidrats de membrana es localitzen principalment a la cara externa de la membrana plasmàtica, units a lípids (glicolípid) o a proteïnes (glicoproteïnes i proteoglicans). Desenvolupen funcions essencials en el reconeixement cel·lular, la protecció de la superfície cel·lular i la resposta immunitària, actuant com a marcadors específics que permeten la identificació i comunicació entre cèl·lules.

Els lipid rafts (Figura 2-8) constitueixen microdominis dinàmics rics en colesterol i esfingolípid [7] que presenten un estat físic líquid-ordenat (Lo), combinant mobilitat lateral amb elevada compactació molecular [5]. Poden agrupar-se formant plataformes funcionals implicades en la transducció de senyals, l'adhesió i la motilitat cel·lular, així com en processos d'endocitosi i exocitosi [6, 8]. El seu enriquiment lipídic i la incorporació selectiva de proteïnes modulen interaccions moleculars determinants per a la funcionalitat de la membrana.

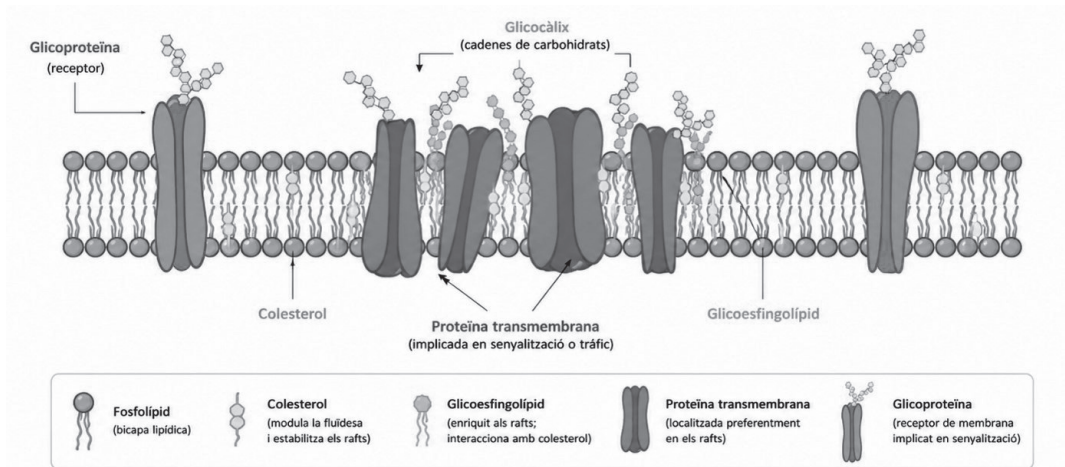


Figura 2-8. Organització lateral de la membrana plasmàtica amb microdominis (rafts lipídics) enriquets en colesterol i glicoesfingolípid, que afavoreixen l'agrupament selectiu de proteïnes transmembrana implicades en senyalització, tràfic vesicular i reconeixement cel·lular. Elaboració pròpia, generada per IA, a partir de Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 1997; **387**:569–72 [4]; Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*. 2010;327(5961):46–50 [5].

El model del mosaic fluid (Figura 2-9) proposat per Singer i Nicolson [2] descriu la membrana com una estructura dinàmica formada per una bicapa lipídica en la qual les proteïnes s'insereixen amb mobilitat lateral. Posteriorment, la identificació dels lipid rafts ha refinat

aquest model, posant de manifest la complexitat lateral i funcional de la membrana. A més, les membranes presenten asimetria composicional entre les seves cares interna i externa, característica essencial per al seu funcionament.

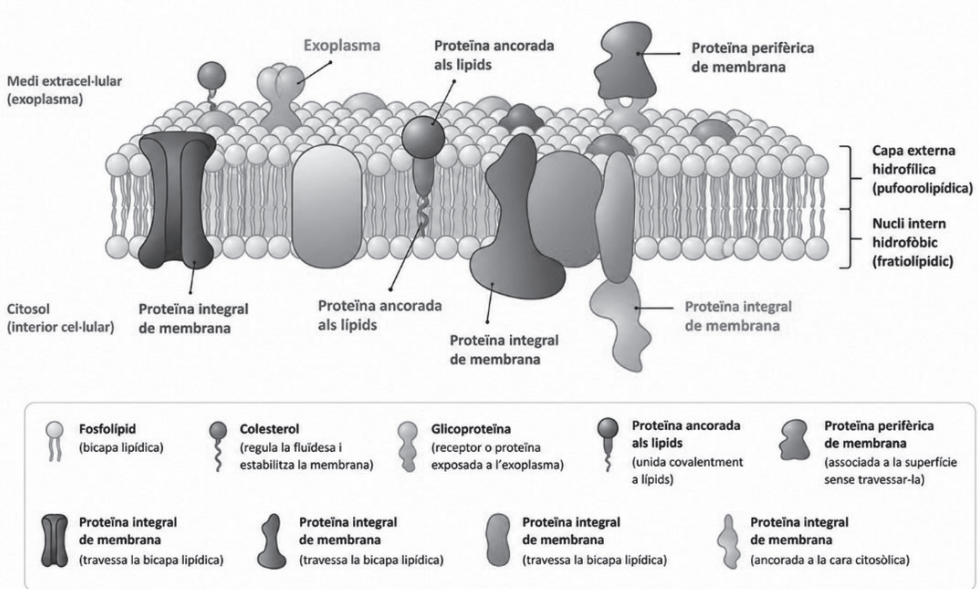


Figura 2-9. Components de la membrana plasmàtica: bicapa lipídica formada per fosfolípids (caps hidrofílics i nucli hidrofòbic), colesterol i diferents tipus de proteïnes (integrals, perifèriques i ancorades a lípids), així com glicoproteïnes orientades cap a l'exoplasma. L'esquema il·lustra l'organització estructural i l'asimetria de la membrana. Elaboració pròpia, generada per IA, a partir d'Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson AD, Lewis J, Raff M, et al. *Essential Cell Biology*. 4a ed. New York: Garland Science; 2015 [1].

En les cèl·lules i òrgans diferenciem la part interna i la part externa de les membranes que no són iguals, la membrana és asimètrica. Així doncs trobarem composició diferent en el exterior i l'interior de la bicapa. A la Figura 2-10 s'observa les diferents fases de la membrana cel·lular, es diferencien les fases internes amb la superfície orientada cap a l'interior del compartiment i les externes orientada a l'exterior.

En conjunt, les membranes no només defineixen compartiments estructurals, sinó que determinen la naturalesa de la comunicació entre l'interior i l'exterior cel·lular. Aquesta comunicació pot adoptar la forma de transport selectiu d'ions i molècules o bé de transmissió

d'informació mitjançant canvis conformationals en els components membranosos. Així, la membrana emergeix com una estructura dinàmica i funcional que integra compartimentació, comunicació i adaptació, fonaments indispensables per a la vida cel·lular.

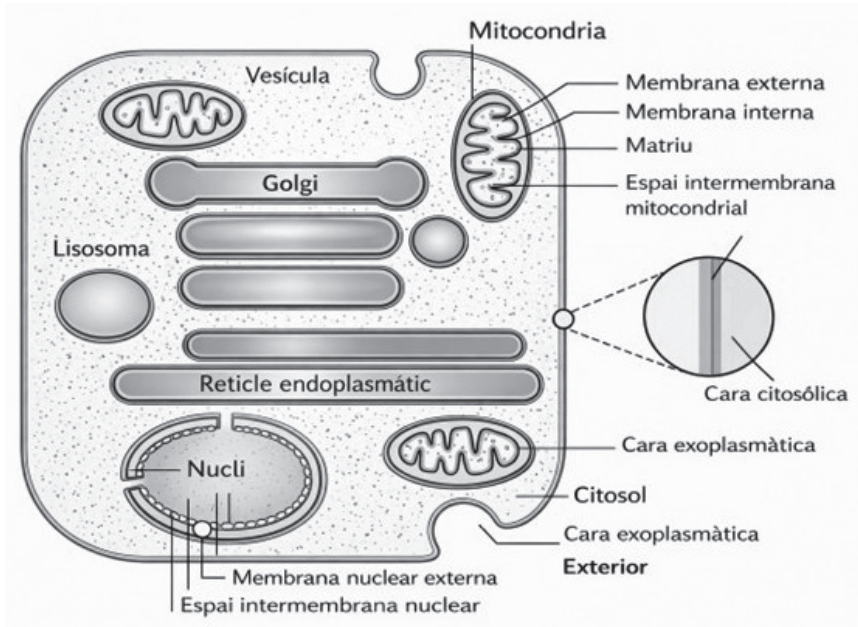


Figura 2-10 esquema de les fases de la membrana cel·lular

1. Fases internes – superfície orientada a l'interior del compartiment
2. Fases externes – amb la superfície cap a l'exterior Citosol (intern) Nucli, mitocondries i cloroplasts estan envoltats per dues membranes separades per un espai intermembrani. Adaptat per IA a partir de recursos educatius de biologia cel·lular.

2.1.1. Lípids de membrana

La bicapa és la forma d'organització preferent dels lípids e la membrana, amb les parts polars orientades cap als compartiments aquosos i les regions hidrofòbiques disposades a l'interior. Aquest model estructural es correspon perfectament amb el model del mosaic fluid descrit per Singer i Nicholson [2] i mencionat anteriorment.

Cal destacar que un model científic no pretén reproduir completament la complexitat d'una membrana biològica, sinó representar-ne propietats fonamentals i permetre l'estudi del comportament davant

de perturbacions [9]. En aquest sentit, el model del mosaic fluid explica adequadament la permeabilitat selectiva de la membrana i la seva funció de compartimentació cel·lular [2]. Tanmateix, diversos processos biològics, com l'endocitosi, l'exocitosi o la fusió de membranes, no poden justificar-se exclusivament amb una organització en bicapa lipídica. La transició de dues bicapas (abans de la fusió) a una sola (després de la fusió) implica l'existència transitòria de configuracions que es desvia de bicapa lipídica [10]. Aquest fenomen evidencia el polimorfisme lipídic, és a dir, la capacitat dels lípids per adoptar múltiples organitzacions segons les condicions físiques i químiques del medi [11].

2.1.1.1. Organització estructural dels lípids en medi aquós

Quan els lípids es resuspenen en aigua a concentracions elevades (aproximadament 1:1 lípid/aigua), poden autoorganitzar-se espontàniament en diferents fases segons la seva naturalesa química, la temperatura, el pH o la concentració [12]. Per caracteritzar aquestes organitzacions, s'empren tècniques com la difracció de raigs X, l'RMN de ^{31}P o la microscòpia de criofractura [10].

Sedon & Templer van concloure que les principals organitzacions observades són Fase lamel·lar (L_{α}): dues monocapes paral·leles i equidistants. Fase hexagonal (H_I): cilindres amb caps polars orientats cap a l'exterior i Fase hexagonal inversa (H_{II}): cilindres invertits amb les regions polars a l'interior [11, 13].

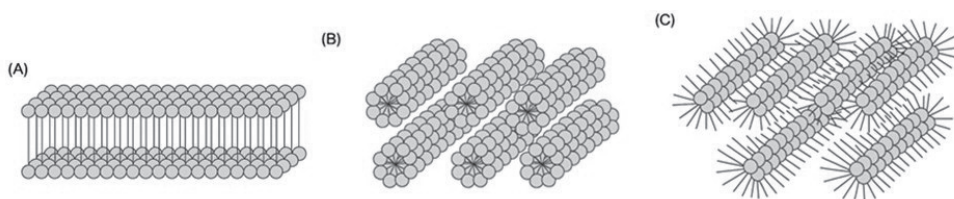


Figura 2-11. Fases lipídiques en sistemes lípid-aigua (polimorfisme lipídic). (A) Fase lamel·lar (L_{α}), amb organització en bicapa; (B) fase hexagonal de tipus I (H_I), amb agregats tubulars i els caps polars orientats cap a l'exterior; i (C) fase hexagonal inversa (H_{II}), amb canals aquosos interns i els caps polars orientats cap a l'interior. Esquema basat en [11-13].

La figura 2-11 mostra un esquema de les diferents fases organitzatives dels lípids: (A) Fase lamel·lar (L_{α}). Constituïda per dues monocapes lipídiques paral·leles i equidistants. Les regions polars dels lípids s'orienten cap al medi aquós, mentre que les cadenes hidrofòbiques queden disposades a l'interior de la bicapa. Es tracta de l'organització bàsica i més estable dels fosfolípids en condicions fisiològiques; [2, 12] (B) Fase hexagonal de tipus I (H_I). En aquesta organització, els lípids formen estructures cilíndriques llargues, orientades perpendicularment al pla de la figura. Els caps polars s'ubiquen a l'exterior del cilindre, en contacte amb l'aigua, mentre que les cadenes hidrofòbiques es troben a l'interior. Aquestes estructures són comparables a micelles tubulars i apareixen en lípids amb caps polars relativament grans [10, 12]; (C) Fase hexagonal de tipus II (H_{II}). En aquest cas, els lípids també formen cilindres orientats perpendicularment al pla de la figura, però amb una disposició inversa: els caps polars s'orienten cap a l'interior del cilindre, envoltant un canal aquós, mentre que les regions hidrofòbiques es disposen cap a l'exterior. Aquesta configuració, coneguda com a micel·la inversa, és característica de lípids amb forma cònica i es veu afavorida per condicions com la deshidratació, l'augment de temperatura o la presència d'insaturacions [10–11]

2.1.1.2. Segregació lipídica: diagrama de fases

L'organització d'un lípid en una barreja lípid/aigua depèn principalment de la temperatura i de la fracció de lípid present. La representació d'aquestes condicions i de les fases resultants constitueix el diagrama de fases [3]. A la figura 2-12 es pot veure un exemple d'una part d'un diagrama de fases d'una barreja fosfolípid/aigua [14]. En general, les fases hexagonals inverses (H_{II}) són afavorides per concentracions elevades de lípids, temperatures altes, deshidratació i presència d'insaturacions a les cadenes acíliques [10].

En condicions fisiològiques (37 °C) i elevada concentració d'aigua, la majoria de fosfolípids adopten preferentment organitzacions lamel·lars (L_{α}), tot i que lípids com la fosfatidiletanolamina o els galactolípidos poden estabilitzar fases H_{II} [15–16].

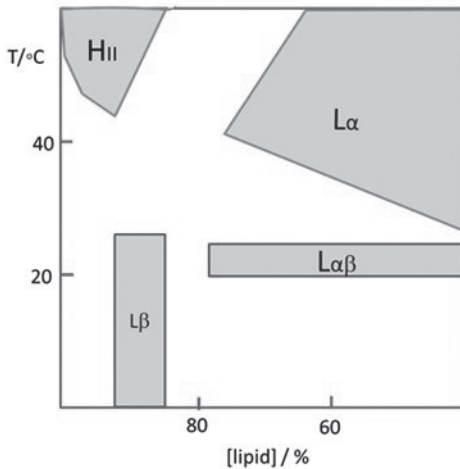


Figura 2-12. Diagrama de fase general d'un sistema fosfolípid/aigua. Els dominis d'existència de fases es determinen en funció de la temperatura i la concentració de lípid. Les fases $L\alpha\beta$ i $L\beta$ corresponen a les organitzacions lamel·lars en les que les cadenes hidrocarbonades dels lípids tenen una estructura ordenada. Adaptat de Shechter, E. Biochemie et Biophysique des membranes, 2na Ed. Masson, Paris 1993 (Figure 4-6) [14]

A la taula 2.1 es veu l'organització preferent d'alguns lípids molt comuns i també l'efecte que produeix sobre l'organització processos com la deshidratació, l'augment de temperatura o colesterol.

| LÍPIDS | FASES |
|--------------------------|---------------------|
| Fosfatidilcolina | L |
| Esfingomielina | L |
| Fosfatidiletanolamina | H _{II} |
| Fosfatidilserina | L |
| Fosfatidilglicerol | L |
| Cardiolipina | L |
| Monogalactosildiglicerid | H _{II} |
| Lisofosfatidilcolina | H _I |
| Insaturació | L → H _{II} |
| Deshidratació | L → H _{II} |
| Augment de T | L → H _{II} |
| + colesterol | L → H _{II} |

2.1.1.3. Forma estructural i relació amb la fase lipídica

El concepte de forma molecular constitueix una eina fonamental per comprendre les diverses organitzacions supramoleculares dels lípids. La figura 2-14 representa diferents formes moleculars dels lípids,

aquestes estructures depenen dels volums relatius, i, per tant, dels impediments estèrics, de les regions polar i hidrofòbica de les molècules lipídiques [17].

Observant la figura 2-13, la geometria efectiva d'un lípid ve determinada per la relació entre l'àrea del cap polar i la relació volum/longitud de les cadenes hidrofòbiques i condiona la curvatura que tendeix a imposar a la monocapa. Així, quan ambdues parts presenten volums similars, el lípid adopta una geometria cilíndrica i s'organitza en fase lamel·lar (L_{α}). Si el volum de la regió polar és superior al de la regió apolar, la molècula adquireix forma de con invers i es forma la fase micel·lar o hexagonal inversa (H_2) [10]. En canvi, si la part hidrofòbica és predominant, el lípid adquireix una forma cònica i tendeix a organitzar-se en fase H_{II} [11].

L'organització lipídica depèn no només de la naturalesa del lípid, sinó també de les condicions fisicoquímiques del medi [3]. Factors com la temperatura, l'hidratació, la insaturació de les cadenes acíliques o la presència de colesterol poden induir transicions de fase entre estructures lamel·lars i no lamel·lars [10].

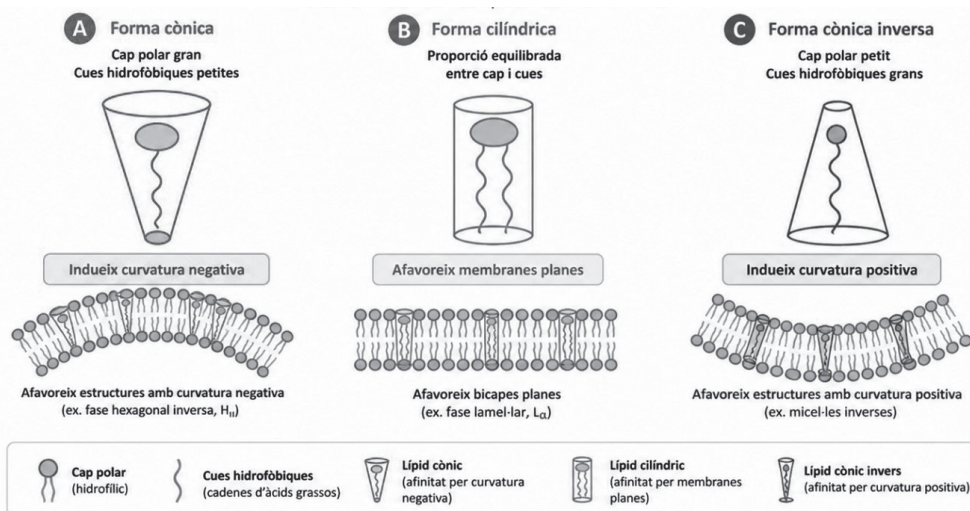


Figura 2-13. Relació entre la geometria molecular dels lípids amfífils i la curvatura de la membrana. Els lípids cònics (A), cilíndrics (B) i cònics inversos (C) determinen la curvatura espontània i l'organització estructural de la membrana. Elaboració pròpia, generada per IA, a partir de Shechter, E. Biochemie et Biophysique des membranes, 2na Ed. Masson, Paris 1993 (Figura 4-7) [14]

En la figura 2-14 es mostren les formes d'organització diferents tipus de lípids amfifílics segons la seva estructura molecular i la relació entre el volum de les cadenes hidrofòbiques i la superfície del cap polar, que determina la seva geometria efectiva (cilíndrica, cònica o cònica inversa). La fosfatidilcolina (fase L_{α}) i del fosfatidilinositol (fase H_I) es correlaciona directament amb la seva forma molecular observable. No obstant això, és menys evident per què la fosfatidiletanolamina, tot i presentar cadenes hidrocarbonades de longitud similar, s'organitzi preferentment en fase H_{II} [11].

Aquest comportament s'explica per la seva menor capacitat d'hidratació: la fosfatidilcolina pot coordinar aproximadament vint molècules d'aigua, mentre que la fosfatidiletanolamina només n'interacciona amb unes cinc [12].

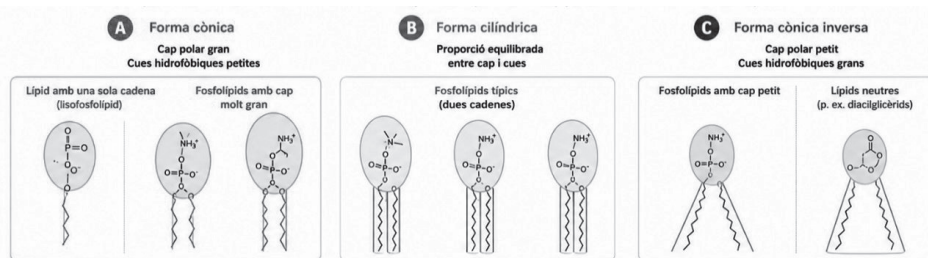


Figura 2-14. Representació de diferents tipus de lípids amfifílics segons la seva estructura molecular i la relació entre el volum de les cadenes hidrofòbiques i la superfície del cap polar, que determina la seva geometria efectiva (cilíndrica, cònica o cònica inversa) i, en conseqüència, la curvatura de membrana que afavoreixen. Elaboració pròpia, generada per IA, a partir d'Israelachvili JN. *Intermolecular and surface forces*. 3rd ed. London: Academic Press; 2011 [17]

Per aquest motiu, és imprescindible considerar totes les condicions fisicoquímiques del sistema: temperatura, concentració d'aigua, grau d'insaturació de les cadenes hidrocarbonades i presència de colesterol. Un augment de la temperatura incrementa la mobilitat de les cadenes acíliques, mentre que la deshidratació redueix el volum de la regió polar, afavorint l'organització en fase H_{II} . Igualment, la presència d'insaturacions a les cadenes lipídiques o la incorporació de colesterol també promou aquest tipus de disposició.

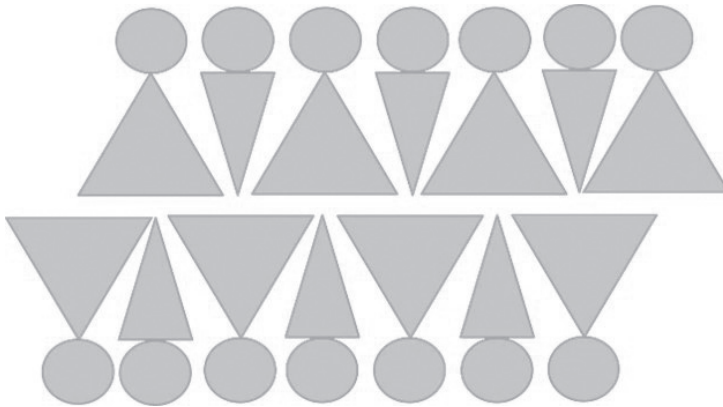


Figura 2-15. Organització lamel·lar per compensació de forma (compensació geomètrica). La barreja d'amfifils amb geometries diferents pot reduir l'estrès d'empaquetament. Lípids amb tendència a curvatura positiva (forma inversament cònica) i lípids amb tendència a curvatura negativa (forma cònica) poden compensar-se dins la bicapa, afavorint una organització lamel·lar ($L\alpha$) més estable. Adaptada de Shechter, E. *Biochemie et Biophysique des membranes*, 2na Ed. Masson, Paris 1993 (Figura 4-8) [14], vegeu també [9–11].

En sistemes mixtos, formats per diversos lípids i aigua, es pot produir compensació geomètrica entre molècules, determinant l'estructura final (Figura 2-15). Per exemple, la lisofosfatidilcolina (forma de con invers) i la dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (forma de con) poden barrejar-se i donar lloc a una organització en fase lamel·lar ($L\alpha$) [3]. Fenòmens similars s'observen en barreges d'esfingomielina i colesterol o de fosfolípids insaturats [18].

2.1.1.4. Organització lipídica a la membrana

En una membrana biològica o en una suspensió de liposomes en excés d'aigua, els lípids, generalment, constitueixen l'espessor de la membrana. Es pot trobar l'ordre a gran escala (1, 2 o 3 dimensions) observat per a les mescles lípid/aigua poc hidratades. Es pot establir l'equivalència entre l'organització en un sistema lípid/aigua y l'organització al sinus de la membrana (Figura 2-16).

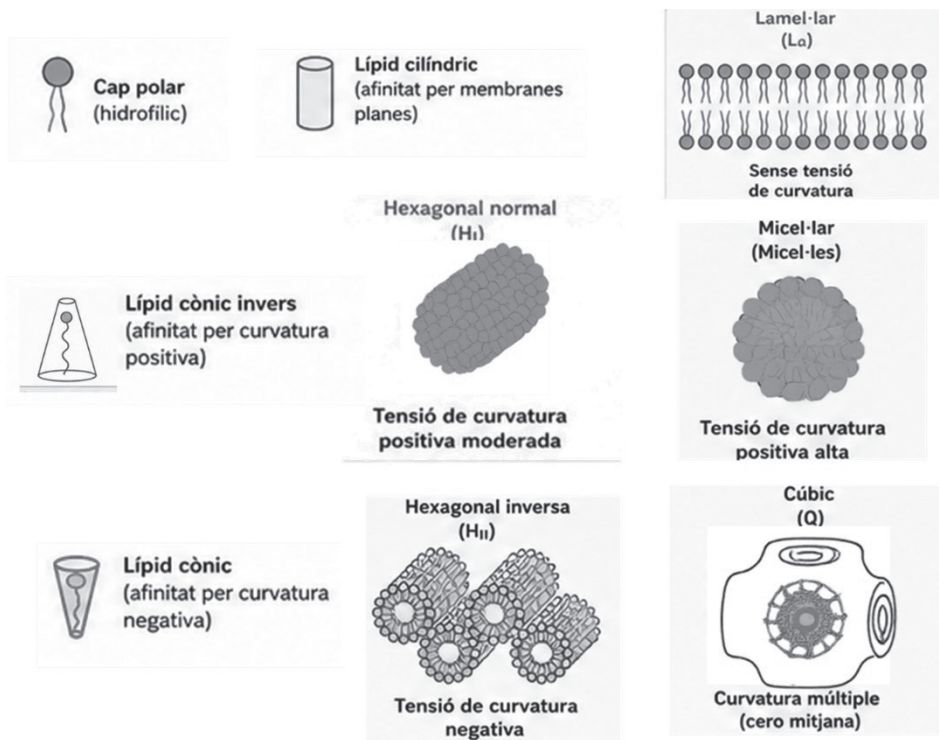


Figura 2-16. Relació entre la geometria molecular dels lípids amfífils, la curvatura espontània i les principals fases lipídiques resultants. Els lípids cilíndrics afavoreixen fases lamel·lars ($L\alpha$), els cònics inversos promouen fases amb curvatura positiva (micel·lars i hexagonals normals, H_I) i els cònics afavoreixen fases amb curvatura negativa (hexagonal inversa, H_{II}). Les fases cúbiques presenten una curvatura mitjana propera a zero i una elevada complexitat topològica. Elaboració pròpia, generada per IA, a partir de Huang Y, Gui S. *RSC Adv.* 2018; **8**: 6978–6987 [12].

L'equivalent de l'organització lamel·lar de les barreges lípid/aigua és clarament de bicapa lipídica. L'equivalent de l'organització tipus H_I és el de la micel·la clàssica, els detergents que solubilitzen les membranes i els liposomes adopten aquest tipus (ex: lisoPE). L'equivalent a l'organització H_{II} és més complicat d'imaginar. Surt d'una micel·la inversa en el sinus de l'espessor de la membrana (dintre de la bicapa), així tenim que els lípids que adopten H_{II} desestabilitzen la membrana.

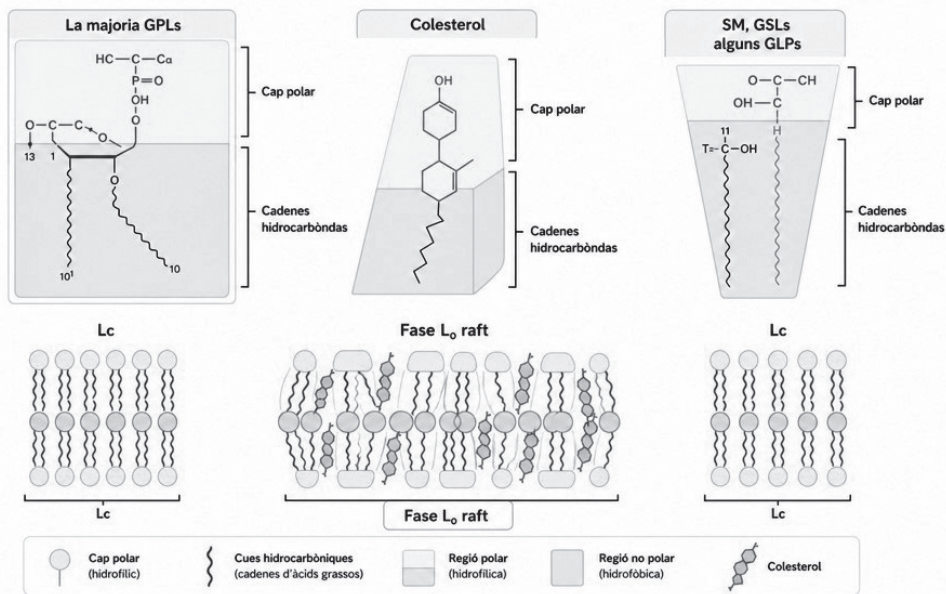


Figura 2-17. Organització lipídica i formació de microdominis (lipid rafts) en fase líquid-ordenada (Lo) (B). La geometria i l'empaquetament dels lípids (A) determinen l'heterogeneïtat lateral de la membrana. La fracció majoritària de glicerofosfolípids (GPLs), sovint amb cadenes acíliques insaturades, tendeix a formar un entorn més fluid i desordenat (fase Lo/Ld). En canvi, la esfingomielina (SM) i els glicoesfingolípid (GSLs), enriquits en cadenes llargues i saturades, presenten una elevada capacitat d'empaquetament i d'establir interaccions intermoleculares, i mostren una afinitat marcada pel colesterol. El colesterol s'intercala entre cadenes saturades, incrementa l'ordre sense eliminar la mobilitat lateral i afavoreix la segregació de dominis líquid-ordenats (Lo) enriquits en colesterol i esfingolípid, que poden actuar com a plataformes funcionals per a processos de transport i senyalització cel·lular [4–5, 7,20]. Adaptada de Fantini J, Garmy N, Mahfoud R, Yahi N. *Expert Rev Mol Med.* 2002; **4**(27):1-22 (figura 3) [19]

La figura 2-17 mostra un esquema d'organització a la membrana en un model simplificat basat en la forma teòrica dels lípids [19]. La capacitat dels lípids de la membrana per formar l'estructura bàsica de bicapa és el resultat de diverses propietats, la més important de les quals és el seu caràcter amfipàtic. En dissolvents aquosos, les molècules amfipàtiques, s'orienten naturalment per garantir que els grups polars s'associen amb molècules d'aigua, mentre que les cadenes hidròfobes interactuen uns amb altres de manera que les molècules d'aigua queden exclosos de la fase hidròfoba. Si la molècula de lípid és més o menys cilíndrica en dimensió, la configuració més estable termodinàmicament és la de bicapa.

En (A) es distingeixen les estructures de la majoria de glicerofosfolípids (GPLs), el colesterol, l'esfingomielina i gliceroesfingolípids (GSLs) així com altres GLPs. En (B) es mostra la fase més habitual de bicapa lipídica. En el cas de GPLs de forma més o menys cilíndrica es forma una estructura líquid cristal·lina (Lc), però, el colesterol i esfingolípids, especialment glicoesfingolípids (GSLs), tenen una forma piramidal o de con de manera el grup de cap polar ocupa una àrea més gran que fa la regió hidròfoba, mentre que el contrari és cert per al colesterol. Els esfingolípids es troben gairebé exclusivament en la capa externa de la membrana plasmàtica, on donat el notable ajust entre la forma global del colesterol i esfingolípids, qualsevol buit entre esfingolípids associats pot ser omplert pel colesterol com un espaiador molecular. L'enriquiment de colesterol en els dominis de fase en la membrana interna és compatible amb aquest model. Una estreta interacció entre el colesterol i esfingomielina s'ha demostrat en diversos sistemes de membrana reconstituïdes. L'organització de cua a cua de colesterol en els dominis lípid raft podria incrementar la rigidesa la capa citoplasmàtica interna de la membrana plasmàtica, que està pràcticament desproveïda d'esfingolípids, però conté GPLs seleccionats (per exemple, fosfatidiletanolamina i fosfatidilinositol amb cadenes d'acil saturats) amb propietats fisicoquímiques properes a les d'esfingomielina.

2.2. Propietats de la bicapa lipídica

En el marc d'aquesta aproximació a la naturalesa biofísica de la membrana cel·lular, convé aprofundir en les propietats que deriven de la seva composició lipídica. La disposició, varietat i proporció dels lípids confereixen a les membranes un conjunt de característiques essencials per al correcte desenvolupament de les funcions que els són pròpies. Entre aquestes, destaquen de manera particular la permeabilitat, la fluïdesa, l'heterogeneïtat lateral i l'asimetria estructural [1].

2.2.1. Permeabilitat

La permeabilitat, entesa com la capacitat selectiva de la membrana per permetre el pas de nutrients, aigua o molècules de rebuig, constitueix un element primordial del seu paper com a interfase reguladora.

La membrana és, al mateix temps, una barrera i una porta dinàmica, capaç d'autoritzar o restringir el trànsit molecular segons les necessitats fisiològiques de la cèl·lula.

2.2.2. Fluïdesa

Igualment rellevant és la fluïdesa, propietat que deriva del moviment lateral dels lípids dins del pla de la bicapa. Les membranes es comporten com un líquid viscos, i aquesta naturalesa quasi fluida permet la reorganització contínua tant de lípids com de proteïnes [12]. Els lípids poden desplaçar-se ràpidament en difusió lateral, mentre que el moviment transversal, el conegut flip-flop, és extraordinàriament infreqüent per a la majoria de fosfolípids i glicolípid [3].

Aquesta fluïdesa depèn de manera decisiva de diversos factors estructurals, entre els quals destaquen la longitud i el grau d'insaturació dels àcids grassos, que modulen l'empaquetament lipídic [12], així com el paper dual del colesterol, que estabilitza la membrana a temperatures elevades i en prevé la cristal·lització a temperatures baixes [21]. L'asimetria entre hemicapes contribueix igualment a la generació de regions amb diferent densitat i ordre, amb zones en fase líquid-ordenada coexistent amb zones en fase líquid-desordenada [5].

Les cèl·lules disposen de mecanismes refinats per regular aquesta fluïdesa, adaptant-la a les condicions ambientals. Així, bacteris i insectes ajusten la insaturació dels seus lípids [3], mentre que les mitocondries confien en lípids especialitzats com la cardiolipina per mantenir l'equilibri entre flexibilitat i impermeabilitat [22].

2.2.3. Heterogeneïtat

Ara bé, malgrat aquesta mobilitat intrínseca, la membrana plasmàtica presenta una marcada heterogeneïtat lateral, producte d'un conjunt de restriccions físiques i moleculars que generen microdominis d'entre 60 i 200 nm [20, 23]. A escala nanomètrica, nombroses molècules es mouen en compartiments transitoris abans de saltar a un altre domini, reflectint la complexitat interna de la membrana [24].

Un cas paradigmàtic d'aquests microdominis són els lipid rafts, rics

en esfingolípid i colesterol, caracteritzats per una densitat elevada i una fluïdesa reduïda [4, 7]. Aquestes estructures, d'entre 10 i 200 nm, actuen com a plataformes per a la senyalització cel·lular, el reconeixement molecular i diferents processos d'entrada de patògens [5].

La hemicapa interna també presenta dominis electroestàtics modulats per lípids com el fosfatidilinositol, que regulen de manera precisa la interacció amb proteïnes citosòliques [25]. Tot i la visió tradicional de la bicapa com un conjunt de capes independents, avui sabem que existeix una clara interdependència entre hemicapes, facilitada per proteïnes transmembrana i per la interacció de cadenes lipídiques [1].

Les proteïnes de membrana formen sovint nanoclústers i complexos funcionals essencials per a la transmissió de senyals o l'activació enzimàtica, com ocorre en el receptor de la insulina [26]. La seva mobilitat es veu sovint restringida pel citoesquelet o la matriu extracel·lular, estructures que creen barreres funcionals a la difusió [24, 27]. Aquest fenomen és especialment rellevant en cèl·lules polaritzades, com les epitelials, on les unions estretes segreguen amb precisió les proteïnes entre les zones apical i basal [28].

2.2.4. Asimetria

Finalment, l'asimetria de la membrana constitueix un tret definitori: les dues hemicapes presenten composicions diferenciades, responen als medis químicament distints amb què contacten i a la disposició específica de les proteïnes integrals [1]. Tot i que és possible una difusió transversal espontània, aquesta és extraordinàriament lenta per a lípids amb caps polars importants, i és facilitada sobretot per esterois i petites molècules altament hidrofòbiques [3]. Per aquesta raó, la cèl·lula depèn de proteïnes especialitzades que catalitzen aquest intercanvi.

2.2.5. Càrrega elèctrica

Les propietats elèctriques de la membrana cel·lular deriven d'un fet físic simple però decisiu: el nucli hidrofòbic de la bicapa lipídica és un excel·lent dielèctric, mentre que els medis aquosos intra- i extracel·lular són conductors iònics. Això fa que la membrana es comporti com un

condensador (separa càrregues a banda i banda) en paral·lel amb vies conductores (canals, transportadors i fuites iòniques), situant l'electricitat al centre del transport, la senyalització i la homeòstasi [29].

Ara bé, aquesta electricitat no és un valor únic, a la membrana hi conviuen diferents potencials [30] que tenen causes i efectes diferents. D'una banda, la càrrega superficial (caps polars aniònics com fosfatidilserina, fosfatidilinositol, sialats del glicocàlix, etc.) genera un potencial de superfície a la interfície membrana–solució i organitza una doble capa elèctrica d'ions. Aquest camp electrostàtic modula l'adsorció de proteïnes i pèptids catiònics, la unió de lligands/fàrmacs carregats i fins i tot l'activitat de membranes, globalment neutres, però amb microdominis carregats [31].

D'altra banda, el potencial de membrana (V_m) és la diferència de potencial entre citosol i medi extern, determinada pels gradients iònics i la permeabilitat selectiva (canals oberts o tancats). En termes fisiològics, això es formalitza amb Nernst per a un ion i amb la formulació de Goldman–Hodgkin–Katz quan hi contribueixen diversos ions, connectant composició iònica, permeabilitats relatives i potencial de membrana [29]

Finalment, existeix el potencial dipolar (un salt de potencial dins la regió interfacial de la bicapa) originat per l'orientació preferent de dipols de lípids i aigua interfacial [32]. Tot i que no és el mateix que V_m , pot alterar barreres energètiques i, per tant, la permeabilitat relativa a espècies carregades i la manera com certs pèptids/proteïnes s'insereixen o s'orienten a la membrana [32–33].

En formulació farmacèutica, quan la membrana es presenta com a partícula o gota dispersa (liposomes, nanoemulsions, emulsions lipídiques parenterals), és especialment útil el potencial zeta (ζ), aquest és el potencial efectiu a la frontera de lliscament de la doble capa, que es calcula a partir de la mobilitat electroforètica i s'utilitza com a indicador operacional de repulsió electrostàtica i, per tant, de risc d'agregació/coalescència. Els estàndards ISO descriuen els mètodes òptics per mesurar mobilitat electroforètica i derivar ζ , i nombroses guies usen (com a regla pràctica) que valors de $|\zeta|$ prou elevats s'associen a millor estabilitat col·loïdal (sense que això substitueixi altres

determinants com viscositat, estabilització estèrica o densitats [34]. En emulsions lipídiques de nutrició parenteral, per exemple, la càrrega negativa superficial de les gotes contribueix a la repulsió mútua; l'addició de cations i canvis de pH poden apantallar aquesta càrrega, reduir ζ i afavorir agregació i separació de fases, un mecanisme amb implicacions directes de qualitat i seguretat [35].

2.2.6. Curvatura

La curvatura és una propietat constitutiva de la membrana biològica i, alhora, un mecanisme de control: la membrana no només adopta formes corbades, sinó que les genera i les explota per organitzar funcions cel·lulars. Des d'una perspectiva biofísica, la deformació d'una bicapa comporta un cost energètic que es pot descriure amb l'elasticitat de membrana (p. ex., rigidesa de flexió i curvatura espontània), tal com formalitza el marc de Helfrich. Aquesta lectura converteix la curvatura en una variable mesurable i funcional, comparable a altres propietats com la fluïdesa, el gruix o la tensió lateral [36].

En biologia cel·lular, la curvatura actua com a plataforma d'especificitat espacial i temporal: concentra maquinàries moleculars, defineix intermediaris topològics i regula el tràfic de membranes [37]. En la gemació i formació de vesícules (p. ex., endocitosi mediada per clatrina), la membrana transita per estats de curvatura creixent fins a la fissió, procés que requereix la coordinació de múltiples mòduls proteics i l'acoblament entre recobriments, adaptadors i proteïnes de remodelatge [38]. En paral·lel, nombroses proteïnes són capaces d'induir i/o reconèixer la curvatura, els dominis BAR (dominis de dimerització de proteïnes altament conservats) funcionen com a bastides que estableixen geometries tubulars o invaginacions, mentre que hèlixs amfipàtiques (incloent motius tipus ALPS) poden inserir-se parcialment a la monocapa i actuar com a falques que promouen deformacions locals i, sovint, també sense curvatura [39].

Finalment, la curvatura està íntimament lligada a la composició lipídica. Lípids amb geometria molecular cònica o amb tendència a fases no lamel·lars poden facilitar estats de curvatura elevada i intermediaris crítics en processos com la fusió, en què la bicapa ha de recórrer camins topològics que impliquen distorsions intenses de les monoca-

pes [40]. A més, la curvatura pot afavorir la classificació: certs lípids i proteïnes es redistribueixen preferentment cap a regions més o menys corbades perquè això minimitza l'energia de flexió o optimitza l'empaquetament lipídic, connectant així la geometria de la membrana amb l'heterogeneïtat lateral i la funció [41].

Així, la membrana cel·lular es revela com una plataforma extraordinàriament rica en organització, on la mobilitat, l'ordre, la heterogeneïtat i la regulació convergeixen per crear un espai funcional altament especialitzat. **Comprendre aquest escenari no és només un repte científic, és una condició indispensable per interpretar les respostes cel·lulars i, en el nostre camp, per entendre les interaccions profundes entre els fàrmacs i la seva primera interfase: la membrana biològica.**

2.3. Processos biofísics a la membrana

L'estructura lamel·lar de la membrana és la predominant deriva d'una compensació col·lectiva de formes, un balanç d'estructures cilíndriques, còniques i inversament còniques, que afavoreix l'estabilitat de la bicapa [42]. Tanmateix, la naturalesa dinàmica de la membrana fa plausible l'existència, en determinades condicions i de manera local i transitòria, d'organitzacions alternatives, com per exemple estructures de tipus micel·la inversa o configuracions pròpies de fases no lamel·lars [43].

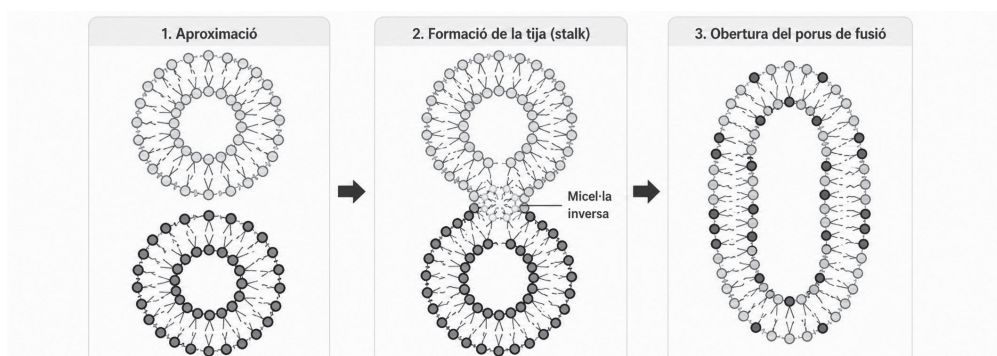


Figura 2-18. Etapes del procés de fusió. La fusió comença amb l'aproximació de dues membranes, continua amb la formació d'un intermediari en forma de tija i culmina amb l'obertura del porus de fusió. Adaptat de Shechter, E. Biochemie et Biophysique des membranes, 2na Ed. Masson, Paris 1993 (Figure 4-11) [14]

Aquesta possibilitat s'explica, en primer lloc, per la difusió lateral dels lípids, que permet la segregació espontània d'espècies amb geometries moleculars similars. Una acumulació local de lípids de forma cònica pot generar curvatures accentuades i, eventualment, afavorir la formació d'intermedis de micel·la inversa. Factors que redueixen la mida efectiva de la regió polar com la presència del calci divalent (Ca^{2+}), que exerceix un paper rellevant en la coordinació de lípids àcids, tendeixen igualment a promoure configuracions amb geometria de con [42].

A més, la presència de proteïnes de membrana pot modificar de manera significativa l'organització lipídica. La inserció de pèptids relativament curts en una bicapa pot induir desestabilitzacions locals que, sota condicions apropiades, com es mostra a l'esquema de la figura 2-18, condueixen a la formació transitòria d'estructures de micel·la inversa [44]. Aquest fenomen no és merament teòric; apareix durant processos biològics tan rellevants com la translocació de proteïnes a través de membranes o durant la fusió induïda pels anomenats pèptids de fusió, presents en virus i altres sistemes cel·lulars [45].

2.3.1. Fusió de membranes

La fusió de membranes constitueix un procés fonamental en la fisiologia cel·lular, imprescindible per al desenvolupament de funcions tan diverses com l'endocitosi i l'exocitosi, el transport vesicular, la fertilització, la miogènesi o la comunicació intracel·lular. Igualment, aquest fenomen és determinant en el cicle d'infecció dels virus amb embolcall, els quals depenen de la coalescència entre la seva membrana lipídica i la membrana plasmàtica de la cèl·lula hoste per iniciar l'entrada del material genètic viral [46]. Així, la fusió no representa únicament un esdeveniment estructural, sinó un mecanisme essencial de comunicació, intercanvi i reorganització funcional en els sistemes biològics.

Aquest procés pot ser induït artificialment, circumstància que ha permès el desenvolupament d'importants aplicacions biotecnològiques. Entre aquestes destaquen la formació de liposomes gegants mitjançant la fusió de vesícules lipídiques de menor dimensió, la generació de cèl·lules híbrides a partir de la fusió controlada de protoplasts i la introducció de macromolècules, com ADN, ARN o proteïnes, al citoplasma cel·lular mitjançant liposomes carregats, estratègia que

constitueix la base de nombroses tècniques de transferència gènica i d'alliberament terapèutic [47].

Des d'un punt de vista mecànic, la fusió implica la coalescència de dues membranes, que poden procedir de vesícules diferents o de regions diferenciades d'una mateixa membrana. En el primer cas, el resultat és una estructura única de major dimensió; en el segon, el procés acostuma a anar seguit d'un fenomen de fissió que dona lloc a la formació de noves vesícules [48]. A la figura 2-19 es mostra el mecanisme que presenta una seqüència estructural característica, un contacte inicial entre membranes, una barreja parcial dels lípids externs que condueix a l'estat d'hemifusió i, finalment, la formació d'un porus de fusió que permet la mescla completa dels continguts luminals [46, 49].

La probabilitat i l'eficiència del procés depenen del balanç de forces intermoleculares que actuen quan dues membranes s'aproximen. Les interaccions atractives són principalment de tipus Van der Waals, mentre que les forces repulsives deriven de la repulsió electrostàtica entre les capes polars lipídiques i, especialment, de les forces d'hidratació, que constitueixen la principal barrera a distàncies curtes [42].

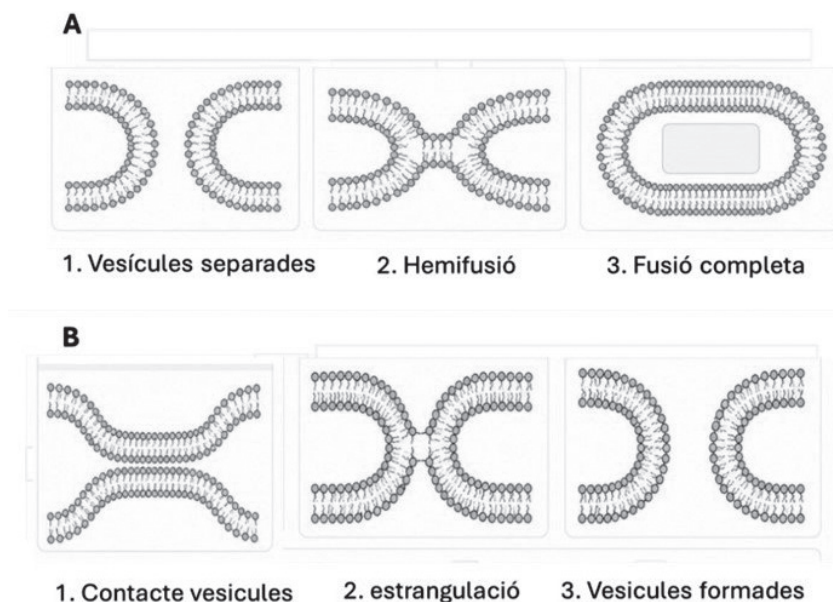


Figura 2-19. Passos bàsics de la fusió (A) i fissió (B) de membranes. Adaptada de Yang Z, Gou L, Chen S L N, Zhang S and Zhang L 2017 *Front. Mol. Neurosci.* **10**:168. Figure 1[49]

L'energia del sistema (figura 2-20) presenta habitualment dos mínims locals: un mínim secundari, situat entre 3 i 10 nm, que correspon a un estat d'agregació feble, i un mínim primari, entre 1 i 2 nm, associat a un contacte estret entre membranes. La transició entre aquests estats requereix superar una barrera energètica vinculada a la deshidratació de les capes polars, pas necessari per afavorir el contacte íntim i la desestabilització local de l'organització lamel·lar.

Aquesta desestabilització pot conduir a la formació d'estructures intermèdies associades a la fase hexagonal inversa (HII), característiques dels intermedis de fusió [43]. Els agents fusogènics actuen reduint aquesta barrera energètica i promovent la desestabilització local de la bicapa, facilitant així la coalescència efectiva entre membranes [50].

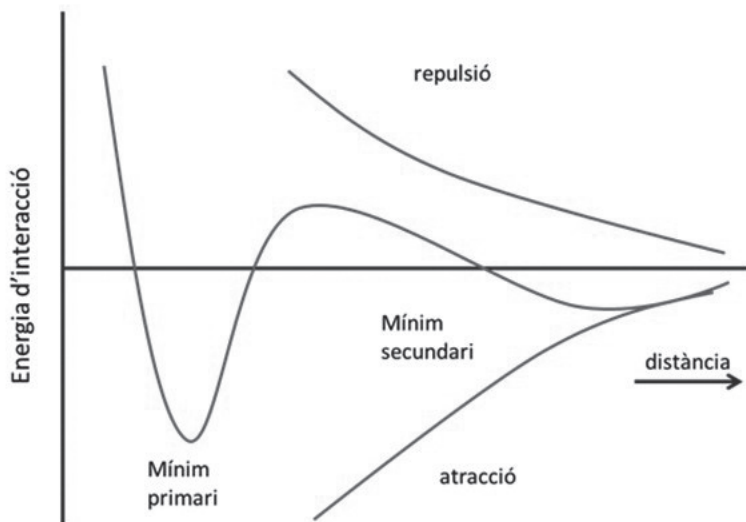


Figura 2-20. Energia d'interacció entre dues membranes en funció de la distància. L'energia total amb dos mínims és el resultat de l'atracció (Van der Waals) i de forces repulsives (electrostàtiques i sobretot hidratació) *Adaptat de Shechter, E. Biochemie et Biophysique des membranes, 2na Ed. Masson, Paris 1993 (Figure 4-13) [14]*

Diversos factors fisicoquímics poden estimular el procés de fusió. L'ió calci (Ca^{2+}) exerceix un paper destacat en sistemes liposomals formats per fosfolípids àcids, com la fosfatidilserina. Aquest catió promou la deshidratació de les capes polars i redueix la repulsió electrostàtica,

establint enllaços en trans entre fosfolípids de vesícules diferents i substituint les molècules d'aigua en la regió d'interacció. A la figura 2-21 s'observa el resultat de dos assaigs de transferència d'energia per ressonància (FRET) on l'ió Ca^{2+} provoca fusió, en canvi, el Mg^{2+} tendeix a produir agregació reversible, ja que forma principalment enllaços en cis dins d'una mateixa vesícula [51].

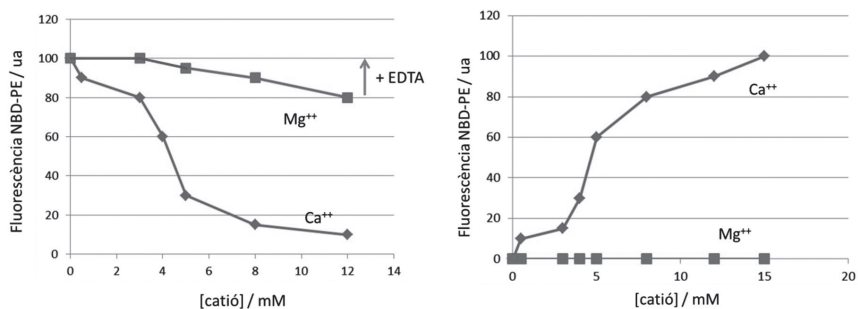


Figura 2-21. Resultat dels dos assaigs realitzats per veure l'efecte de l'ió Ca^{2+} comparat amb el Mg^{2+} . Dreta: dos poblacions de liposomes marcats amb sondes diferents (NBD-PE i Rh-PE) quan s'apropen hi ha transferència d'energia i es produeix una disminució de %F en la longitud d'ona d'emissió de la NBD. Esquerra: dos poblacions de liposomes, una marcada amb les dues sondes, l'altra sense marcar, en produir-se fusió, augmenta el %F en la longitud d'ona d'emissió de la NBD. Adaptat de Shechter, E. *Biochimie et Biophysique des membranes*, 2na Ed. Masson, Paris 1993 (Figure 4-15) [14]

Per tal que es produeixi FRET cal un solapament entre l'espectre d'emissió de fluorescència d'un donant i l'espectre d'absorció d'un receptor (figura. 2-22). Si, durant l'aproximació o la hemifusió, els fluoròfors queden a distàncies nanomètriques (aprox. 1–10 nm), l'energia del donador excitat pot transferir-se no radiativament a l'acceptor. Això es detecta com disminució del senyal del donador i augment del senyal de l'acceptor. L'eficiència de la transferència dependrà de la superposició, l'orientació relativa de les dues sondes i la distància R entre el donant i el receptor. L'eficiència de la transferència varia com $1/R^6$, és molt sensible als canvis amb la distància. És aquesta propietat que s'utilitza per supervisar la fusió de dues membranes i converteix el FRET en una regla molecular molt útil per seguir canvis estructurals durant la fusió (aproximació, hemifusió, reorganització de lípids) [52].

Acceptant que els parells acceptor i donador són compatibles, l'element més crític necessari perquè es produeixi FRET és la proximitat

de les sondes. A la pràctica, el donador i l'acceptor utilitzats en el cas de fusió de membranes són les derivades dels fosfolípids, es troben marcats amb una sonda fluorescent, les més utilitzades són NBD-PE i la Rh-PE, el fluoròfor es troba unit a la part polar del lípid. Per a NBD-PE, $\lambda_{ex} = 460 \text{ nm}$ i $\lambda_{em} = 535 \text{ nm}$ i per a Rh-PE, $\lambda_{ex} = 563 \text{ nm}$ i $\lambda_{em} = 585 \text{ nm}$. Es realitzen dos tipus d'assaigs, un en el que es marquen dues poblacions de liposomes, una amb NBD i l'altra amb Rh.

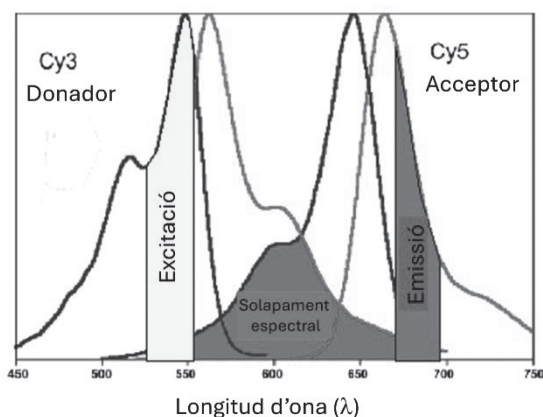


Figura 2-22. Esquerra: Principi de FRET (Cy3/Cy5) aplicat al seguiment de la fusió de membranes. El donador Cy3 s'excita a la banda indicada (groc) i emet a longituds d'ona que se solapen amb l'espectre d'excitació/absorció de l'acceptor Cy5 (zona verda). Quan donador i acceptor es troben a distàncies nanomètriques, com pot succeir durant l'aproximació de membranes i els estats previs a la fusió completa, es produeix transferència d'energia i s'observa disminució de l'emissió del donador i augment de l'emissió de l'acceptor (vermell). Adaptat d'Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004. (Figure 2) [53]

A l'inici es troben separades, si es produeix agregació o fusió s'uniran (Figura 2-23) i es produirà transferència d'energia i augmentarà la fluorescència de l'acceptor. En el segon assaig es marca una població de liposomes amb les dues sondes i es barreja amb una població de liposomes blancs de manera que només es produirà una disminució de la fluorescència de l'acceptor si es produeix fusió ja que, en aquest cas, s'allunyen les sondes (Figura 2-24). L'electrofusió constitueix una altra estratègia per induir la fusió de membranes. L'aplicació d'un camp elèctric d'intensitat suficient provoca una permeabilització transitòria de la membrana i facilita la coalescència de vesícules o cèl·lules [54].

Finalment, els pèptids fusogènics constitueixen un mecanisme biolò-

gic altament especialitzat per promoure la fusió de membranes. Determinats virus amb envolta, com el virus de la grip o el virus de Sendai, utilitzen proteïnes de fusió que, activades per canvis de pH o per interaccions amb receptors cel·lulars, indueixen la fusió amb membranes endosomals o plasmàtiques i permeten la penetració del material genètic viral al citoplasma [55–56]. Aquest mecanisme exemplifica la sofisticació dels processos naturals de fusió i ha inspirat el desenvolupament de pèptids fusogènics amb aplicacions terapèutiques.

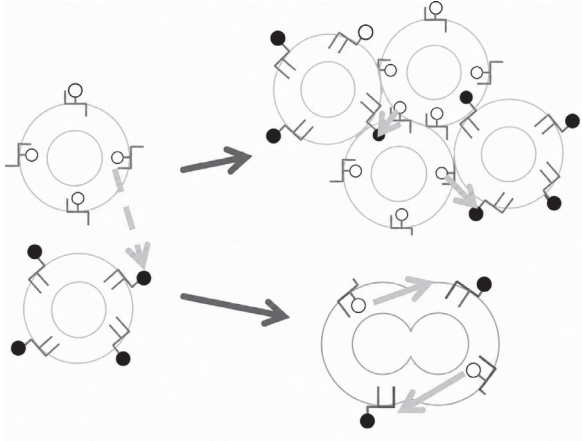


Figura 2-23. Esquema de l'assai que es realitza per conèixer si es produeix agregació o fusió de membranes. Es marquen dues poblacions de liposomes, una amb NBD (blanc) i l'altra amb Rh (negre). A l'inici es troben separades, si es produeix agregació o fusió s'uniran i es produirà transferència d'energia (augmenta la fluorescència de l'acceptor).

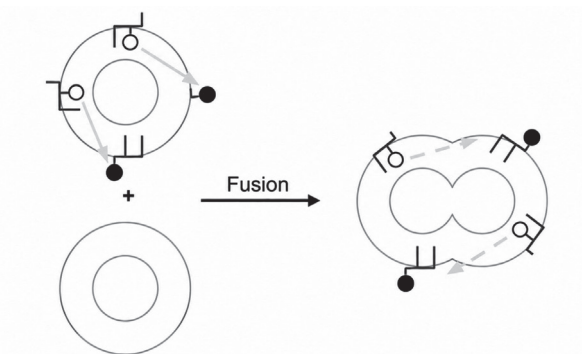


Figura 2-24. Esquema de l'assai que es realitza per conèixer si es produeix fusió de membranes. Es marca una població de liposomes amb les dues sondes (NBD (blanc) i Rh (negre)) i es barreja amb una població de liposomes blancs de manera que només es produirà una disminució de la fluorescència de l'acceptor si es produeix fusió per que se separaran les sondes.

En conjunt, la fusió de membranes representa un fenomen dinàmic que integra mecanismes fisicoquímics, estructurals i biològics, i que resulta essencial tant per al funcionament cel·lular com per a nombroses aplicacions biomèdiques i biotecnològiques. La seva comprensió ha contribuït de manera decisiva al desenvolupament de sistemes d'alliberament de fàrmacs, tecnologies de transferència gènica i estratègies antivirals, confirmant la centralitat de la dinàmica membranosa en la biologia contemporània i en la innovació farmacèutica.

2.3.2. Difusió transversal de lípids

La difusió transversal dels lípids constitueix un procés essencial en la dinàmica de les membranes biològiques i es troba estretament vinculada a una de les seves propietats estructurals més rellevants: l'asimetria. Aquesta asimetria implica que la composició lipídica de cadascuna de les monocapes de la bicapa no és equivalent. La seva existència respon tant a l'exposició diferencial de cada cara a entorns fisicoquímics distints —la monocapa externa en contacte amb el medi extracel·lular i la interna amb el citosol— com a l'organització vectorial de les proteïnes de membrana, que s'insereixen segons la seva funció i orientació específica [3]. Quan els lípids romanen confinats dins d'una sola monocapa, aquesta distribució desigual constitueix un estat funcional estable.

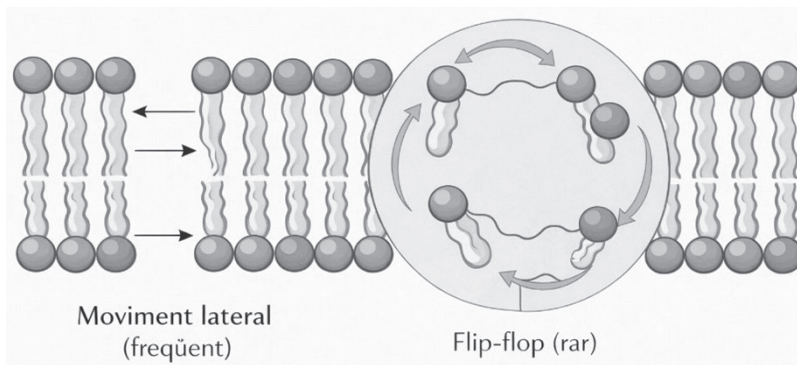


Figura 2-25. Moviments dels fosfolípids en una bicapa: difusió lateral i translocació transversal (flip-flop). Els fosfolípids poden difondre lateralment dins d'una mateixa hemicapa amb gran facilitat, mentre que el flip-flop (pas a l'hemicapa oposada) és rar perquè implica el trànsit del cap polar a través del nucli hidrofòbic. Adaptada de Campbell NA, Reece JB. *Biology*. 8th ed. San Francisco (CA): Pearson/Benjamin Cummings; 2008 (Fig. 7-5a) [56]

No obstant això, els lípids poden desplaçar-se d'una cara a l'altra de la bicapa, fenomen conegut com a difusió transversal o flip-flop (Figura 2-25) [56]. Aquest procés descriu l'intercanvi de molècules lipídiques entre monocapes: el moviment d'un lípid en una direcció comporta un desplaçament compensatori en sentit oposat per mantenir l'equilibri geomètric i de massa [57].

En membranes biològiques, la difusió transversal dels fosfolípids i d'altres lípids amb caps polars voluminosos és extremadament lenta, ja que aquests grups hidrofílics han de travessar el nucli hidrofòbic de la bicapa, que constitueix una barrera energètica elevada [58]. En contrast, molècules petites i relativament apolars com els esterols, els àcids grassos o el glicerol, difonen amb més facilitat. Determinades configuracions estructurals transitòries, com la formació de micelles inverses, poden facilitar aquest procés. En condicions fisiològiques, el moviment transversal pot ser catalitzat o regulat per proteïnes especialitzades implicades en el transport lipídic [59].

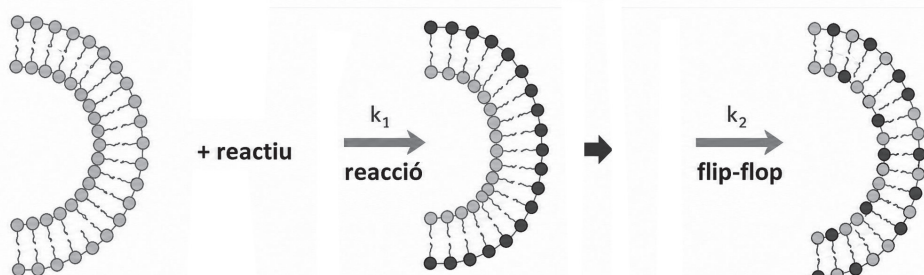


Figura 2-26. Marcatge d'una monocapa externa seguida d'un procés de difusió transversal de lípids. Les boletes grises i negres representen els lípids no marcats i marcats respectivament. Adaptat de Shechter, E. *Biochimie et Biophysique des membranes*, 2na Ed. Masson, Paris 1993 (Figure 5-2) [14]

La determinació experimental de l'asimetria lipídica i de la cinètica del moviment transversal s'ha abordat mitjançant diverses estratègies metodològiques. L'ús de reactius químics capaços de marcar selectivament la monocapa externa permet seguir la redistribució temporal dels lípids i calcular constants de difusió transversal (figura 2-26).

Quan la velocitat de modificació química dels lípids accessibles és superior a la del moviment transversal, es poden inferir tant l'asimetria estructural com la dinàmica del procés (Figura 2-27) [60].

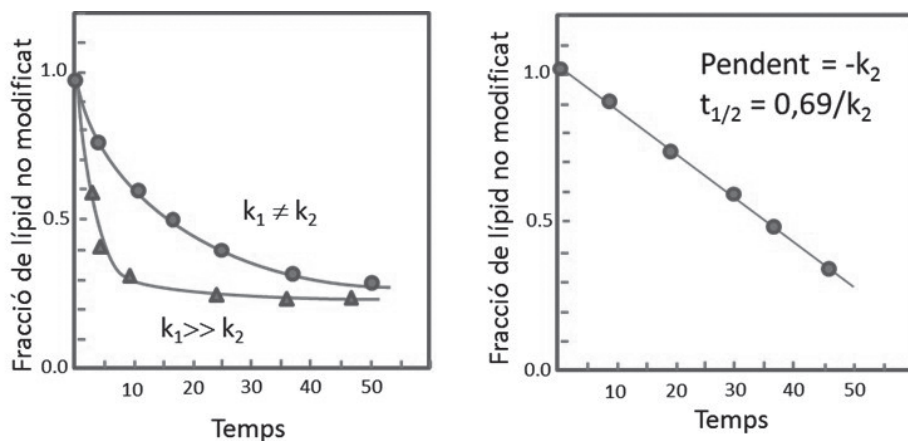


Figura 2-27. Modificació de lípids accessibles en funció del temps. Esquerra: fracció de lípids no modificats seguint que k_1 és igual o més gran que k_2 . Dreta: determinació de la constant de difusió transversal per al cas en que $k_1 \gg k_2$. Adaptat de Shechter, E. Biochemie et Biophysique des membranes, 2na Ed. Masson, Paris 1993 (Figure 5-3) [14]

Un altre enfocament es basa en l'acció d'enzims hidrolítics, com les fosfolipases, que actuen exclusivament sobre lípids accessibles a la cara externa. Segons el punt d'escissió, aquestes enzims es classifiquen en A_1 , A_2 , C o D i generen productes específics identificables analíticament. L'esfingomielinasa, per exemple, és una fosfolipasa C específica per a l'esfingomielina [61]. L'anàlisi dels productes d'hidròlisi i de la seva cinètica permet determinar la distribució dels lípids exposats i inferir l'asimetria de la membrana [62]. De manera complementària, l'ús de fosfolípids marcats radioactivament i proteïnes d'intercanvi lipídic permet monitorar la redistribució entre monocapes.

En sistemes model, com els liposomes, especialment útils per estudiar el flip-flop, mitjançant la incorporació de sondes paramagnètiques detectables per ressonància paramagnètica electrònica (EPR), es pot generar una asimetria inicial i seguir-ne l'evolució temporal. L'eliminació selectiva de la sonda present a la monocapa externa permet quantificar la disminució del senyal associada al moviment transversal [63] (figura 2-28).

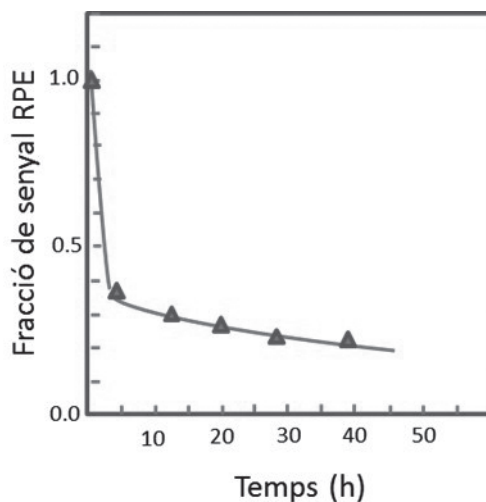


Figura 2-28. Determinació experimental de la velocitat de difusió transversal. L'addició d'ascorbat destrueix immediatament els derivats nitròxids localitzats a la capa externa. La disminució posterior és el resultat del flip-flop. Adaptat de Shechter, E. *Biochimie et Biophysique des membranes*, 2na Ed. Masson, Paris 1993 (Figure 5-12) [14]

Altres sondes, com derivats amb grups sulfhidril reactius amb DTNB, permeten determinar el temps mitjà del procés a partir de canvis d'absorbància. Aquests estudis han demostrat que el temps de semivida del flip-flop en fosfolípids amb caps polars pot ser de dies, mentre que en lípids apolars com els diacilglicerols es produeix en segons [64], confirmant que el cap polar constitueix la principal barrera energètica.

En liposomes, la difusió transversal dels fosfolípids és generalment molt lenta, amb constants temporals que poden oscil·lar entre hores i dies (Figura 2-29). Tanmateix, la velocitat pot augmentar en presència de proteïnes transmembrana o per modificacions de les interaccions lípid-lípid. L'addició d'ions Ca^{2+} , per exemple, pot afavorir la formació d'estructures intermèdies que redueixen la barrera energètica i acceleren el procés [65]. En membranes cel·lulars com les dels eritròcits, una fracció significativa de la fosfatidilcolina és accessible a la monocapa externa i intercanvia relativament ràpidament, mentre que la fracció interna roman estable durant períodes prolongats [66].

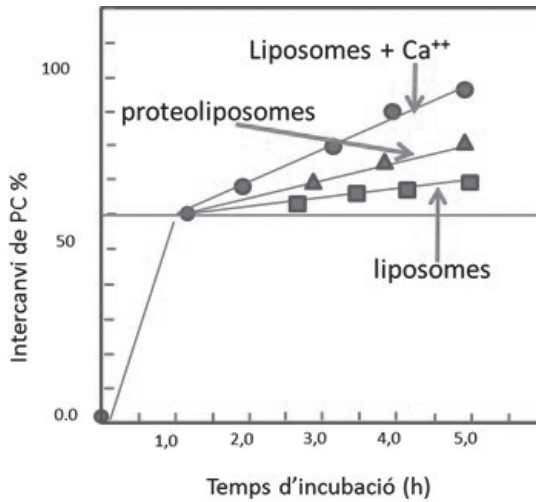


Figura 2-29 Difusió transversal de fosfatidilcolina (PC) en liposomes, proteoliposomes i efecte de l'ió Ca^{2+} en funció del temps d'incubació. Adaptat de Shechter, E. *Biochimie et Biophysique des membranes*, 2na Ed. Masson, Paris 1993 (Figure 5-12) [14]

En membranes biogèniques, com les del reticle endoplasmàtic, la situació és substancialment diferent. Els enzims biosintètics orienten els seus centres catalítics cap al citosol, de manera que els lípids s'incorporen inicialment a la monocapa citoplasmàtica. Tot i això, la distribució final és simètrica entre monocapes, fet que implica l'existència d'un moviment transversal ràpid cap a la cara luminal. Aquest procés és mediat per proteïnes especialitzades (flipases, flopases i escramblases) que regulen activament la distribució lipídica i mantenen l'asimetria funcional segons les necessitats cel·lulars [3, 59].

L'anàlisi comparativa entre membranes model, membranes no biogèniques i membranes biosintètiques evidencia que la difusió transversal dels lípids no és un procés passiu uniforme, sinó un fenomen altament regulat que depèn de l'organització estructural, la composició lipídica i la presència de proteïnes facilitadores. La seva regulació és essencial per mantenir l'asimetria funcional, assegurar la biosíntesi i el transport lipídic i preservar la integritat estructural de la membrana. En conseqüència, l'asimetria i la mobilitat lipídica emergeixen no només com a propietats estructurals, sinó com a determinants fonamentals de la funcionalitat biològica de les membranes.

2.3.3. Difusió lateral dels lípids: formació de dominis

La difusió lateral dels lípids correspon al moviment translacional de les molècules lipídiques dins del pla de la mateixa monocapa de la bicapa i constitueix una de les formes de mobilitat molecular més ràpides i determinants en la dinàmica de les membranes biològiques [67]. Aquest procés, governat pel moviment brownià i per les interaccions intermoleculares pròpies d'un medi bidimensional, es produeix mitjançant l'intercanvi continu de posicions entre lípids veïns sense que aquests abandonin la seva monocapa. Els coeficients de difusió lateral en membranes biològiques se situen habitualment entre 10^{-8} i 10^{-12} $\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ i depenen de factors com l'estat físic de la bicapa, la composició lipídica, la temperatura i la presència de proteïnes. Així, la mobilitat és més elevada en la fase líquid-cristal·lina que en la fase gel ordenada; la presència de colesterol i esfingolípid pot augmentar l'ordre i reduir la difusió; les proteïnes integrals poden actuar com a obstacles difusionals, i el citoesquelet subjacent pot compartimentalitzar el moviment, generant patrons de difusió confinada o anòmala.

La difusió lateral s'ha estudiat mitjançant diverses tècniques biofísiques, com la recuperació de fluorescència després de fotoblanqueig (FRAP) [68–69] la transferència d'energia per ressonància de fluorescència (FRET) [69] el seguiment de partícules individuals i la microscòpia de fluorescència [70] o de forces atòmiques [71], que permeten visualitzar la reorganització lateral i la formació de dominis [72–73].

La figura 2-30 mostra els dominis lipídics formats en liposomes gegants marcats amb sondes fluorescentes [72].

Des del punt de vista funcional, la difusió lateral és essencial per a la fluïdesa membranària i, per tant, per al funcionament correcte de receptors, canals iònics i enzims associats a la membrana. Aquesta mobilitat permet la formació i reorganització dinàmica de microdominis lipídics rics en colesterol i esfingolípid, que actuen com plataformes de senyalització i tràfic vesicular. Igualment, facilita les interaccions proteïna–proteïna necessàries per a la transducció de senyals i és un requisit físic per als processos de curvatura, gemmació i fusió de membranes implicats en l'endocitosi, l'exocitosi i el transport intracel·lular. La reorganització lateral també permet l'adaptació cel·

lular a canvis ambientals mitjançant la modulació de la composició lipídica per mantenir la homeoviscositat.

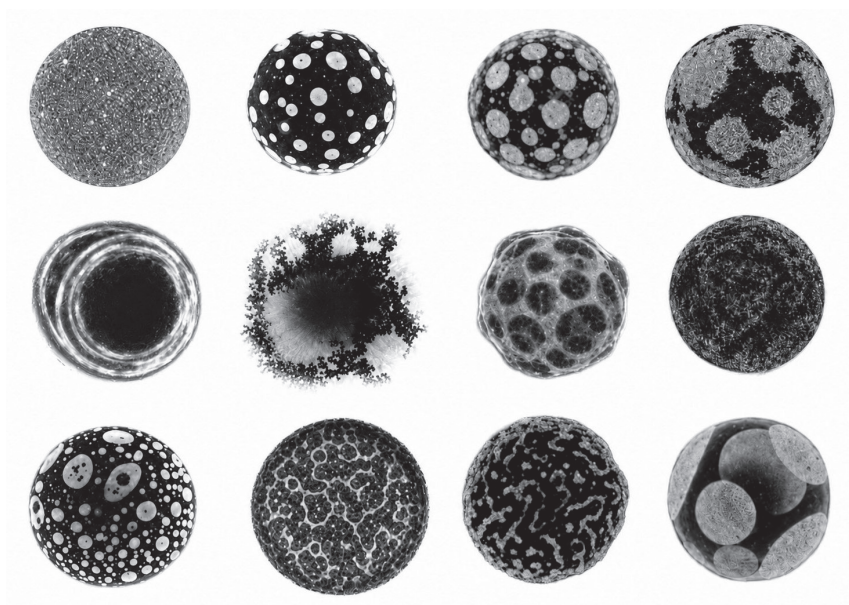


Figura 2-30. Imatges representatives de vesícules lipídiques unilamel·lars gegants (GUVs) amb coexistència de dominis laterals de diferent organització. Les diverses morfologies observades reflecteixen la separació de fases líquides ordenades (Lo) i desordenades (Ld) en membranes ternàries amb colesterol, visualitzades per microscòpia de fluorescència. Adaptat de Veatch SL, Keller SL. *Biophys. J.* 2003; **85**(5): 3074-3083 [72].

Des d'una perspectiva biofísica i biomèdica, la mobilitat lateral dels lípids influeix directament en la interacció de pèptids, proteïnes i fàrmacs amb la membrana.

Molècules bioactives poden alterar la difusió lateral, induir segregació de fases o rigidificar la bicapa, modificant la permeabilitat i l'estabilitat estructural. A més, la reorganització lateral pot afavorir la formació de defectes nanoscòpics que incrementen la permeabilitat o desencadenen processos de permeabilització i lisi, mecanismes rellevants en l'acció de pèptids antimicrobians i en la inhibició de la fusió viral. En membranes cel·lulars, aquest procés no és homogeni sinó espacialment regulat, fet que contribueix a l'organització funcional de la superfície cel·lular.

3. MODELS DE MEMBRANA LIPÍDICA COM A EINES DE CONEIXEMENT

3.1. Antecedents històrics i necessitat de models

Hi ha nombroses referències en la literatura clàssica sobre la manera com l'oli forma una pel·lícula fina sobre l'aigua. Les primeres observacions registrades sobre l'addició d'oli a l'aigua semblen remuntar-se al segle XVIII aC, a Babilònia. Els fenòmens observats quan s'abocava oli dins d'un bol amb aigua eren considerats presagis del futur, i les descripcions dels mateixos, així com dels esdeveniments que anunciaven, es van gravar en tauletes d'argila amb escriptura cuneïforme fets que van ser documentats per Giles i els seus coautors [74]. Uns quants segles més tard, Benjamin Franklin va documentar la primera investigació experimental estudiant les propietats fisicoquímiques dels sistemes lipídics a l'observar com l'abocament de l'oli greixós al mar calmava les ones del mar en dies de turmenta [75]. Tanford també es fa reso de l'experiment de l'estany de Clapham on Franklin va observar com només una culleradeta d'oli podia cobrir una àrea considerable de l'estany, fent que la seva superfície es tornés llisa com un mirall, i va explicar els mecanismes físics de la formació de pel·lícules fines a la interfície aire-aigua. Es pot doncs, considerar que la primera recerca sobre superfícies lipídiques es va iniciar amb mitja membrana o una monocapa (és a dir, una pel·lícula monomolecular formada per lípids en una interfície aire-aigua) molt abans que el concepte de membrana cel·lular fos proposat l'any 1899 per Overton [76].

Langmuir va dur a terme la primera caracterització quantitativa de monocapes [77] a la vegada que es publicava el descobriment de l'estructura ultrafina de la membrana plasmàtica [78]. Ja, dintre de la segona meitat dels segle XX, es van descobrir els liposomes, el primer sistema de bicapa [79]. Aquests avenços van conduir al model extraordinàriament encertat, esmentat abans, del mosaic fluid per a la membrana plasmàtica cel·lular [2] que la descrivia com un medi lipídic homogeni on es trobaven les proteïnes incorporades. Aquest model, es va corregir uns anys més tard en descobrir membranes resistents a detergents, i requeria un model amb estructura lipídica heterogènia

[80]. En la dècada dels 80 es va establir el fenòmen de la separació de fases per pel·lícules lipídiques monomoleculares així com es va preparar pel·lícules lipídiques suportades (SLBs). Aquesta dècada va ser l'edat d'or de la recerca sobre membranes model de lípids purs, quan es va establir el fenomen de separació de fases per a monocapes, i es van preparar per primera vegada bicapas lipídiques suportades [81]. Uns quants anys més tard, es van introduir els vesicles unilamel·lars gegants com a sistema de membrana model, que permetien la investigació microscòpica de vesícules de mida cel·lular [82]. Mentrestant, es va observar la distribució heterogènia dels lípids a la membrana plasmàtica apical en comparació amb la basolateral, fet que va reforçar el concepte d'una estructura de membrana heterogènia [83]. I no va ser fins al 1997 que es va introduir el concepte de *rafts*, proposant dominis funcionals induïts pels lípids [4] que confirmaven la separació de fases, àmpliament estudiada en membranes model reproduint l'heterogeneïtat mediada per lípid rafts [70]. La Figura 2-32 mostra un esquema d'aquesta evolució dels models de membrana des de la monocapa fins a les vesicles amb separació de fases [84].

Un pas important cap a una major rellevància biològica d'aquests models de membrana amb separació de fases va ser l'assoliment de la reconstitució funcional de proteïnes dins d'aquests sistemes [85–86], així com l'observació de la separació de fases líquid-líquid en membranes plasmàtiques aïllades [87–88]

La complexitat de l'estructura de la membrana cel·lular amb la naturalesa dinàmica de les interaccions lípid-lípid i lípid-proteïna comporta una elevada dificultat en l'estudi d'interaccions biofísiques de fàrmacs o sistemes d'alliberament dels mateixos. Ara bé, membranes artificials simplificades [89], imitant la capa lipídica i propietats específiques d'aquesta han estat de gran interès per a dilucidar el rol dels lípids en la interacció de diferents agents amb la membrana.

Els models de membrana han permès estudiar les propietats, estructura i processos que tenen lloc a nivell de membrana així com per investigar l'activitat a la membrana de diversos compostos, tant naturals com sintètics, com per exemple surfactants, pèptids, proteïnes i altres molècules farmacològicament actives en general. Els més coneguts i més comuns d'aquests models són: monocapes de lípids (Langmuir

films), vesícules de lípids (liposomes) i les capes de lípids sobre suports sòlids [90]. Encara que cadascun d'aquests sistemes presenta avantatges i desavantatges, tots ells imiten l'arranjament dels lípids en les membranes naturals.

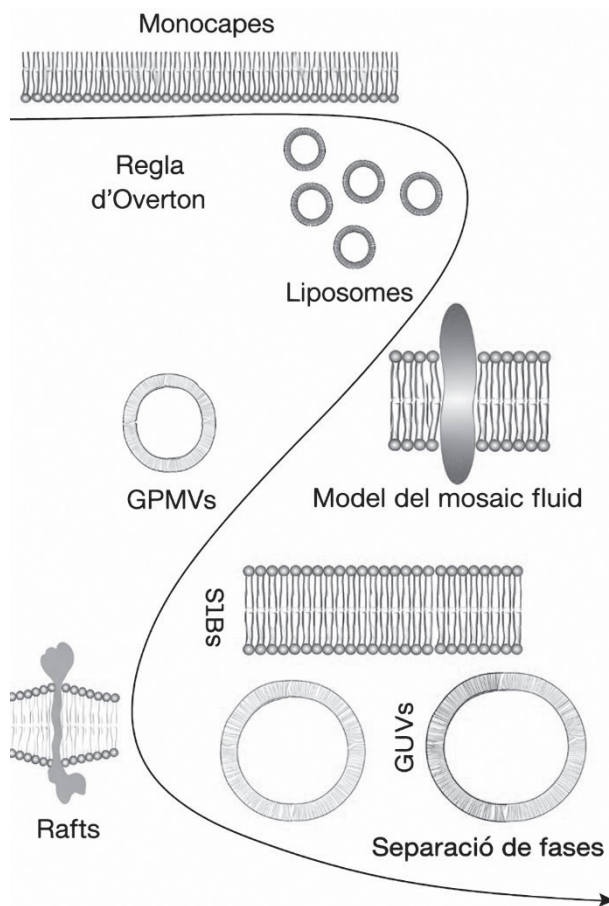


Figura 3-1. Desenvolupament de models de membrana. Adaptat de Sezgin, E., & Schwille, P. *Mol Membr Biol.* 2012; **29**(5):144-154. (Figure 1) [84].

3.2. Tipus de membranes model

Atès que la funció de la membrana deriva del seu procés de formació i estabilització en termes termodinàmics, la definició d'un model de membrana lipídica ha d'incloure, com a mínim, tres aspectes fonamentals: la composició, la dinàmica molecular i el comportament de fase [91].

La composició lipídica és un determinant clau de les propietats físiques de la membrana, fluïdesa, gruix, curvatura i pressió lateral, i condiona les interaccions amb proteïnes i biomolècules, així com processos funcionals com la gemmació i fusió vesicular.

La dinàmica lipídica es descriu mitjançant els coeficients de difusió lateral i rotacional, que determinen el desplaçament de la posició i l'orientació dels lípids dins de cada monocapa. Igualment, es poden produir canvis conformacionals que condueixen o resulten del desplaçament lipídic. Aquesta mobilitat és ràpida, amb escales temporals de l'ordre de picosegons a mil·lisegons. La dinàmica molecular també es manifesta en l'intercanvi de lípids entre les dues monocapes; com que el grup polar ha de travessar l'interior hidrofòbic per arribar a l'altra cara de la membrana, aquest moviment transversal és lent i energèticament costós. Aquest fenomen és relativament comú en el cas del colesterol, però és termodinàmicament desfavorable per als lípids amb més d'un grup hidroxil polar [3].

El comportament de fase és un altre aspecte crític de les membranes. A més de les fases ordenada (gel) i desordenada (líquid), poden coexistir fases parcialment ordenades. La transició entre fases, és a dir, les variacions en l'empaquetament molecular i la fluïdesa, pot conduir o no a la interdigitació, en funció de la concentració llindar de l'agent inductor. La fase de gel interdigitada s'utilitza actualment en la formació de vesícules unilamel·lars, les quals han demostrat ser models de membrana efectius amb nombroses aplicacions pràctiques [12]. A més, el canvi de fase pot ser induït en bicapas lipídiques model mitjançant fenòmens d'agregació superficial associats a reaccions immunològiques o a l'adsorció d'ADN. La segregació de fases s'ha relacionat igualment amb processos de classificació i senyalització de proteïnes, l'autoassemblatge lipídic, la formació de porus i la generació de curvatura de membrana [5, 87, 92].

Diversos formats de models lipídics com les monocapes, les bicapes lipídiques suportades i els liposomes, així com, en un sentit més ampli, altres sistemes mimètics com les micel·les [84], permeten analitzar les propietats fisicoquímiques de les membranes mitjançant un ampli ventall de tècniques experimentals. Aquests sistemes ofereixen entorns controlats, reproductibles i modulables, i per això resulten

especialment útils per estudiar l'organització lipídica, les interaccions entre membranes i molècules bioactives, i la influència de la composició sobre el comportament estructural i dinàmic de la membrana. Tanmateix, cap d'aquests models no reproduïx completament la complexitat de les membranes cel·lulars biològiques; per aquest motiu, cadascun presenta avantatges i limitacions específiques, i pot ajustar-se amb diferents graus de complexitat per aproximar-se de manera més fidel a la realitat biològica [93–96].

3.2.1. Monocapes lipídiques i micel·les

Les monocapes lipídiques són models populars de membranes cel·lulars i inclouen les monocapes de Langmuir (Figura 3-2 A) [97] i les monocapes lipídiques suportades en sòlid (Figura 3-2 B). Les monocapes lipídiques presenten avantatges gràcies a la seva simplicitat i al control precís de l'àrea per molècula a la interfície aire/líquid o aire/sòlid [98]. Aquestes monocapes es poden comprimir per regular millor la seva estructura i estat físic [99–100]. Les monocapes lipídiques suportades en sòlid ofereixen un avantatge respecte a les monocapes no immobilitzades, ja que la immobilització sobre la superfície limita el moviment dels fosfolípids, permetent alhora l'estudi de les interaccions entre fàrmacs i lípids. Aquestes monocapes immobilitzades també constitueixen models més realistes, ja que imiten millor la dinàmica dels fosfolípids a les membranes biològiques [101].

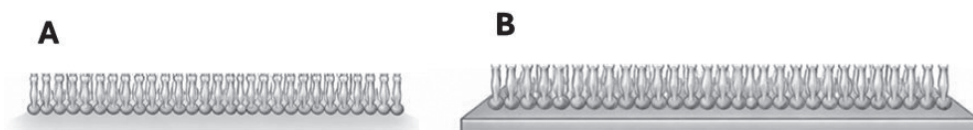


Figura 3-2. Representació esquemàtica de (A) una monocapa lipídica (LM) i (B) monocapa lipídica sobre suport sòlid (LB). *Imatge generada per IA*

Diverses evidències indiquen que és possible establir una relació directa entre la termodinàmica de les membranes monocapa i bicapa i, per tant, sovint es trien models de monocapa més simples per a estudis d'interacció fàrmac-membrana [101]. Tanmateix, les monocapes lipídiques només imiten la capa externa de les membranes cel·lulars. A més, les monocapes són menys estables des del punt de vista termodinàmic que les bicapas lipídiques [102]. Com que aquests models

són representacions 2D de les membranes biològiques (3D), estructures de monocapa tridimensionals com les micel·les podrien oferir un avantatge respecte a les monocapes.

Les micel·les, representades a la Figura 3-3, són el model tridimensional més simple per als estudis d'interaccions entre fàrmacs i membranes [103]. Altres característiques particulars fan de les micel·les eines atractives, com ara la possibilitat de controlar la mida i la forma resultants triant la composició lipídica i el medi aquós [104]. A més, depenent del tipus de molècules amfifíliques seleccionades per a la composició de les micel·les, és possible preparar micel·les amb diferents càrregues superficials per estudiar les forces electrostàtiques implicades en les interaccions fàrmac-membrana [101].

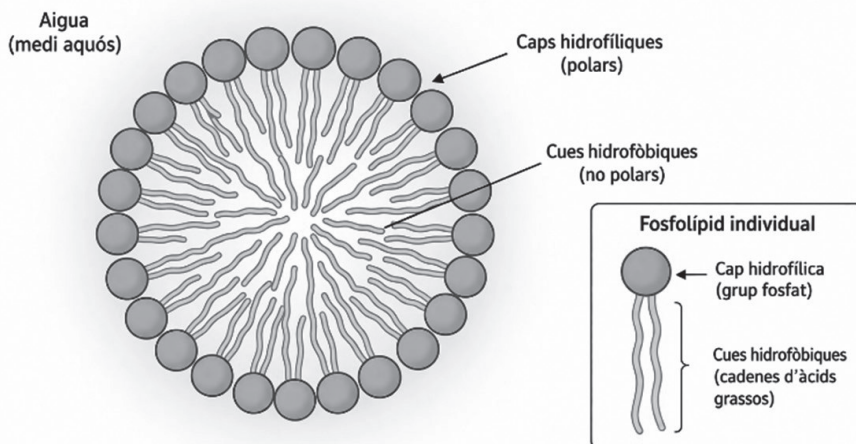


Figura 3-3. Esquema estructural d'una micel·la lipídica. Imatge generada per IA

Tot i que la seva mida relativament petita i l'elevada curvatura s'han assenyalat com a avantatges [103], alguns estudis informen que la curvatura superficial de les micel·les és significativament superior a la de les membranes biològiques [101]. A més, les propietats òptiques de les micel·les no són ideals per a algunes tècniques espectroscòpiques a causa del soroll de fons generat per la llum dispersa. D'altra banda, la partició de petites molècules en micel·les sovint és poc definida [103]. Un altre inconvenient d'utilitzar micel·les com a models biomimètics de membranes és que també estan compostes per una monocapa, en lloc d'una bicapa com passa a les membranes biològiques [101].

Les monocapes de lípids proporcionen un model simple per l'estudi i l'avaluació d'inserció a la membrana de compostos anfipàtics [99, 105]. Aquestes pel·lícules monomoleculares insolubles, també s'anomenen monocapes de Langmuir (LM), es formen mitjançant l'extensió de molècules anfifíliques a la superfície d'un líquid i es pot considerar com la meitat de la bicapa de les membranes biològiques. Aquests sistemes bidimensionals mostren molts avantatges en comparació amb els altres models de membrana. Paràmetres com ara la naturalesa i l'empaquetament de les molècules en la monocapa, la composició de la subfase (pH, força iònica) i la temperatura poden ser variats de manera controlada i sense limitació.

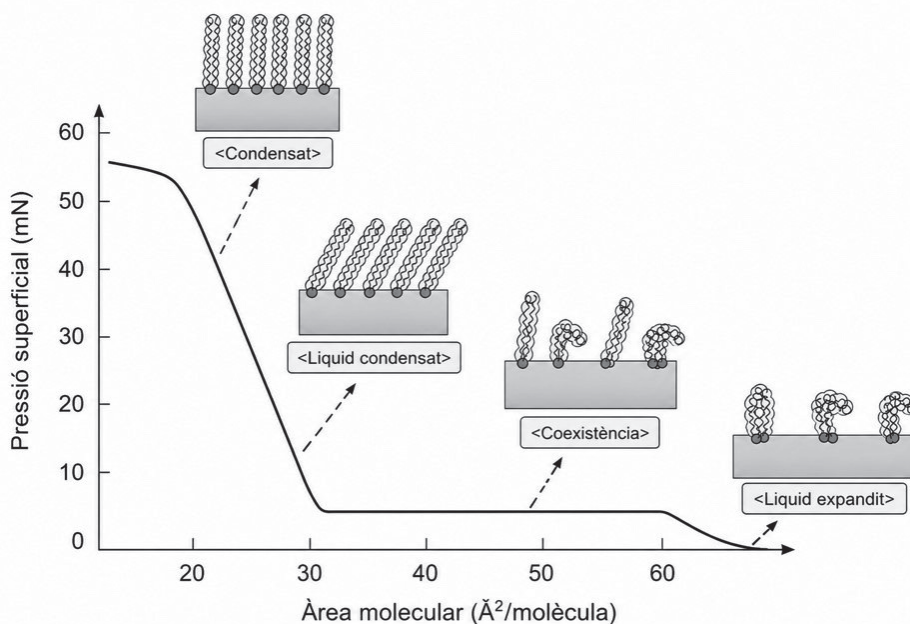


Figura 3-4. Isotherma de compressió de Langmuir i estats d'ordenació d'una monocapa lipídica. Relació entre la pressió superficial (mN) i l'àrea molecular ($\text{\AA}^2/\text{molècula}$) durant la compressió d'una monocapa a la interfície aire/aigua. A mesura que disminueix l'àrea disponible, la monocapa transita des d'un estat líquid expandit (molècules més separades) cap a una regió de coexistència de fases i, finalment, cap a estats líquid condensat/condensat (major empaquetament i ordre de les cadenes hidrocarbonades). Els esquemes superposats representen qualitativament l'organització molecular associada a cada tram de l'isoterma. Adaptada de Eeman M, Deleu M. *Biotechnol Agron Soc Environ.* 2010; **14**(4):719-736 (figura 6) [114].

Les monocapes de lípids són molt útils per a caracteritzar interaccions fàrmac-lípid o lípid-lípid a un nivell molecular. Tal caracterització es pot deduir a partir de les isoterms de compressió (figura 3-4), que s'obtenen mitjançant el mesurament de la pressió superficial (Π) de la pel·lícula interfacial com una funció de la àrea molecular mitjà (A) de les molècules dels compostos repartides en una interfase aire-aigua.

Sota compressió, una monocapa insoluble en dues dimensions adopta diferents estats físics (estat gasós, líquid expandit, líquid condensat i sòlid), que estan relacionats amb el nivell d'ordre conformacional de les molècules en la interfície i de la presència de interaccions intermoleculares dins de la monocapa.

Durant la seva compressió, una monocapa insoluble també es caracteritza pels canvis en termes de compressibilitat de dues dimensions mitjançant el coeficient de compressibilitat (C_s). Aquest paràmetre correspon al pendent de la isoterma de compressió i es pot determinar per a cada punt de la corba pressió/àrea (Π - A). Les interaccions moleculars que ocorren en una interfase aire-aigua entre les molècules de diferent naturalesa poden ser avaluats mitjançant la realització d'una anàlisi termodinàmic senzill. A partir de la isoterma Π - A dels components purs i de les monocapes mixtes, s'obté informació sobre el comportament de l'empaquetament de la barreja de molècules de fosfolípids. Quan l'àrea molecular mitjà d'una monocapa mixta (A_m) a una pressió definida a la superfície correspon a la suma relativa de les àrees moleculars dels components separats (A_1 i A_2) a la mateixa pressió de superfície, el comportament de mescla es defineix com ideals (A^{id}) i segueix l'equació 3-1 [106]. En altres paraules, els components són o bé totalment immiscibles o, idealment, miscibles a la interfície. Qualsevol desviació del comportament ideal es pot atribuir a les interaccions específiques entre els dos compostos [105, 107].

$$A^{id} = X_1 A_1 + (1-X_1) A_2 \quad \text{Equació 3-1}$$

Una anàlisi més detallada de la termodinàmica del sistema, mitjançant el càlcul d'energia lliure d'excés de barreja G^E (equació 3-2) [106,108] pot proporcionar més informació sobre el procés de miscibilitat i les possibles interaccions específiques entre els components interfacials.

$$G^E = \int_0^\Pi A_m d\Pi - X_1 \int_0^\Pi A_1 d\Pi - (1-X_1) \int_0^\Pi A_2 d\Pi \quad \text{Equació 3-2}$$

Els valors positius de G^E signifiquen que les interaccions mútues entre els dos components són més febles que les interaccions entre els propis compostos purs i suggereixen separació de fases entre els components en la interfície. Els valors negatius de G^E indiquen la presència d'interaccions mútues fortes en la interfície i estan a favor de la formació de complexos entre els components de la monocapa [105, 109–110]

Les monocapes de lípids també són excel·lents membranes model per a l'avaluació de la inserció de compostos amfipàtics o amfifílics, com ara els pèptids antimicrobians, biosurfactants i fàrmacs en la membrana de les cèl·lules diana [105, 111–112].

Per a aquest propòsit específic, una monocapa insoluble pot imitar la composició lipídica de la membrana biològica d'interès. Per deposició d'una dissolució de lípids es forma en la interfase aire-aigua d'una cubeta de Langmuir a una pressió determinada (Figura 3-5). Després de l'estabilització de la monocapa de lípids la pressió inicial definida (Π_i), el compost actiu, dissolt en un dissolvent apropiat, s'injecta a la subfase aquosa.

En aquest punt, es registra l'augment de la pressió de la superfície resultant de la interacció del compost actiu amb la monocapa de lípids (Figura 3-5 B). Traçant l'augment de la pressió màxima de la superfície ($\Delta\Pi$) observada com una funció de la pressió inicial de la monocapa lipídica, es determina una pressió superficial d'exclusió (Π_e) (Figura 3-5 C). Aquest paràmetre correspon a la pressió inicial de la monocapa de lípids per sobre de la qual el compost actiu no pot penetrar més en la pel·lícula de lípids i augmentar la pressió de la superfície. En altres paraules, aquest paràmetre reflecteix el poder de penetració del compost actiu d'interès en un model bidimensional de membrana ben definit [113].

Per tal de visualitzar l'organització interfacial de constituents lipídics d'una monocapa o els canvis en el comportament interfacial resultant de la inserció d'un compost d'interès en la monocapa, la tècnica de Langmuir es pot combinar fàcilment amb epifluorescència o micros-

còpia d'angle de Brewster (BAM). Aquesta última tècnica presenta l'avantatge de no utilitzar una sonda fluorescent que pot resultar en el domini de la inestabilitat de monocapes altament comprimides [114–115]. La microscòpia de fluorescència i microscòpia d'angle de Brewster ofereixen una resolució lateral en el rang de micres i per tant no són adequats per a visualitzar les propietats de fase de monocapes de lípids en alta resolució. A aquest efecte, la microscòpia de força atòmica (AFM) és una excel·lent alternativa tècnica de sondeig, ja que permet la visualització de dominis de lípids en les pel·lícules de fases separades amb una resolució d'escala nanomètrica [116–118]. No obstant això, l'ús d'AFM per obtenir imatges de monocapes implica la transferència de la pel·lícula interfacial sobre un suport sòlid.

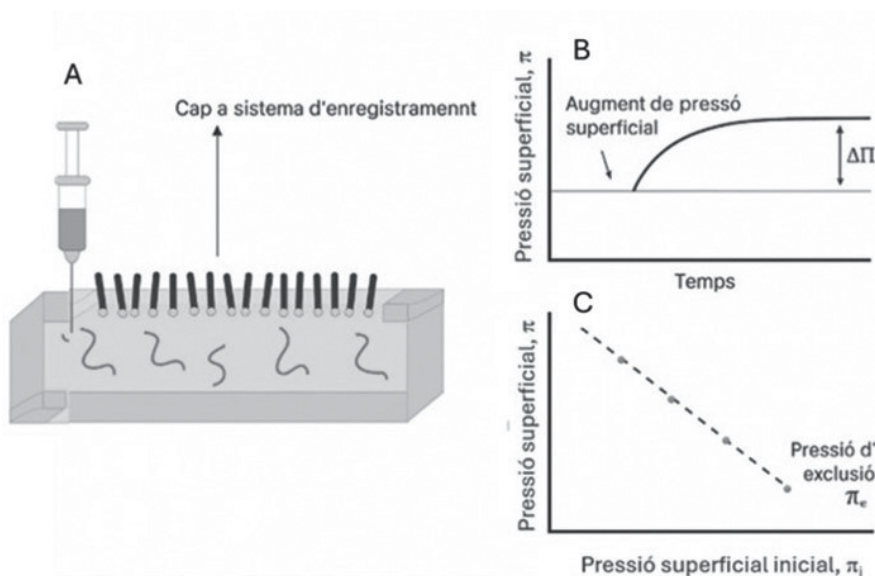


Figura 3-5. (A) Representació esquemàtica de la tècnica de Langmuir utilitzada per avaluar la penetració de compostos biològicament actius en una monocapa de lípids. (B) es registra l'augment de la pressió de la superfície resultant de la interacció del compost actiu amb la monocapa de lípids. (C) Traçant l'augment de la pressió màxima de la superfície ($\Delta\Pi$) observada com una funció de la pressió inicial de la monocapa lipídica, es determina una pressió superficial d'exclusió (Π_e). Adaptada de Eeman M, Deleu M. *Biotechnol Agron Soc Environ.* 2010; **14**(4):719-736 (figura 7) [114].

La tècnica més comuna que s'utilitza per transferir una monocapa és la tècnica de Langmuir – Blodgett (LB) [119]. El suport sòlid pot ser hidròfil o hidròfob. Quan s'utilitza un suport hidròfil, els caps polars de lípids s'enfronten cap al suport (Figura 3-2 B), mentre que la trans-

ferència a un suport hidròfob s'obté a través d'interaccions hidròfobes amb les cadenes d'hidrocarburs de lípids. La transferència d'una pel·lícula interfacial sobre un suport sòlid es realitza a pressió de la superfície constant i es controla a través de l'anomenada relació de transferència. Per tal de mantenir una pressió constant de la superfície durant el procés de transferència, la pel·lícula interfacial es comprimeix contínuament el que resulta en una disminució de la superfície monocapa. La relació de transferència es defineix així com la relació de la disminució de la superfície monocapa a la zona del suport sòlid que ha estat cobert pels constituents de la pel·lícula interfacial. Una relació de transferència prop d'u indica que el procés de deposició ha tingut èxit. No obstant això, cal tenir en compte que, depenent tant de la naturalesa dels constituents de la pel·lícula interfacial i la pressió de la superfície en la qual la monocapa s'ha transferit sobre el suport sòlid, es poden produir canvis en l'organització molecular de la superfície de suport.

La tècnica de cubeta de Langmuir també es pot combinar amb espectroscòpia (per exemple, espectroscòpia infraroja polaritzada), la reflexió i la dispersió (per exemple, el·lipsometria i la incidència de raigs X) tècniques per tal d'obtenir informació estructural directa (és a dir, la conformació i l'orientació dels components de monocapa) en separació de fases en sistemes de dues dimensions i tres dimensions [120].

3.2.2. Bicapes lipídiques

3.2.2.1. Vesícules lipídiques

Si les monocapes ens permeten explorar la interfície i les bicapes suportades ens ofereixen estabilitat i resolució superficial, les vesícules lipídiques —o liposomes— introdueixen una dimensió essencial: la compartimentació. No només reproduïxen l'arquitectura bicapa pròpia de les membranes biològiques, sinó que delimiten un volum aquós intern, recreant així la condició fonamental de la vida: separar un interior d'un exterior.

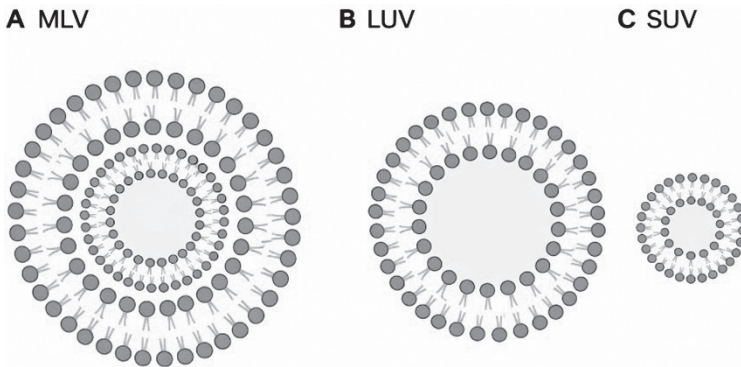


Figura 3-6. Estructura de MLV (A), LUV (B) i SUV (C). MLV: vesícules multilaminars, LUV: vesícules unilaminars grans, SUV: vesícules unilaminars petites. Adaptada de Kim EM, Jeong HJ. Liposomes: biomedical applications. *Chonnam Med J.* 2021; **57**(1):27-35 [121]

Els liposomes es poden classificar principalment en funció de dos atributs fonamentals: la lamel·laritat, és a dir, el nombre de bicapes lipídiques i la mida (Figura 3-6) [121–122]. D’acord amb la lamel·laritat, els liposomes es divideixen en vesícules unilamel·lars, multilamel·lars i oligolamel·lars. Quan una única bicapa separa el compartiment aquós intern de l’extern, es parla de vesícules unilamel·lars. En funció de la seva mida, aquestes es classifiquen en vesícules unilamel·lars petites (SUVs, 20-100 nm), vesícules unilamel·lars grans (LUVs, >100 nm) [123–124]

Quan diverses bicapes concèntriques encapsulen solució aquosa, les vesícules reben el nom de vesícules multilamel·lars (MLVs), habitualment de mida superior a 0,5 μm i amb més de cinc bicapes. Si el nombre de bicapes és reduït, generalment entre dues i cinc, aquestes estructures s’anomenen vesícules oligolamel·lars (OLVs), amb mides aproximades entre 0,1 i 1 μm [125]. En un cas particular, quan una vesícula unilamel·lar encapsula diverses vesícules no concèntriques, es parla de vesícules multivesiculars (MVVs), habitualment de mida superior a 1 μm [125]. Des d’un punt de vista funcional, les LUVs presenten un volum aquós encapsulat relativament més gran que les SUVs i les MLVs, fet que les converteix en el sistema més utilitzat per a la incorporació de molècules hidrofíliques [126]. En canvi, les MLVs resulten especialment adequades per a la incorporació

de molècules hidrofòbiques, atès que disposen de múltiples regions hidrofòbiques corresponents a les diferents bicapes lipídiques [127]. Les GUVs, per la seva banda, s'utilitzen àmpliament com a sistemes model de membrana, ja que la seva mida gran permet la visualització directa mitjançant microscòpia òptica i la micromanipulació de vesícules individuals [128].

Més enllà de la mida i la lamel·laritat, els liposomes també es classifiquen en funció de la composició lipídica i de les seves aplicacions. Els anomenats liposomes convencionals, neutres o carregats negativament, s'utilitzen principalment en recerca bàsica per estudiar l'encapsulació i l'alliberament de fàrmacs o molècules d'interès farmacològic, així com com a models simplificats de membranes cel·lulars [129]. En canvi, els liposomes catiònics són especialment adequats per al lliurament de macromolècules carregades negativament, com ara ADN, ARN o oligonucleòtids [130].

Altres formulacions inclouen els liposomes recoberts amb polímers, com el polietilenglicol (PEG), també anomenats liposomes estabilitzats estèricament, dissenyats per prolongar el temps de circulació sistèmica [6]. De manera complementària, s'han desenvolupat liposomes sensibles al pH, que es desestabilitzen en ambients àcids; liposomes termosensibles, activats per canvis de temperatura; i liposomes funcionalitzats amb lligands, orientats a millorar el direccionament tumoral i la captació intracel·lular [130–132].

Més recentment, diversos estudis han descrit liposomes multifuncionals que integren simultàniament diverses d'aquestes característiques, combinant estabilització estèrica, sensibilitat a estímuls externs i direccionament específic, amb l'objectiu d'optimitzar l'eficàcia terapèutica i la selectivitat del sistema [133–135].

Les vesícules es formen a partir de la dispersió aquosa de lípids de membrana, ja sigui un únic component o mesclades definides. A diferència de les monocapes, que, en la seva simplicitat, no poden reflectir la complexitat estructural d'una membrana cel·lular; els liposomes consisteixen en dues capes lipídiques organitzades de manera anàloga a les membranes biològiques. Les cues hidrocarbonades hidrofòbiques s'orienten cap a l'interior de la bicapa, mentre que els caps

polars hidrofílics contacten amb el medi aquós extern i amb el compartiment intern.

Aquesta arquitectura converteix els liposomes en sistemes extraordinàriament versàtils per estudiar comportament de fase, fusió de membranes, reconeixement molecular, adhesió cel·lular i processos de transferència energètica. Alhora, els ha situat en el centre de nombroses estratègies d'alliberament farmacològic [122] La morfologia final de la vesícula depèn del mètode de preparació [119, 136–138]. Quan una pel·lícula lipídica seca és hidratada vigorosament a temperatures superiors a la transició de fase del lípid, es formen vesícules multilamel·lars (MLV), amb mides compreses entre 0,5 i 10 μm . Aquestes estructures presenten múltiples bicapes concèntriques separades per làmines d'aigua, com una arquitectura en capes successives.

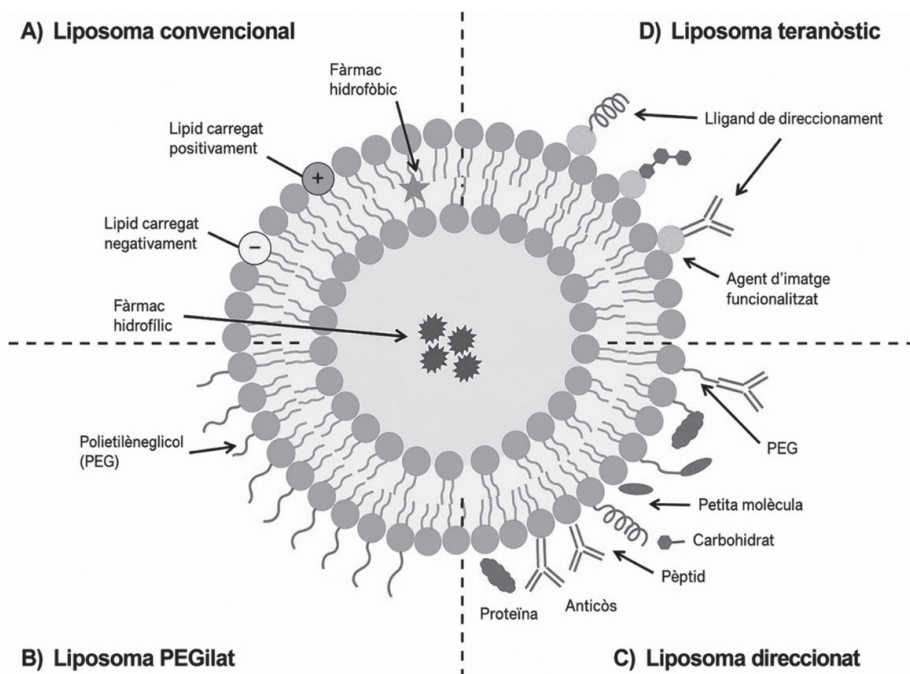


Figura 3-7. Representació esquemàtica dels principals tipus de sistemes liposomals. A: liposomes convencionals, B: liposomes PEGilats, C: liposomes direccionalitzats mitjançant lligands i D: liposomes teranòstics, amb indicació de la possible localització de fàrmacs hidrofílics i hidrofòbics i dels principals elements de funcionalització superficial. Adaptada de *Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. Front Pharmacol.* 2015; 6:28 (figura 1)[141]

La mida de les MLV pot reduir-se mitjançant cicles de congelació–descongelació i homogenització. L'extrusió a través de membranes poroses genera LUVs, mentre que la sonicació en bany o amb sonda dóna lloc a SUVs.

Les vesícules unilamel·lars gegants (GUVs), amb mides entre 5 i 100 μm , poden obtenir-se mitjançant hidratació suau prolongada o per electroformació en presència d'un camp elèctric [139–140]. La seva escala micromètrica permet la visualització directa per microscòpia òptica, de fluorescència o confocal, així com la micromanipulació individual. Encara que aquestes tècniques ofereixen una resolució lateral inferior a la de l'AFM, tenen l'avantatge de permetre l'estudi de vesícules en suspensió, en un entorn tridimensional dinàmic.

L'evolució dels liposomes (Figura 3-7) reflecteix també l'evolució de la recerca biomimètica [141]. Inicialment concebuts com vesícules simples formades per una bicapa lipídica capaç d'encapsular molècules hidrofíliques al seu interior i compostos hidrofòbics dins la bicapa, han esdevingut sistemes sofisticats. La incorporació de lípids polimèrics ha donat lloc als anomenats liposomes ocults, dissenyats per prolongar la circulació sistèmica i millorar l'alliberament controlat de fàrmacs. L'ancoratge de pèptids direccionals permet orientar-los cap a dianes biològiques específiques. Els complexos ADN–liposoma catiònic adopten sovint estructures multilamel·lars tipus ceba, amb l'ADN intercalat entre membranes carregades positivament. Altres desenvolupaments inclouen sistemes basats en cavitands, capaços d'encapsular selectivament molècules de dimensions angstromiques dins cavitats hidrofòbiques.

Aquesta evolució no és merament tecnològica; és conceptual. El liposoma ha passat de ser un model estructural a esdevenir una eina funcional i translacional. En el context de la interacció fàrmac–membrana, les vesícules lipídiques permeten estudiar processos que exigeixen curvatura, tensió superficial i reorganització tridimensional, com la fusió o la permeació, fenòmens que difícilment poden ser reproduïts en sistemes plans. Mentre que l'AFM requereix la fusió prèvia de vesícules sobre un suport sòlid, les vesícules en suspensió ens ofereixen la possibilitat d'observar la dinàmica de la membrana en el seu estat més proper al biològic: una estructura flexible, tancada sobre si matei-

xa, capaç d'adaptar-se, deformar-se i respondre [142].

Així, les vesícules lipídiques no només reproduïxen l'arquitectura de la membrana; en capturen també la seva dimensió essencial, la capacitat de crear un espai interior.

3.2.2.2. *Bicapes lipídiques suportades (SLBs)*

Les bicapes lipídiques suportades (SLBs) (Figura 3-8) constitueixen un dels models biomimètics més robustos per explorar, amb rigor físic i control experimental, la naturalesa de la membrana cel·lular [143]. Es defineixen com una bicapa lipídica plana dipositada sobre un suport sòlid hidrofílic (mica, vidre o òxid de silici) separada habitualment per una capa d'hydratació nanomètrica. En aquesta configuració, els caps polars de la monocapa inferior s'orienten cap al substrat, mentre que les cadenes hidrocarbonades de les dues monocapes s'enfronten al centre hidrofòbic.

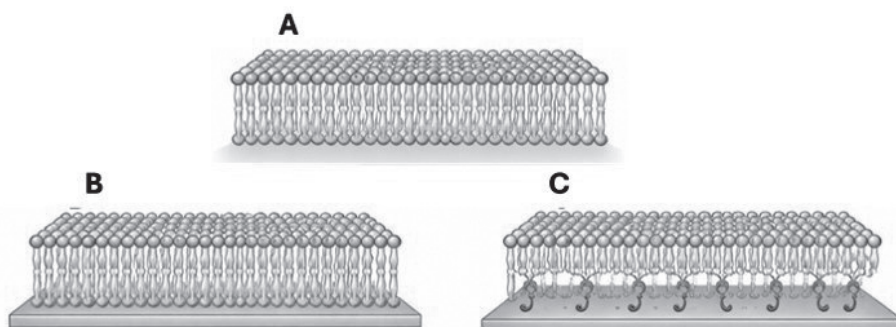


Figura 3–8. Bicapes lipídiques. (A) plana, subfase aquosa (B) lipídica suportada i (C) lipídica lligada. *Imatge generada per IA.*

El confinament geomètric que imposa el suport, lluny de representar una restricció, esdevé un avantatge metodològic: estabilitza la membrana i la fa accessible a tècniques d'anàlisi d'alta resolució.

En comparació amb vesícules lipídiques lliures, les SLBs presenten una estabilitat superior i una elevada reproductibilitat [144–145]. La seva preparació és relativament senzilla i permet un control acurat de

la composició i, fins a cert punt, de l'asimetria lipídica, aspecte difícil d'assolir en sistemes vesiculars. El fet que la membrana resti immobilitzada sobre un suport facilita la seva caracterització mitjançant tècniques sensibles de superfície com la microscòpia de força atòmica (AFM) [146–148], l'espectrometria de masses d'ions secundaris (SIMS) [149] la microscòpia de fluorescència [150], l'el·lipsometria òptica [151], la microbalança de cristall de quars [152], així com la reflectivitat de raigs X [153] i de neutrons [154]. Aquesta convergència instrumental converteix les SLBs en una autèntica plataforma integradora de metodologies biofísiques.

Diverses estratègies permeten la seva obtenció. La transferència Langmuir–Blodgett (LB) es basa en el dipòsit seqüencial de dues monocapes formades a la interfase aire–aigua d'una cubeta de Langmuir sobre un suport sòlid, amb un control precís de la pressió superficial i de l'ordre molecular inicial, també la tècnica de Langmuir-Schaefer (LS) permet obtenir bicapes planes. En el mètode LB, el procés de deposició es produeix retirant o submergint el substrat sòlid perpendicularment a la subfase d'aigua d'una cubeta de Langmuir un cop s'ha assolit la pressió superficial objectiu per a la monocapa a la interfase aire-aigua (Figura 3-9 - A,B) [155]. Per als substrats hidròfils, el substrat normalment es retira de la subfase d'aigua, cosa que fa que els caps polars dels components de la pel·lícula es dipositin a la superfície del substrat. Per a dipositar una segona capa cal reintroduir el substrat a la subfase de la cubeta, cosa que degut a que els fosfolípids, sovint es desprenen durant la deposició de la segona capa, es a dir, es produeix una deposició deficient i un desordre que pot alterar la primera capa. En canvi, la segona capa es pot dipositar eficaçment utilitzant la metodologia LS (Figura 3-9 – C) en horitzontal [156–158].

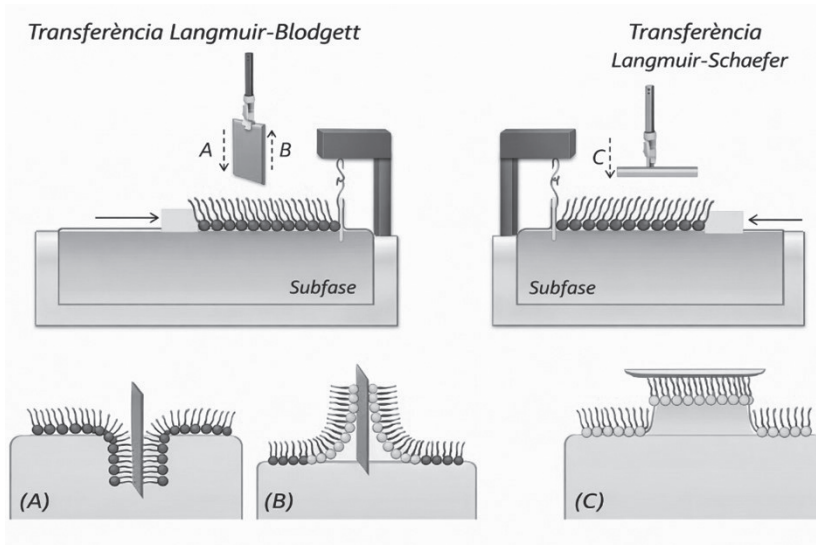


Figura 3-9. Esquema de les metodologies de transferència Langmuir-Blodgett (A,B) i Langmuir-Schaefer (C) per a la preparació de membranes model planes sobre suport sòlid. *Adaptada de Coronado S, Herrera J, Pino MG, Martín S, Ballesteros-Rueda L, Cea P. Advancements in engineering planar model cell membranes: current techniques, applications, and future perspectives. Nanomaterials. 2024; 14(18):1489 [159].*

Un segon mètode, avui probablement el més utilitzat, és la fusió de vesícules unilamel·lars petites (SUVs) adsorbides sobre el suport. (Figura 3-10). Aquest procés implica l'adsorció, deformació, aplanament i ruptura de les vesícules, seguida de la coalescència de dominis fins a formar una bicapa contínua [159–164]. Habitualment es treballa a temperatures superiors a la transició de fase lipídica [147], circumstància que pot limitar la incorporació directa de components termosensibles. Un tercer enfocament es basa en la formació a partir de micelles mixtes de tensioactius i fosfolípids, en què el tensioactiu facilita el transport del lípid fins a la superfície i és posteriorment eliminat mitjançant esbandides successives, permetent la reorganització espontània del fosfolípid en una bicapa estable [164–168].

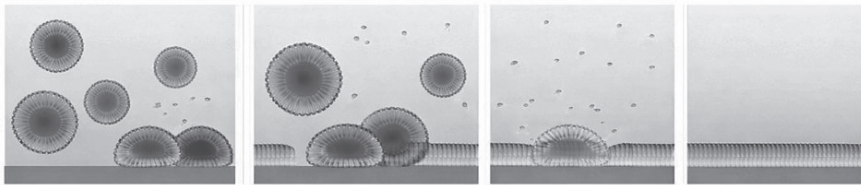


Figura 3-10. Esquema del procés de formació d'una bicapa lipídica suportada per fusió de vesícules sobre una superfície sòlida, incloent-hi les etapes d'adsorció, deformació, ruptura i extensió de la bicapa. *Adaptada de* Jackman JA, Cho N-J. Supported lipid bilayer formation: beyond vesicle fusion. *Langmuir*. 2020; **36**(6):1387–1400 (*Figura 1*) [164]

Des de la seva introducció com a model biomimètic [91,169], les SLBs han estat àmpliament emprades per estudiar comportament de fase, segregació lateral i organització molecular de membranes biològiques. Progressivament, però, han adquirit un paper central en l'àmbit farmacèutic, especialment en l'anàlisi de les interaccions fàrmac-membrana i en la correlació amb propietats farmacocinètiques [170]. En aquest context, les SLBs permeten relacionar inserció molecular, canvis en l'ordre lipídic i reorganització lateral amb dades funcionals obtingudes mitjançant tècniques complementàries. La membrana deixa així de ser un simple escenari passiu per revelar-se com un sistema cooperatiu que pot modular l'activitat terapèutica.

No obstant això, la proximitat entre la bicapa i el substrat sòlid pot afectar la mobilitat lateral o dificultar la incorporació funcional de proteïnes transmembrana. Per superar aquesta limitació, s'han desenvolupat bicapes suportades lligades, en què la membrana es separa del suport mitjançant molècules espaciadores o capes polimèriques [171]. Aquestes estratègies que inclouen la modificació química del substrat, l'autoassemblatge de lípids funcionalitzats o la fusió de vesícules que incorporen lípids espaciadors, generen un microentorn més proper a la condició cel·lular nativa i permeten la reconstitució funcional de receptors i proteïnes de membrana en condicions no desnaturalitzants. Les seves aplicacions, en expansió constant [172] obren la porta al disseny de biosensors i a noves aproximacions en diagnòstic i desenvolupament farmacèutic [172].

En definitiva, les bicapes lipídiques suportades sintetitzen estabili-

tat experimental i fidelitat biomimètica. En el marc d'aquest discurs, simbolitzen la voluntat de comprendre la membrana no com una frontera inert, sinó com una interfície activa on la matèria lipídica dialoga amb la molècula terapèutica i en condiciona, en bona mesura, el destí biològic.

3.2.2.3. Nanodiscs

Un nanodisc és un sistema de membrana sintètic desenvolupat per a l'estudi de proteïnes de membrana. Està format per un disc de bicapa de fosfolípids, similar a les membranes que delimiten les cèl·lules vives. Les parts hidròfobes dels lípids de la bicapa queden protegides per proteïnes amfipàtiques, que estableixen l'estructura. Aquestes proteïnes es coneixen com a proteïnes bastida de membrana.

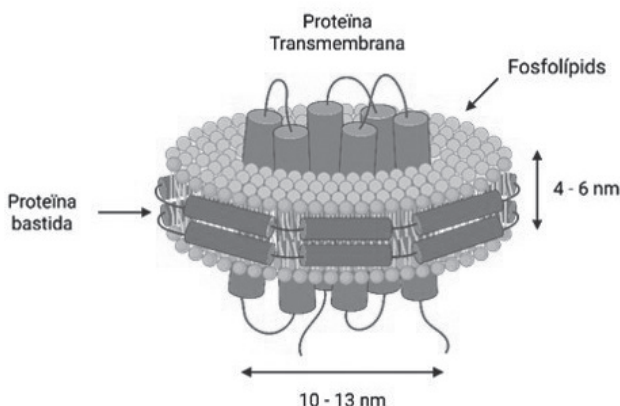


Figura 3-11. Un Nanodisc típic conté una sola proteïna de membrana, dues proteïnes de bastida (MSP), i aproximadament 130 fosfolípids com ara palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (POPC). L'espessor de la Nanodisc ve determinat principalment per l'elecció del component fosfolipídic. El diàmetre depén principalment per l'elecció de la MSP. MSP1D1 i MSP1E3D1 per exemple, poden generar nanodiscs d'aproximadament 10,6 nm i 12,9 nm de diàmetre, respectivament. Imatge generada in BioRender. <https://BioRender.com/0oisq0o>.

Quan es preparen correctament, els nanodiscs poden autoassemblar-se al voltant d'una proteïna de membrana, fet que permet estudiar *in vitro* aquestes proteïnes en un entorn semblant al de la membrana i en el seu estat actiu.

Els nanodiscs han estat optimitzats, promoguts i caracteritzats al laboratori de Stephen G. Sligar, a la Universitat d'Illinois a Urbana-Champaign. La figura 3-11 mostra l'esquema d'un nanodisc típic, que conté una sola proteïna de membrana, dues proteïnes bastida de membrana (MSP, de l'anglès *membrane scaffold proteins*) i aproximadament 130 fosfolípids, com ara la palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (POPC). El gruix del nanodisc ve determinat principalment pel tipus de fosfolípid emprat, mentre que el diàmetre depèn sobretot de la proteïna bastida seleccionada.

3.2.3. Models de membrana “*in silico*”

Al costat dels models experimentals, els models de membrana lipídica *in silico* han obert una nova manera d'interrogar la membrana: no ja només com una estructura que s'observa, sinó com un sistema dinàmic que pot ser analitzat a escala molecular i temporal. En aquest context, la dinàmica molecular [173] s'ha convertit en una mena de microscopi computacional que permet seguir l'organització, el moviment i les interaccions dels components de la bicapa amb diferents nivells de resolució. Els models atomístics descriuen explícitament tots els àtoms i resulten especialment valuosos quan es vol examinar amb detall la hidratació, l'orientació o els contactes específics d'un lípid, un pèptid o un fàrmac; els models *coarse-grained*, en canvi, agrupen diversos àtoms en unitats efectives i permeten accedir a escales de temps i de longitud molt més grans, indispensables per estudiar heterogeneïtat lateral, curvatura, deformació i processos de remodelatge membranari. A una resolució encara més reduïda, els enfocaments continus o implícits permeten abordar propietats mecàniques i electrostàtiques de sistemes massa extensos o massa lents per a una descripció plenament atomística [174].

Des de la perspectiva del desenvolupament de fàrmacs, aquests models no substitueixen els sistemes experimentals, però els complementen de manera extraordinàriament fecunda, perquè permeten calcular perfils d'energia lliure d'inserció i translocació, identificar regions preferents de partició dins la bicapa, estimar coeficients de permeabilitat i descriure com una molècula altera l'ordre, l'espessor o la dinàmica de la membrana. Mètodes com *l'umbrella sampling*

[175], la metadinàmica o altres estratègies de mostreig millorat han fet possible quantificar processos de permeació i comparar compostos de naturalesa molt diversa en membranes model. Així, el valor dels models *in silico* no rau només en la seva capacitat predictiva, sinó també en el fet que connecten estructura molecular, termodinàmica i funció, i estableixen un pont especialment valuós entre els models simplificats de membrana i la complexitat de la membrana cel·lular real [176].

4. TÈCNiques BIOFÍSiques D'ANÀLISI

L'estudi de les interaccions entre fàrmacs i membranes biològiques requereix aproximacions experimentals capaces de descriure el sistema a múltiples escales espacials i temporals. Les membranes constitueixen estructures dinàmiques i heterogènies, caracteritzades per dominis laterals, transicions de fase, propietats mecàniques específiques i processos d'interacció molecular que no poden ser capturats mitjançant una única metodologia. En aquest context, la biofísica de membranes ha desenvolupat un ampli ventall d'eines experimentals que permeten analitzar la topografia, l'ordre molecular, la dinàmica lipídica i les propietats termodinàmiques de la bicapa, així com la seva resposta a la incorporació de pèptids, proteïnes o fàrmacs.

Les tècniques descrites a continuació constitueixen una selecció de les aproximacions biofísiques més utilitzades i informatives en l'estudi de membranes model i de les interaccions fàrmac–membrana. La seva elecció respon a la seva capacitat per proporcionar informació complementària sobre l'organització estructural, les propietats mecàniques i el comportament termodinàmic de la bicapa. Tanmateix, aquest conjunt metodològic no és exhaustiu, i sovint s'integra amb altres tècniques per obtenir una visió global del sistema.

4.1. Microscòpia de força atòmica (AFM)

La microscòpia de força atòmica (AFM) s'ha consolidat com una eina fonamental per a la caracterització nanoscòpica de membranes model. Aquesta tècnica permet visualitzar la topografia superficial amb resolució nanomètrica i obtenir simultàniament informació sobre les propietats nanomecàniques del sistema.

En biofísica de membranes, l'AFM ha estat àmpliament utilitzada per descriure l'organització lateral de bicapes lipídiques suportades i la coexistència de dominis de fase líquid-ordenat i líquid-desordenat, així com per mesurar el gruix i la rugositat de membranes model. La tècnica resulta especialment valuosa per estudiar la interacció de pèptids, proteïnes i fàrmacs amb membranes, ja que permet detectar processos de permeabilització, formació de defectes, fusió o desesta-

bilització membranària i avaluar canvis en les propietats nanomecàniques associades a l'ordre lipídic [177–179].

4.2. Tècniques de fluorescència

Les tècniques basades en fluorescència constitueixen eines d'alta sensibilitat per estudiar l'organització i la dinàmica de membranes a escala nanomètrica. Entre aquestes, la transferència d'energia per ressonància de fluorescència (FRET) destaca per la seva capacitat de detectar interaccions moleculars en un rang de distàncies d'entre 1 i 10 nm.

Aquestes aproximacions permeten monitoritzar canvis en la fluïdesa mitjançant anisotropia de sondes lipídiques, la segregació de fases, la distribució de fàrmacs dins la bicapa i la inhibició de processos de fusió. En particular, els assajos FRET entre fluoròfors lipídics s'han convertit en eines essencials per estudiar mecanismes de fusió viral i per avaluar l'activitat de pèptids antivirals o molècules que interfereixen en aquests processos [180–182]

4.3. Calorimetria diferencial d'escombratge (DSC)

La calorimetria diferencial d'escombratge (DSC) és una eina essencial per analitzar el comportament termotròpic de membranes lipídiques i la seva resposta a la incorporació de molècules bioactives. Aquesta tècnica permet caracteritzar les transicions de fase lipídica i obtenir paràmetres quantitius com la temperatura de transició (T_m), l'entalpia associada i la cooperativitat del procés.

La incorporació de colesterol, fàrmacs o pèptids pot modificar aquests paràmetres, reflectint processos d'inserció, rigidificació o desestabilització de la bicapa. Tot i proporcionar informació termodinàmica precisa, la DSC no ofereix dades estructurals directes i requereix la combinació amb altres tècniques biofísiques [183–185]

4.4. Ressonància magnètica nuclear (RMN) i ressonància paramagnètica electrònica (EPR)

Les tècniques espectroscòpiques com la RMN i l'EPR aporten informació detallada sobre l'ordre molecular, la dinàmica lipídica i l'orientació de molècules dins la bicapa. La RMN d'estat sòlid permet analitzar l'ordre i la mobilitat de les cadenes acíliques i la profunditat d'inserció de fàrmacs i pèptids, mentre que l'EPR, mitjançant sondes paramagnètiques, permet estudiar la mobilitat i l'ordre local a diferents profunditats de la membrana [186–188].

4.5. Altres tècniques complementàries

L'estudi biofísic de membranes es beneficia també d'altres tècniques que aporten informació estructural, dinàmica i funcional addicional. Les tècniques de difracció i reflectivitat de raigs X i neutrons permeten determinar l'estructura lamel·lar i el gruix de la bicapa [189–190]. La microscòpia confocal i les tècniques de superresolució permeten visualitzar dominis lipídics i processos dinàmics en membranes vives amb resolució subdifractiva [191–192]. La tensiometria de monocapes de Langmuir permet analitzar propietats interfacials i interaccions lípid-fàrmac [193–194]. La dispersió dinàmica de la llum i la microscòpia electrònica són eines clau per caracteritzar vesícules i sistemes liposomals [195–196]. La microbalança de cristall de quars amb dissipació permet monitoritzar processos d'adsorció i propietats viscoelàstiques de capes lipídiques suportades [197–198], mentre que la calorimetria isotèrmica de titulació (ITC) proporciona informació termodinàmica directa sobre interaccions moleculars [199].

En conjunt, amb aquestes tècniques es permet obtenir una descripció multiescalar i integrada dels sistemes membranosos i dels mecanismes d'interacció amb molècules bioactives. Aquesta visió integrada resulta essencial per interpretar els mecanismes d'acció dels fàrmacs i per dissenyar noves estratègies terapèutiques dirigides a la interfície membranosa.

5. LA MEMBRANA COM A DIANA BIIOFÍSICA: APLICACIONS A LA RECERCA FARMACÈUTICA

Després d'haver considerat els principals models biomimètics que permeten aproximar-nos experimentalment a l'organització i dinàmica de les membranes biològiques, és necessari abordar les bases fisicoquímiques que governen la interacció dels fàrmacs amb aquesta interfície essencial. Lluny de constituir un medi passiu, la membrana cel·lular és un sistema estructuralment complex i funcionalment actiu que condiciona la distribució, l'activitat i la toxicitat dels compostos exògens. En conseqüència, l'eficàcia terapèutica i la seguretat farmacològica no depenen únicament de la interacció del fàrmac amb la seva diana molecular, sinó també del diàleg fisicoquímic que estableix amb l'entorn lipídic que l'acull [200].

5.1. interacció de molècules amb activitat farmacològica

5.1.1. Bases fisicoquímiques de la interacció

La interacció d'un fàrmac amb una membrana [201] no és un episodi accessori, sinó una etapa fisicoquímica que sovint determina, abans que cap receptor entri en joc, quina fracció del fàrmac arribarà a la diana, amb quina velocitat i en quin microentorn. En aquest sentit, la membrana funciona com una fase material pròpia, amb propietats col·lectives (ordre, elasticitat, potencials interfacials) que modulen l'energia lliure d'inserció i el camí de permeació. De fet, en nombrosos sistemes s'ha mostrat que la bicapa no és un simple passadís inert, sinó un mediador actiu, el fàrmac pot particionar primer a la membrana, concentrar-s'hi i, des d'allí, trobar proteïnes associades o llocs d'unió intramembrana amb una eficiència que seria inexplicable si només consideréssim el volum aquós [202].

El primer llenguatge per descriure aquest procés és termodinàmic, distribució i energia lliure. Quan una molècula es trasllada del medi aquós cap a la interfície lipídica, paga la deshidratació de grups polars i cobra estabilització hidrofòbica i forces de dispersió dins del medi apolar. Aquesta balança explica per què descriptors com la lipofilitat ($\log P/\log D$) són tan influents, però també per què no són

suficients. La interfície aigua–membrana no és un límit geomètric, sinó una regió estratificada on l'aigua està orientada, els caps polars estan hidratats i existeix un gradient de polaritat continu. Això genera mínims locals d'energia lliure on molts fàrmacs s'ancoren preferentment en una zona de compromís interfacial que actua com a reservori i plataforma de difusió lateral, ni totalment en aigua ni totalment al nucli hidrofòbic. Aquesta idea, central en la visió de membrana com a mediador, és especialment útil per entendre per què canvis relativament petits de composició lipídica o d'estat físic poden produir grans canvis farmacològics sense alterar la diana proteica [202].

El segon llenguatge és el de l'ionització. La majoria de fàrmacs clínics són àcids o bases febles i, per tant, coexisteixen en formes neutres i carregades, amb afinitats i permeabilitats molt diferents. La forma neutra, en general, travessa millor el nucli hidrofòbic; la forma carregada interactua amb caps polars, aigua interfacial i camps elèctrics [203]. Però el punt crític i sovint simplificat, és que la permeació de molècules ionitzables no depèn només de l'equilibri d'ionització, sinó també de les cinètiques de protonació i desprotonació a la interfície. Si aquests canvis d'estat són lents en l'escala temporal del pas transmembrana, el dogma que la molècula es neutralitza oportunament per travessar pot fallar, i el procés queda governat per camins cinètics més complexos que un simple balanç de fraccions. Aquesta perspectiva, desenvolupada amb models i anàlisi quantitativa, reforça que la permeació és simultàniament un problema d'energia lliure i de temps [203].

A aquesta arquitectura termodinàmica i cinètica s'hi sobreposa la física dels camps. La membrana presenta una càrrega superficial efectiva, especialment quan conté lípids aniònics, i una doble capa iònica; abans d'inserir-se, moltes molècules són seleccionades per càrrega a distància curta com atracció per a cations amfifílics, repulsió per a anions o apantallament modulable per força iònica. La seqüència típica és adsorció, reorganització interfacial i, a concentracions suficients, alteració estructural. En l'àmbit antibiòtic, la polimixina B és un exemple paradigmàtic, s'ha descrit com indueix agregació del lipopolisacàrid (LPS) i canvia el potencial zeta i la càrrega efectiva de sistemes model, amb una interacció especialment intensa en membranes més negatives; a concentracions altes, aquesta ruta pot culminar

en permeabilització. El que aquí importa, fisicoquímicament, és que el mecanisme s'inicia com una interacció de superfície governada per càrrega i apantallament abans de convertir-se en un efecte funcional sobre la barrera [204].

Hi ha, però, un altre camp menys evident i sovint més determinant que la càrrega neta: el potencial dipolar. La interfície lipídica conté dipols alineats (caps polars i aigua interfacial) que creen un potencial elèctric intern elevat, capaç d'afectar l'energia d'inserció, l'orientació de grups polars i l'afinitat de molècules amfífliques. En conseqüència, components com el colesterol que reordena la interfície i compacte la monocapa/bicapa poden modificar el potencial dipolar i, indirectament, alterar la preferència d'un fàrmac per quedar-se a la interfície, penetrar més endins o redistribuir-se. La implicació conceptual és clara, la membrana no només ofereix una polaritat diferent; ofereix també un paisatge elèctric intern que descriu condicions d'adsorció i inserció [205].

Tot això ocorre sobre un material que no és homogeni. La bicapa pot ser més ordenada o més fluida, més gruixuda o més prima, més compressible o més rígida; pot exhibir heterogeneïtats laterals i dominis. Aquest estat físic importa perquè canvia la facilitat amb què una molècula genera defectes locals, s'insereix entre cadenes acíliques, o difon lateralment. En molts casos, la interacció és bidireccional: el fàrmac no només llegeix la membrana, sinó que la reescriu, modulant empaquetament, permeabilitat i propietats mecàniques. Aquí apareix una de les connexions més potents amb la farmàcia: part de la toxicitat i de certs efectes fora diana poden entendre's com una conseqüència emergent d'aquesta reescriptura fisicoquímica del medi lipídic, especialment quan el fàrmac és amfíflic i es pot acumular a la interfície.

Els agents antiinflamatoris no esteroïdics (AINEs) ofereixen un exemple clínicament revelador d'aquesta lògica. Més enllà de la inhibició enzimàtica de la ciclooxigenasa (COX), s'ha caracteritzat que diversos AINEs poden associar-se de manera reversible i no covalent amb fosfolípids, especialment fosfatidilcolina, combinant contribucions iòniques i hidrofòbiques. Aquesta associació pot comprometre propietats de barrera i hidrofobicitat superficial en determinats contextos

fisiològics, oferint una lectura fisicoquímica complementària de dany a les mucoses, no és només inhibició de prostaglandines, sinó també alteració de la interfície lipídica que protegeix [206].

La relació entre propietats fisicoquímiques i destí cel·lular es fa encara més evident quan considerem l'acumulació en compartiments. Les bases febles lipofíliques poden travessar membranes en la forma neutra i quedar atrapades quan es protonen en compartiments àcids, com els lisosomes; aquest entrapament pot generar acumulacions massives i cinètiques de sortida lentes, amb impacte en distribució, durada d'acció i efectes adversos. Aquesta és una demostració elegant que, de vegades, el destí farmacològic ve determinat no per una diana, sinó per una combinació de pKa, lipofilitat i gradients de pH compartimental [207]. En el mateix eix conceptual s'inscriu la fosfolipidosi induïda per fàrmacs catiònics amfifílics: certes signatures estructurals afavoreixen acumulació i alteracions lisosomals amb formació de cossos lamel·lars, un fenomen on la fisicoquímica de membrana i el metabolisme lipídic convergeixen amb conseqüències toxicològiques [208].

Finalment, quan volem quantificar aquesta interacció, cal recordar que les mesures de permeabilitat i partició depenen del model, i que permeabilitat sovint és una propietat aparent que incorpora resistències addicionals (capes límit, geometria, absència de transportadors, etc.). D'aquí l'interès i, alhora, la prudència necessària en l'ús de membranes artificials immobilitzades i altres plataformes biomimètiques per predir absorció intestinal i comportament de compostos, encara que són eines extraordinàries per comparar i racionalitzar, cal interpretar-les com a aproximacions controlades a una interfície viva més complexa [209].

Així, les **bases fisicoquímiques** de la interacció fàrmac–membrana es poden resumir com una gramàtica de frontera: distribució i energia lliure, ionització i cinètica, camps electrostàtics i potencial dipolar, estat físic i mecànic del lípid, i conseqüències de compartimentació i acumulació. La membrana, lluny de ser un simple teló de fons, és una interfície que filtra, amplifica o esmorteix l'acció farmacològica; i entendre-la com a material tou amb electricitat i estructura i dinàmica és, sovint, el pas que transforma una explicació química en una explicació farmacològica.

5.1.2. Significança farmacèutica

La major part de molècules farmacològicament actives presenten caràcter amfifílic, fet que determina una afinitat intrínseca pels entorns lipídics. Aquesta propietat governa la seva distribució entre medis aquosos i membranes i en determina la capacitat d'inserir-se dins la bicapa lipídica. La lipofilitat, sovint expressada mitjançant el coeficient de partició octanol-aigua, ha estat utilitzada com a indicador empíric de permeabilitat d'acord amb la regla d'Overton [76]; tanmateix, el comportament real dels fàrmacs depèn també del seu estat d'ionització, descrit amb més precisió per la funció de distribució, dependent del pH del medi [210]. Un cop associat a la membrana, el fàrmac pot localitzar-se a diferents profunditats de la bicapa, des de la regió interfacial polar fins al nucli hidrofòbic, i aquesta posició condiona la seva orientació, mobilitat i capacitat d'alterar l'ordre lipídic [211–213].

A banda de les interaccions hidrofòbiques, les electrostàtiques entre molècules carregades i els caps polars dels fosfolípids poden afavorir l'adsorció superficial i l'acumulació local de fàrmacs, especialment en membranes riques en lípids aniònics. Aquestes interaccions, juntament amb forces de Van der Waals i ponts d'hidrogen, contribueixen a l'estabilització del fàrmac a la interfície membrana-medi aquós [109]. La incorporació de compostos amfifílics pot modificar propietats físiques essencials de la membrana, com la fluïdesa [214–217], el gruix [101, 201] la tensió lateral [201, 218] o la curvatura [201, 218–219], alterant l'estat d'ordre lipídic i modulant processos biològics dependents de l'estructura de la bicapa. Aquestes modificacions poden influir en la funció de proteïnes integrals, en els processos de fusió i endocitosi i en la permeabilitat selectiva de la membrana. En determinats casos, l'alteració de les propietats mecàniques de la bicapa constitueix el mecanisme d'acció farmacològica, com ocorre amb alguns pèptids antivirals o antimicrobians [220–222] que interfereixen en processos de fusió de membranes.

Quan els compostos amfifílics assoleixen concentracions elevades, especialment aquells amb propietats tensioactives, poden exercir efectes solubilitzadors similars als dels detergents, provocant permeabilització, fuites cel·lulars o desorganització de la bicapa lipídica.

Aquest fenomen pot tenir utilitat terapèutica en contextos específics, però també pot conduir a citotoxicitat si no és selectiu [223].

El destí intracel·lular dels fàrmacs està igualment condicionat per fenòmens d'acumulació i segrest. Bases febles i compostos amfífils poden travessar la membrana en forma neutra i ionitzar-se posteriorment en compartiments àcids com els lisosomes, on queden atrapats i poden assolir concentracions elevades capaces d'alterar l'homeòstasi cel·lular i induir fenòmens com la fosfolipidosi [224]. Paral·lelament, la lipofilitat afavoreix l'associació inespecífica amb dominis lipídics, fet que pot reduir la biodisponibilitat efectiva del fàrmac o, en alguns casos, generar acumulacions potencialment tòxiques; no obstant això, aquesta mateixa associació pot actuar com un reservori lipídic que permet un alliberament sostingut del compost.

Més enllà dels processos generals de distribució i permeació, la interacció dels fàrmacs amb les membranes pot donar lloc a efectes biofísics i bioquímics que condicionen profundament tant l'eficàcia terapèutica com la toxicitat. La membrana no actua únicament com a barrera selectiva, sinó com un entorn molecular altament organitzat capaç d'establir interaccions específiques amb lípids i proteïnes que poden modificar l'arquitectura i la funció cel·lular [101].

Determinats compostos mostren preferència per microdominis lipídics enriquits en colesterol i esfingolípid, la qual cosa pot alterar l'organització lateral de la membrana i la distribució funcional de proteïnes associades. L'amfotericina B, per exemple, s'uneix preferentment a l'ergosterol de membranes fúngiques i forma porus transmembrana que alteren la permeabilitat cel·lular [225]. De manera similar, agents antitumorals com la doxorubicina poden redistribuir-se en dominis rics en colesterol i alterar la dinàmica lateral de la membrana [226]. També s'ha observat que l'anestèsic general propofol modula l'ordre lipídic en membranes riques en colesterol, fet que contribueix a la seva acció farmacològica [227–228].

La interacció selectiva amb fosfolípids aniònics constitueix un altre mecanisme rellevant. Antibiótics lipopeptídics com la daptomicina s'associen selectivament amb membranes bacterianes riques en fosfatidilglicerol, provocant despolarització i mort cel·lular [229]. Igual-

ment, la cardiolipina mitocondrial pot actuar com a diana involuntària de fàrmacs, contribuint a toxicitat mitocondrial; per exemple, l'antifúngic ketoconazol i alguns antineoplàsics poden alterar membranes mitocondrials mitjançant interacció amb aquest lípid essencial [230].

Les membranes actuen també com a mediadores d'interaccions indirectes entre fàrmacs i proteïnes [201]. L'alteració del gruix de la bicapa o de la tensió lateral pot modular l'activitat de proteïnes sensibles al seu entorn lipídic. S'ha demostrat que anestèsics volàtils [231] com l'isoflurà modifiquen l'activitat de canals iònics neuronals mitjançant canvis en les propietats físiques de la bicapa més que per unió directa a la proteïna [232]. De manera similar, l'etanol pot alterar la funció de receptors GABA A a través de la fluidificació de la membrana neuronal [233].

Els pèptids bioactius constitueixen un cas paradigmàtic d'interacció específica amb membranes. Pèptids antimicrobians com la magainina i la melitina s'adsorbeixen electrostàticament a membranes bacterianes, s'insereixen parcialment i formen porus transitoris que comprometen la integritat cel·lular [234–235]. En l'àmbit antiviral, la inhibició de la fusió viral representa una estratègia terapèutica d'especial rellevància. L'enfuvirtida (T-20), un pèptid derivat de la proteïna gp41 del VIH, impedeix la formació del feix de sis hèlixs necessari per a la fusió de membranes viral i cel·lular [236] al seu torn el lenacapavir, inhibeix el cicle de vida del HIV-1 [237]. Altres pèptids inhibidors de fusió actuen modulant l'entorn lipídic; per exemple, pèptids derivats del GB virus C poden rigidificar la bicapa i impedir la formació d'intermediaris fusogènics en el cas del virus HIV [222, 238–239]. En virus amb embolcall com el de la grip, s'ha demostrat que l'alteració de la curvatura i de l'ordre lipídic de la membrana pot inhibir la fusió mediada per l'hemaglutinina [240]. Estudis recents indiquen igualment que pèptids i compostos lipofílics poden interferir en la fusió de coronavirus modulant la curvatura i la tensió lateral de la bicapa [241].

Altres molècules bioactives modulen l'entorn lipídic mitjançant inserció hidrofòbica. El resveratrol, per exemple, s'intercala entre les cadenes hidrocarbonades dels lípids i modifica la microviscositat de la membrana [242], mentre que derivats oxisteròlics poden alte-

rar l'ordre lipídic i la permeabilitat [243]. Alguns AINEs, com el diclofenac, s'insereixen a la interfície lipídica i modifiquen l'ordre molecular i la permeabilitat de la bicapa [244] i pèptids derivats de la laminina interaccionen amb membranes degut al seu caràcter hidrofòbic [245–246].

Des d'una perspectiva toxicològica, les interaccions prolongades amb membranes poden desencadenar respostes adverses. L'acumulació lisosomal de compostos amfifílics catiònics (CADs) pot conduir a fosfolipidosi, com s'ha descrit per a l'amiodarona, fluoxetine, la gentamicina entre altres [224]. L'antipalúdic cloroquina i l'antipsicòtic clorpromazina també mostren acumulació lisosomal significativa associada a alteracions del metabolisme lipídic [247]. La disfunció mitocondrial associada a la interacció amb cardiolipina s'ha relacionat amb toxicitat induïda per doxorubicina [248]. Paral·lelament, la desorganització de dominis lipídics pot alterar la senyalització cel·lular i contribuir a respostes apoptòtiques.

Aquests processos evidencien que les membranes biològiques constitueixen entorns moleculars altament selectius i funcionalment actius, capaços de mediar interaccions específiques amb fàrmacs, pèptids i altres molècules bioactives [200]. La seva comprensió permet no només optimitzar l'eficàcia terapèutica i anticipar mecanismes de toxicitat, sinó també dissenyar estratègies farmacològiques basades en la modulació biofísica de la membrana, especialment rellevants en la inhibició de processos de fusió viral.

5.1.3. Desenvolupament de fàrmacs i avaluació de la toxicitat

El desenvolupament d'un fàrmac és un procés complex en què convergeixen nombroses etapes i disciplines, des del disseny molecular fins a l'avaluació preclínica i clínica de l'eficàcia i la seguretat. La membrana biològica no és només un obstacle a superar en el camí cap a la diana terapèutica, sinó una realitat activa que condiciona, des del primer moment, el comportament de la molècula [249]. És en aquesta interfície on es decideixen, en gran mesura, la seva distribució entre medis aquosos i lipídics, la seva permeabilitat, la seva accessibilitat a les dianes i, sovint, també els seus primers efectes indesitjats. Per

això, entendre la relació entre fàrmac i membrana exigeix considerar, de manera inseparable, les propietats del compost com la lipofilicitat, l'estat d'ionització, l'amfifilicitat, la mida o la geometria molecular, i les propietats de la membrana com la composició lipídica, la càrrega superficial, el contingut en colesterol, el grau d'ordre, la fluïdesa, la curvatura o l'heterogeneïtat lateral [101]. D'aquesta interacció en depenen no només l'eficàcia i la selectivitat, sinó també una part rellevant de la seguretat.

Aquesta idea es fa especialment evident quan observem que alguns dels mateixos trets que expliquen l'activitat terapèutica poden ser, alhora, en determinades circumstàncies, l'origen de la toxicitat. L'amfotericina B, esmentada anteriorment, n'és un exemple paradigmàtic, la seva afinitat per membranes riques en esterols és fonamental per a l'acció antifúngica, però també ajuda a entendre la seva toxicitat, parcialment mitigada amb formulacions liposomals [250]. De manera anàloga, diversos compostos amfifílics catiònics poden acumular-se en entorns lipídics intracel·lulars i desencadenar processos de fosfolipidosi, fet que mostra fins a quin punt una interacció intensa amb la membrana pot esdevenir farmacològicament ambivalent [251]. També els transportadors de membrana, lluny de ser un element accessori, modulen la resposta terapèutica i la toxicitat; en el cas de les estatines, per exemple, la captació i l'eflux condicionen tant l'exposició tisular com el risc de miopatia [252]. Fins i tot en famílies terapèutiques d'ús tan estès com els AINEs, la membrana no constitueix un simple suport inert, sinó un entorn capaç de modular la distribució del compost, la seva activitat local i alguns dels seus efectes adversos [253].

Des d'aquesta perspectiva, la toxicitat no s'ha d'entendre únicament com un esdeveniment terminal, observable quan el dany cel·lular o tissular ja s'ha manifestat, sinó també com el resultat d'alteracions fisicoquímiques inicials que tenen lloc a la interfície membranària. Canvis en l'ordre lipídic, en la permeabilitat, en la càrrega superficial o en l'organització lateral poden precedir i anunciar respostes biològiques de més abast. És aquí on els models de membrana adquireixen un valor particular: perquè permeten captar, amb un alt grau de resolució, aquells esdeveniments primerencs que sovint anticipen tant el mecanisme d'acció com el potencial tòxic. En aquest sentit, la membrana no és només el lloc on el fàrmac actua; és també un nivell

privilegiat d'anàlisi per comprendre per què actua, com actua i fins a quin punt ho fa de manera segura [101].

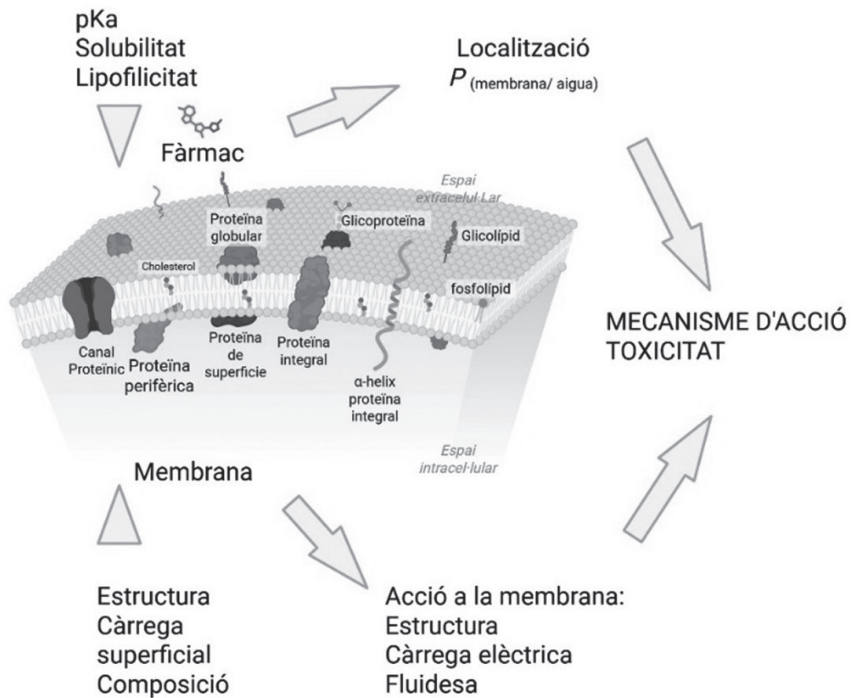


Figura 5-1. Relació entre les propietats fisicoquímiques del fàrmac, les característiques de la membrana i les conseqüències sobre la localització del fàrmac, el mecanisme d'acció i la toxicitat. Imatge generada per BioRender, adaptada de Lúcio M, Lima JLFC, Reis S. *Curr Med Chem.* 2010;17(17):1795–1809 (Figura 1)[254].

La figura 5-1 resumeix aquest plantejament i mostra com les propietats del fàrmac i les característiques de la membrana convergeixen en la determinació del mecanisme d'acció i la toxicitat.

6. APORTACIÓ DE LA RECERCA DESENVOLUPADA

En el marc conceptual exposat és on es desplega la recerca desenvolupada, els esforços s'orienten a estudiar, mitjançant sistemes biomimètics controlats, la naturalesa fisicoquímica de les interaccions amb la membrana i la seva repercussió farmacològica. **És en aquesta intersecció entre biofísica i terapèutica on s'articula la nostra aportació.**

Si la membrana ha de ser entesa no només com un límit estructural sinó com una interfície dinàmica capaç de modular el destí del fàrmac, es fa necessari abordar experimentalment aquesta frontera amb eines que permetin disseccionar-ne els mecanismes. Partint de la hipòtesi que les propietats estructurals, termodinàmiques i mecàniques de la bicapa condicionen de manera decisiva el transport, la retenció i l'alliberament intracel·lular dels compostos bioactius. Es va orientar el treball cap a l'ús sistemàtic de membranes lipídiques model com a plataformes biomimètiques controlades. Aquesta aproximació ens ha permès establir correlacions quantitatives entre composició lipídica, estat físic de la membrana i comportament farmacològic, avançant així des d'una descripció empírica dels fenòmens d'acumulació i eficàcia cap a una interpretació fonamentada en principis biofísics.

L'anàlisi biofísica **de membranes lipídiques model ha constituït l'eix vertebrador** d'una tasca que, **malgrat la diversitat aparent dels sistemes estudiats**, virus, bacteris i nanotransportadors terapèutics; **convergeixen en un mateix principi**, la membrana no és un suport estructural passiu, sinó una interfície funcional capaç de modular processos biològics crítics.

6.1. Interacció pèptid-lípid

6.1.1. Interacció de seqüències VP3 del virus de l'hepatitis A amb membranes model

En el marc d'una recerca orientada a comprendre com un virus no embolcallat com el virus de l'hepatitis A (HAV) pot travessar barreres lipídiques sense disposar d'una membrana pròpia, es va procedir a establir una hipòtesi fisicoquímica concreta: determinats segments de les proteïnes de

la càpside del virus poden actuar com a pèptids fusogènics condicionals, activats només sota estímuls compatibles amb la via endosomal. El focus experimental recau en la seqüència VP3(110–121) (pèptid immunogènic i amfipàtic), i en derivats dissenyats per disseccionar i, eventualment, explotar el rol del pH i de la càrrega superficial de la membrana.

El primer resultat és l'evidència que VP3(110–121) no és activament desestabilitzador a pH neutre, però pot esdevenir-ho de manera marcada quan el sistema és acidificat a valors $< \sim 6$, compatibles amb l'interior endosomal. En vesícules que incorporen DOTAP (model membrana catiònic), l'acidificació posterior a la unió del pèptid desencadena agregació, barreja lipídica i fuga de contingut, un conjunt de senyals consistent amb un procés de fusió vesicular. En canvi, en vesícules zwitteriòniques (POPC/SM/DPPE) s'observa fuga sense agregació ni barreja lipídica, coherent amb un mecanisme de permeabilització/formació de porus o ruptura local sense fusió detectable. Un element mecànic crític és que l'efecte només apareix quan el pèptid s'uneix primer a pH 7,4 i després s'acidifica; si s'afegeix directament sobre vesícules en medi àcid, l'activitat pràcticament desapareix (Figura 6-1). Aquest ordre d'esdeveniments aporta una lectura fisiològica clara, el pèptid hauria d'esdevenir accessible i competent després de la internalització i el canvi de pH [255].

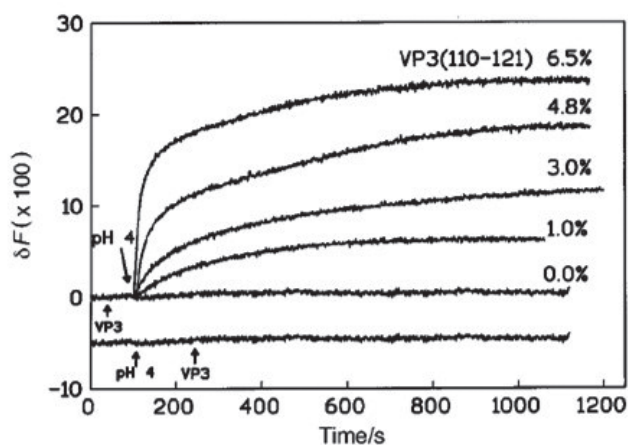


Figura 6-1- Efecte de la concentració del pèptid VP3(110-121) en la mescla de lípids en SUVs de POPC-SM-DPPE-DOTAP (40+33+12+15). Es pot observar la part superior de la imatge on s'especifica el % de pèptid afegit a les vesícules abans d'acidificar a pH 4,0 amb HCl. A la part inferior, el HCL es va afegir abans de l'adició del pèptid. Imatge publicada a Chávez A, Busquets MA, Pujol M, Alsina MA, Cajal Y. *Analyst*. 1998;**123**:2251–2256 [255]

L'activació per pH es va complementar amb una lectura termodinàmica de la interfície lipídica mitjançant monocapes de Langmuir. D'una banda, es demostra que els principals components lipídics de la membrana d'hepatòcit són miscibles a la interfície aire-aigua en un ampli rang de proporcions, amb interaccions laterals globalment febles (comportament proper a l'additivitat), és a dir, un entorn compatible amb reorganitzacions locals sense necessitat de segregacions extremes. D'altra banda, l'inserció de VP3(110–121) en monocapes mixtes mostra una dependència de la densitat d'empaquetament (a major pressió superficial, més difícil la penetració) i, sobretot, de la càrrega: la interacció és màxima i més ràpida en interfícies catióniques amb DOTAP, intermèdia en zwitteriòniques i mínima en interfícies anióniques amb PS. Aquest patró estableix, amb una coherència interna notable, que el reconeixement membrana–pèptid combina un component hidrofòbic (capacitat de penetrar) i un component electrostàtic (modulació fina de l'afinitat i la cinètica [100]).

El següent pas conceptual es va focalitzar en la presència del grup RGD present a la seqüència peptídica, relacionat amb reconeixement de receptors i antigenicitat, i la comparació amb l'anàleg RGA (que implica pèrdua d'antigenicitat), per separar la funció de receptor i la funció de membrana. Tant VP3-RGD com VP3-RGA s'uneixen a membranes a pH neutre i àcid (segons resultats obtinguts fluorescència de Trp, quenching, FRET), però la desestabilització i la fusió continuen sent desencadenades per l'acidificació (pH ~4–6). L'efecte final depèn de la càrrega en membranes anióniques i catióniques es detecta barreja lipídica i fuga, indicant processos de fusió, mentre que en membranes zwitteriòniques predomina la permeabilització sense barreja lipídica. El resultat central és que el canvi RGD→RGA no aboleix l'activitat fusogènica a pH àcid, suggerint que el tripèptid RGD és clau per reconeixement/antigenicitat, però no és un requisit molecular per a la desestabilització membrana-depenent sota condicions endosomals [256].

Finalment, la palmitoilació de VP3(110–121) (PVP3) com a estratègia per afavorir la incorporació en membranes i millorar el potencial de formulació en liposomes. A pH 7, 4, PVP3 s'uneix a vesícules zwitteriòniques, anióniques i catióniques, però adopta formes/conformacions diferents segons la interfície, en membranes catióniques

es detecta una inserció més profunda detectat per un increment d'intensitat i menor accessibilitat al apantallador, mentre que en membranes aniòniques o zwitteriòniques la inserció és més superficial. Funcionalment, PVP3 indueix fuita en totes les composicions, però la barreja lipídica per fusió es detecta només en liposomes catiònics amb DOTAP; a més, la resposta és dependent de la fracció molar de lipopeptid. Les dades de monocapes reproduïxen el mateix principi: inserció més favorable en interfícies catiòniques i limitacions clares en interfícies aniòniques a pressions inicials més altes. En conjunt, la palmitoilació transforma una seqüència que era fusogènica sota pH endosomal en un constructe que pot promoure fusió/permeabilització, en un context catiònic, a pH neutre, i això es proposa explícitament com a informació útil per dissenyar sistemes liposomals que millorin el lliurament cel·lular d'un immunogen associat a membrana, es a dir s'entèn com un augment de resposta immune [257].

En síntesi, s'arriba a una narració mecanística sòlida, de manera que (i) existeix un segment capsidal d'HAV amb capacitat de desestabilitzar membranes; (ii) aquesta capacitat és condicional (pH com a interruptor) i contextual (càrrega i empaquetament lipídic com a moduladors); (iii) els determinants d'antigenicitat/reconeixement (RGD) poden ser separables dels determinants de desestabilització membranària; i (iv) la derivatització lipofílica (palmitoilació) permet convertir el coneixement biofísic en una proposta de disseny de formulació (liposomes catiònics) amb l'objectiu d'optimitzar interacció, inserció i efecte funcional.

6.1.2. Modulació de la fusió viral mitjançant reorganització lipídica. Estudis amb pèptids inhibidors del pèptid de fusió del HIV

En aquesta línia, el fil conductor és entendre com pèptids derivats del GB virus C (GBV-C) poden antagonitzar, a nivell de membrana, l'acció del pèptid de fusió del VIH-1 (HIV-1 FP). El plantejament és deliberadament biofísic, abans d'atribuir un efecte a un receptor o a una via cel·lular concreta, es dissectiona el fenomen en models lipídics controlats (vesícules, monocapes de Langmuir i films Langmuir–Blodgett, bicapes suportades) i amb lectures complementàries amb

tècniques variades (fluorescència, anisotropia, FRET, microscòpia de fluorescència i AFM). Aquesta estratègia permet separar el que és interacció pèptid-lípid, el que és pèptid-pèptid, i el paper de variables silencioses però decisives com la càrrega superficial, la fase (Lc/Le) i la pressió lateral.

Un dels possibles mecanismes d'interacció entre el GBV-C i el HIV-1 proposa que el primer modula la infecció del segon i la progressió de la síndrome d'immunodeficiència adquirida inhibint la replicació per les proteïnes E1 i E2 del virus GBV-C en estudis *in vitro* [258–260]. Es van seleccionar seqüències d'aquestes proteïnes per tal d'avaluar el seu comportament tant amb interaccions amb la membrana com amb el virus HIV-1.

Primer, es va procedir a l'estudi de les bases fisicoquímiques de l'activitat a la membrana de fragments de la proteïna E1. L'estudi amb fluorescència del segment E1(145–162) mostra una interacció dinàmica amb liposomes, analitzada amb descomposició multivariant (MCR-ALS) dels espectres de Trp, el pèptid tendeix a associar-se preferentment a la superfície lipídica, amb aparició d'espècies espectrals que suggereixen reorganització conformacional en funció de la fracció molar de pèptid i la temperatura [107]. En paral·lel, el resultat obtingut en monocapes de Langmuir amb el mateix fragment demostra que la seva acció depèn críticament de l'estat físic de la pel·lícula lipídica, la incorporació i la miscibilitat varien entre fase Le i Lc i la càrrega del lípid modula el balanç electrostàtic/hidrofòbic com s'observa a la figura 6-2 [110] on es mostra la penetració del E1(145-162) en funció de la composició de la membrana. En conjunt, aquests resultats fixen una idea clau: no hi ha un efecte del pèptid universal, sinó una resposta condicionada pel entorn de la membrana.

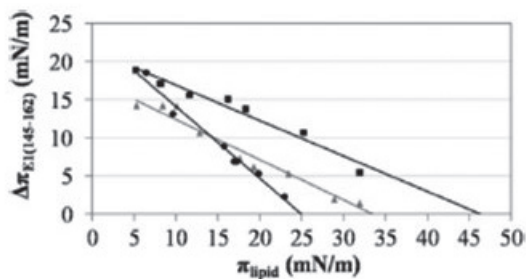


Figura 6-2. Increment de la pressió superficial degut a la presència de E1(145-162) en monocapes de diferent composició respecte a la pressió inicial de fosfolípid (i) Quadrats negres: DMPG; triangles grisos: DMPC i cercles negres: POPG. Publicat a: Sánchez-Martín MJ, Haro I, Alsina MA, Busquets MA, Pujol M. A. *J Phys Chem B*.2010; **114**:448-456 [110]

A partir d'aquí, la recerca es desplaça cap a la pregunta funcional: pot un pèptid de GBV-C neutralitzar l'activitat fusogènica d'HIV-1 FP en membranes model? L'estudi amb E1(64-81) mostra que aquest fragment interacciona amb models lipídics i, sobretot, que la seva presència modula i redueix els efectes d'HIV-1 FP mesurats en monocapes i bicapes, amb suport de mesures de fluorescència/anisotropia, calorimetria i ressonància de plasmó superficial [261]. Aquesta evidència s'amplia amb una sèrie de quatre fragments de la mateixa proteïna E1 (P7, P8, P10 i P18) [262], seleccionats i caracteritzats fisicoquímicament, on es demostra que tots poden atenuar les pertorbacions induïdes per HIV-1 FP en membranes model. Dins del conjunt, P7 destaca per mostrar interaccions atractives més marcades amb HIV-1 FP que la resta, i per un patró de modulació coherent amb una inhibició més eficient [263]. La inhibició no s'explica només per un recobriment de la membrana, sinó que apunta a un mecanisme mixt on pesa (i sovint domina) la formació de complexos pèptid-pèptid i la conseqüent redistribució d'afinitats cap a la interfície.

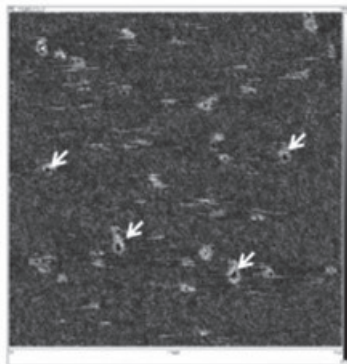


Figura 6-3 Imatge AFM per a la pel·lícula LB composta per DPPC/DPPG (2:1) + VIH-1 FP (5% mol). Les monocapes es van transferir des de la interfície aire-aigua a portaobjectes de mica a 6 mN m^{-1} . Escala de dades $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$. Escala Z: 0,5 nm. Les fletxes blanques indiquen els nanoforats induïts pel pèptid FP del VIH-1. Imatge publicada a: R Galatola, A Cruz, MJ Gómara, J Prat, MA Alsina, I Haro, M Pujol. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2015;1848:392–407 [264].

S'aprofundeix en la hipotesi formulada i en l'anàlisi del E1P8 i derivats, integrant assajos de penetració, miscibilitat en monocapes i morfologia en LB/AFM s'observa que HIV-1 FP, per la seva naturalesa fusogènica, genera petjades morfològiques pròpies com nanoforats (figura 6-3) mentre que la presència d'E1P8 en barreja amb HIV-1 FP condueix a estructures diferents i a una mitigació del dany associat al FP (figures 6-4 i 6-5) [264]. Un resultat especialment revelador per a les conclusions és que E1P8 i derivats presenten baixa capacitat de penetrar membranes biològiques (π_c baixa), cosa que reforça que l'efecte inhibitor pot ser compatible amb una interacció limitada amb el nucli hidrofòbic de la membrana i, en canvi, amb una inhibició per neutralització o segrest del FP i per alteració de la seva organització a la interfase [264].

Per altra part, respecte a fragments de la proteïna E2 del HIV, la inhibició es visualitza directament amb resolució micro-/nanoscòpica de la membrana. D'una banda, en el cas del P45 (GBV-C) en bicapes suportades (SLBs) i LBs de DMPC:DMPS (3:2) es demostra que és capaç de preservar la integritat de la bicapa davant l'acció desestabilitzadora d'HIV-1 FP, i que la barreja P45+FP produeix canvis marcats en la coexistència LE/LC i en l'aparença dels dominis; l'AFM revela

estructures específiques i, crucialment, que P45 pot evitar la formació de forats induïts per HIV-1 FP [265]. S'estudia, l'alçada, la rugositat el recobrimient i la combinació de tots dos (figures 6-6 i 6-7) .

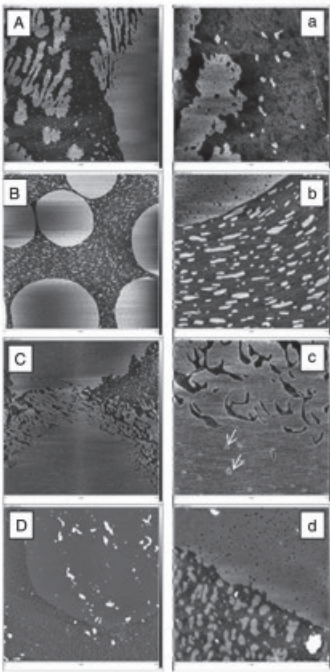


Figura 6-4. Imatges AFM per a A: DPPC/DPPG (2:1), B: DPPC/DPPG (2:1) + E1P8 (5% mol), C: DPPC/DPPG (2:1) + VIH-1 FP (5% mol), D: DPPC/DPPG (2:1) + E1P8 + VIH-1 FP (2:1) (5% mol). Les monocapes es van transferir a portaobjectes de mica a 6 mN m⁻¹. Escala de dades: (A, B, C) 5 × 5 μm, (a, b, c) 1 × 1 μm. Escala Z: 4,0 nm, 4,0 nm, 1,3 nm i 5,8 nm per a A, B, C i D respectivament i 3,0 nm, 4,0 nm, 0,8 nm i 2,0 nm per a a, b, c i d respectivament. Imatge publicada a: R Galatola, A Cruz, MJ Gómara, J Prat, MA Alsina, I Haro, M Pujol. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2015;1848:392–407 [264].

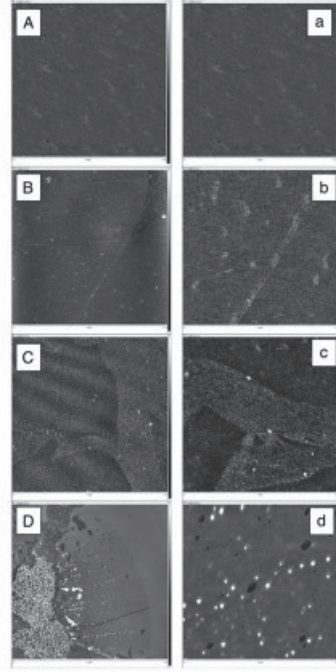


Figura 6-5. Imatges AFM per a A: DPPC/DPPG (2:1), B: DPPC/DPPG (2:1) + E1P8 (5% mol), C: DPPC/DPPG (2:1) + VIH-1 FP (5% mol), D: DPPC/DPPG (2:1) + E1P8 + VIH-1 FP(2:1) (5% mol). Les monocapes es van transferir a portaobjectes de mica a 30 mN m⁻¹. Escala de dades: (A, B, C) 5 × 5 μm, (a, b, c) 1 × 1 μm. Escala Z: 4,0 nm, 0,9 nm, 0,8 nm i 3,2 nm per a A, B, C i D respectivament i 3,0 nm, 0,8 nm, 0,8 nm i 2,0 nm per a a, b, c i d respectivament. Imatge publicada a: R Galatola, A Cruz, MJ Gómara, J Prat, MA Alsina, I Haro, M Pujol. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2015;1848:392–407 [264].

D'altra banda, el treball sobre P6-2VIR576, un híbrid que combina un fragment E2 actiu en cultius (AcP6-2, seq. 45–64 d'E2) amb el pèptid VIR576 derivat de VIRIP, conegut per unir-se al FP, mostra

major activitat superficial i indicis de més capacitat de penetració que el pèptid pare, amb valors d'exclusió coherents amb una interacció rellevant en rangs de pressió comparables als de membranes cel·lulars (Figura 6-8) [266]. Es demostra també que la interacció i la inhibició depenen de la fase en que es troba la membrana; P6-2VIR576 mostra preferència per fases L_c, modifica la fluïdesa i pot acabar promovent la desaparició de fases gel [239], i la inhibició d'HIV-1 FP s'evidencia amb FRET (taula 6-1) i AFM [267].

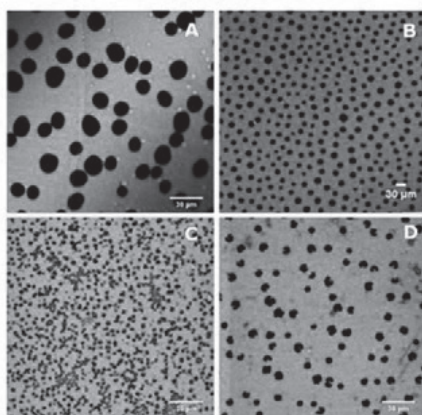


Figura 6-6. Imatges de microscòpia de fluorescència de LB transferits sobre substrat de mica a 10 mN m^{-1} . (A) DMPC/DMPS (3:2); (B) DMPC/DMPS (3:2)/P45 (8/2); (C) DMPC/DMPS (3:2)/HIV-1 FP (8/2); (D) DMPC/DMPS (3:2)/P45/HIV-1 FP (8/1/1). Sonda fluorescent: NBD-PC. Barra d'escala: 30 μm. Imatge publicada a: Ortiz A, Domènech O, Muñoz-Juncosa M, Prat J, Haro I, Girona V, et al. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.*, 2015, 480: 184-190 [267]

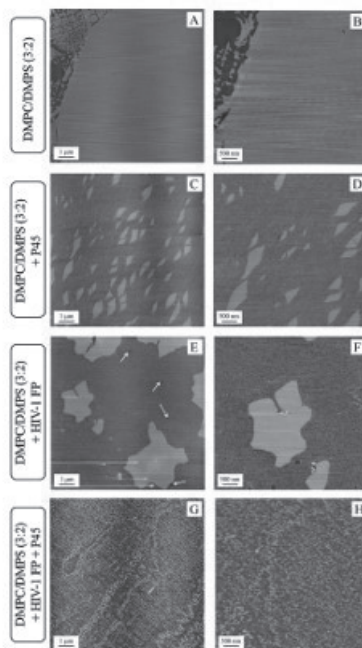


Figura 6-7. Imatges topogràfiques de AFM de la monocapa DMPC/DMPS (3:2) a una pressió superficial de 10 mN m^{-1} (A i B), i la mateixa monocapa lipídica en presència de P45 (C i D), FP del VIH-1 (E i F) i una barreja d'ambdós pèptids (G i H). Barra d'escala (A–F): 2 nm. Barra d'escala (G–H): 5 nm. Imatge publicada a: Ortiz A, Domènech O, Muñoz-Juncosa M, Prat J, Haro I, Girona V, et al. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.*, 2015, 480: 184-190 [267]

Considerats en conjunt de resultats obtinguts, s'arriba a la conclusió que la membrana no és un només un mosaic o decorat, sinó un medi

actiu on l'entrada viral es decideix per equilibris d'adsorció, miscibilitat i organització lateral. Els pèptids de GBV-C estudiats poden desactivar l'acció d'HIV-1 FP per dues vies no excloents: (i) interacció directa amb el FP (formació de complexos que en modifiquen l'afinitat i la morfologia interfacial);

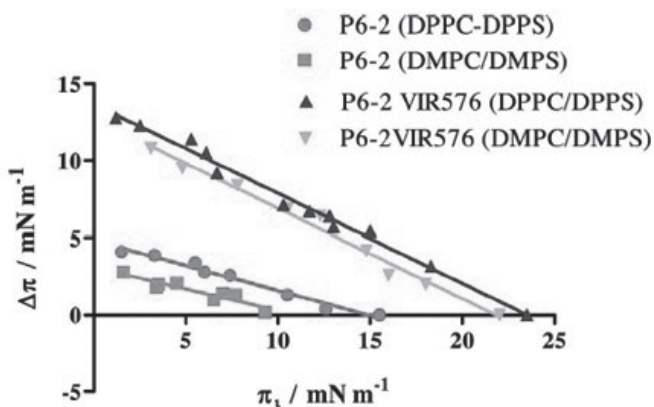


Figura. 6-8. Increment de la pressió superficial ($\Delta\pi$) en funció de la pressió lipídica inicial (π_i) causada per AcP6-2 o P6-2VIR576 en monocapes de DPPC:DPPS (3:2) o DMPC:DMPS (3:2). AcP6-2 i DPPC:DPPS, AcP6-2 i DMPC:DMPS, P6-2VIR576 i DMPC:DMPS, P6-2VIR576 i DPPC:DPPS. Les línies contínues corresponen a l'ajust de les dades experimentals mitjançant anàlisi de regressió lineal. Imatge publicada a: Ortiz A, Girona V, Prat J, Muñoz-Juncosa M, Alsina MA, Pujol M. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2017; **259**: 265-664 [266]

Taula 6-1. Inhibició del % de lípid-mixing per a pèptids de la proteïna E1 del virus HIV obtinguts per transferència d'energia per ressonància (FRET). *Comunicació al XVI International symposium on Luminiscence Spectrometry: Fundamentals and Applications.* 24-27 de setembre 2016. Rodas, Grècia.

| GBV-C peptides | E1(70-87) | E1(79-87) | E1(79-96) | E1(79-101) | E1(94-113) | E1(251-269) | Acet-P _{6,2} | Palm-P _{6,2} | VIR-P _{6,2} |
|---------------------------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|-------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| % lipid-mixing inhibition | 69,6 | 40,0 | 100 | 95,7 | 56,5 | 47,8 | 91,3 | 100 | 78,3 |

la figura 6-9 mostra la predicció de la possible estructura molecular del HIV FP, del P45 i de la barreja de tots dos en dissolució i (ii) modulació de l'estat físic de la membrana (dominis LE/LC, estabilitat de la bicapa, prevenció de nanodefectes), amb una dependència marcada de càrrega i fase lipídica.

Quan l'objectiu terapèutic és un procés de fusió, la diana última és un

determinat paisatge de membrana, i els inhibidors més eficients són els que saben operar simultàniament sobre pèptid i interfície.

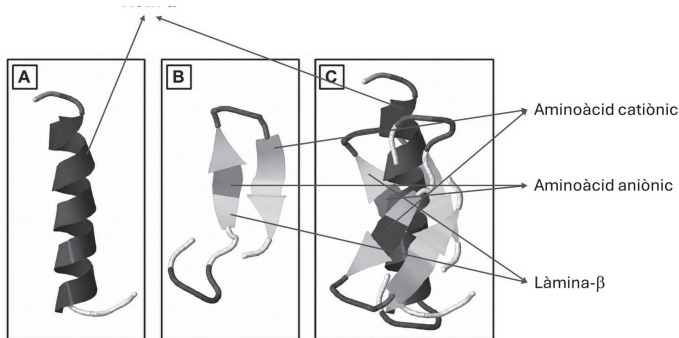


Figura 6-9. Estructures moleculars predites corresponents al mínim d'energia per a **FP-VIH (A)** i **P45 (B)**, i possible organització molecular en solució de la barreja **FP-VIH-P45 (C)**. Imatge publicada a: Domènech O, Ortiz A, Pujol M, Haro I, Muñoz M, Alsina MaA et al. *Biochim Biophys Acta Biomem.* 2014; 1838 (5): 1274-1280.

6.1.3. Interacció d'antibiòtics amb membranes model

En aquesta línia, la membrana bacteriana es conceptualitza deliberadament com una diana fisicoquímica i això permet entendre per què alguns antibiòtics de membrana, com les polimixines, mantenen una eficàcia notable malgrat dècades d'ús.

Quan el mecanisme d'acció depèn d'un balanç d'interaccions electrostàtiques i hidrofòbiques amb interfícies lipídiques (més que no pas d'un receptor únic), la resposta adaptativa del bacteri tendeix a ser més costosa i, sovint, menys estable. En aquest marc, els treballs integrats aquí desmunten una simplificació recurrent, les polimixines mantenen per lisi i s'estableix, amb models biomimètics, una hipòtesi més precisa: a concentracions properes a la MIC, la polimixina B (PxB) actua predominantment en un règim funcional no lític, on l'efecte determinant no és la ruptura massiva de la bicapa, sinó la capacitat d'induir contactes membrana-membrana i, a través d'aquests, alterar l'homeòstasi composicional de la cèl·lula bacteriana [268–269].

La primera contribució consisteix a separar experimentalment unió i activació. En monocapes de lípids bacterians (extracte lipídic total d'*Escherichia coli*), es compara PxB amb el seu derivat desacilat i no

antibiòtic, la PxB-nonapèptid (PxB-NP). Tot i que PxB-NP pot apropar-se a la interfície, la pèrdua de la cadena acilada redueix de manera decisiva la intercalació entre lípids, i això es reflecteix en una resposta interfacial molt més feble (canvis menors en isoterms i inserció escassa o nul·la en funció de la pressió superficial). Aquest resultat, aparentment simple, és estructurant i indica que el reconeixement electrostàtic no és suficient; cal un domini hidrofòbic operatiu que permeti passar d'una adsorció superficial a un estat d'inserció estable i, per tant, funcional [268]. Aquesta distinció guanya profunditat quan el sistema passa a bicapes vesiculars d'extractes d'E.coli i s'explora la dinàmica lipídica amb fluorescència.

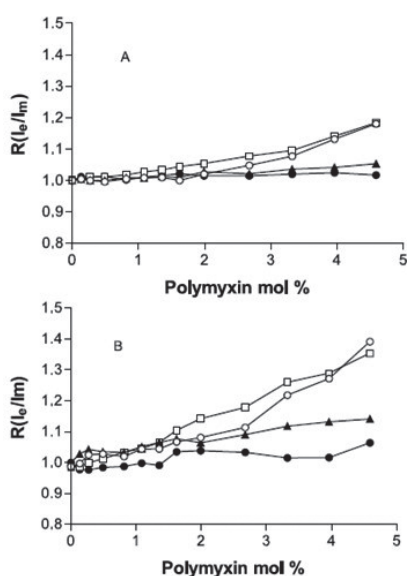


Figura 6-10. Efectes de diferents polimixines sobre la dinàmica lipídica en vesícules lipídiques unilamelars d'E. coli avaluats per la fluorescència del fosfolípid PG marcat amb pirè (pyrPG) (1 mol%) mostrat com a canvis en la relació excímer/monòmer normalitzada (I_e/I_m). Panell (A): 40 °C; Panell (B): 15 °C. Pèptids: PxB (cercles oberts); PxE (quadrats oberts); PxB-NP (triangles tancats); colimicina M (cercles tancats). Concentració de lípids 133 mM en 10 mM de Tris pH 8. La desviació estàndard de tres experiments diferents és de 0,002. Publicat a Clausell A, Pujol M, Alsina MA, Cajal Y. *Talanta*. 2003; **60**(2-3):225-234 [269]

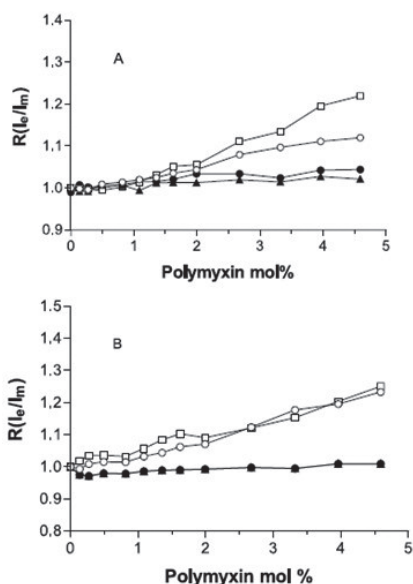


Figura 6-11 Efectes de diferents polimixines sobre la dinàmica lipídica en vesícules lipídiques unilamelars d'E. coli avaluats per la fluorescència del fosfolípid PC marcat amb pirè (pyrPC) (1 mol%) mostrats com a canvis en la relació excímer/monòmer normalitzada (I_e/I_m). Panell (A): 40 °C; Panell (B): 15 °C. Pèptids: PxB (cercle obert); PxE (quadrat obert); PxB-NP (triangle tancat); colimicina M (cercle tancat). Publicat a Clausell A, Pujol M, Alsina MA, Cajal Y. *Talanta*. 2003; **60**(2-3):225-234 [269]

Mitjançant anisotropia (Figura 6-10 i 6-11) amb sondes situades a diferents profunditats (interfície vs nucli hidrofòbic) i mitjançant la relació excímer/monòmer de pirè (sensibilitat a mobilitat lateral i proximitat intermolecular), es descriu un comportament clarament bifàsic. Per sota d'un llindar aproximat (~ 2 mol%), PxB i PxE tendeixen a romandre en una forma d'unió sobretot superficial, amb efectes modestos sobre l'ordenació de la regió externa i sense evidència d'una reorganització global que impliqui microviscositat o transicions de fase de manera marcada. Per sobre d'aquest llindar, en canvi, els mateixos pèptids adopten una forma més profundament inserida, associada a increment d'empaquetament, canvis en l'organització de fase i fenòmens clarament desestabilitzadors (fusió, barreja lipídica inespecífica i fuga de continguts), és a dir, un règim que s'allunya del domini farmacològic rellevant i s'acosta al règim lític. La coherència del model es reforça perquè PxB-NP i el profàrmac neutre no reproduïen aquesta modulació dinàmica: càrrega catiònica efectiva i cadena acilada emergeixen com a requisits físics per governar l'estat de la bicapa [269].

El punt realment decisiu del conjunt és que la forma superficial de PxB a MIC no és passiva, és una forma funcional amb una signatura termodinàmica i estructural pròpia. Els estudis amb monocapes Langmuir–Blodgett d'extracte lipídic total d'*E. coli* transferides a suport sòlid, combinant anàlisi de miscibilitat (excés d'àrea i energia lliure d'excés de barreja, G^E) amb AFM, mostren mesclures no ideals i l'aparició de dominis lípid–pèptid que es reconfiguren amb la fracció molar de PxB. En el rang de baixes fraccions, compatible amb el domini MIC, la morfologia AFM revela estructures supramoleculares que s'interpreten com a agregats ordenats de complexos lípid–pèptid; i és aquí on es formula operativament el concepte de PxBc, una interfície en què el pèptid, orientat i disposat de manera concreta, pot actuar com a pont molecular capaç de sostenir el contacte entre dues interfícies oposades [270].

La demostració funcional d'aquest punt és especialment elegant perquè evita confondre contactes amb fusió. En l'assaig asimètric monocapes/vesícules, quan s'injecten vesícules d'extracte d'*E. coli* marcades amb fosfolípid fluorescent (p. ex. pirè-PG) sota una monocapa ECL–PxB mantinguda a una pressió lateral biomembranària (~ 32

mN/m), es detecta el marcador a la monocapa recuperada sense que hi hagi una modificació neta d'àrea que indiqui aport de lípid o fusió. La lectura és precisa, la PxB promou intercanvi lipídic bidireccional a través d'un contacte estable, no una fusió o disrupció indiscriminada. De nou, PxB-NP no indueix aquest intercanvi, reforçant que no és la càrrega el que governa la funció, sinó la capacitat de construir un estat interfacial actiu [270].

Aquesta hipòtesi s'arrodoneix quan es reconstrueix, de manera bi-omimètica, l'arquitectura pròpia dels bacteris Gram-negatius distingint entre membrana externa (OM) i membrana interna (IM). Mitjançant monocapes de LPS o lipid A com a model d'OM i monocapes de POPG com a model d'IM, i combinant cubeta de Langmuir amb BAM, s'estudia la inserció de PxB, PxB-NP i diversos anàlegs sintètics cíclics catiònics (sp-B, sp-C, sp-D). El resultat reforça una seqüència causal molt útil per al discurs; (i) la inserció a LPS/lipid A és un pas necessari per a l'autoabsorció, però no és suficient per explicar l'activitat; (ii) la funció antibacteriana exigeix també inserció efectiva en una interfície fosfolipídica aniònica (IM) i, sobretot, l'adopció d'un estat que indueixi contactes i intercanvi. En aquest marc, l'anàlisi d'anàlegs mostra que els requisits estructurals són cooperatius, cal mantenir dos dominis hidrofòbics (cadena acilada + segment (D) Phe-Leu) i una cationicitat elevada (cinc càrregues positives associades a residus Dab) per sostenir l'eix unió→inserció→intercanvi; quan es redueix la cationicitat (p. ex. substitució per Dap), la capacitat funcional disminueix [271]. Aquesta mateixa lògica queda sistematitzada al capítol de síntesi, que insisteix en la necessitat d'una bateria de tècniques per amplificar l'efecte de poques molècules unides i, alhora, valida experimentalment l'orientació i l'autoassociació a la interfície mitjançant anàlegs fluorescents (Trp/pirè) i aproximacions de tipus FRET [272].

Finalment, es mostra que el mateix llenguatge biofísic serveix no només per explicar mecanismes, sinó per dissenyar [271]. En anàlegs derivats, tipus sp-B que incorporen (D)Trp (sp-34, sp-96, sp-100) i substitucions de Dab per Arg, s'observa un desplaçament del fenotip mecanístic i es manté una alta afinitat per LPS i la capacitat d'inserció en monocapes d'OM, però en membranes aniòniques model de citoplasma (POPG i mescles amb POPE) aquests compostos mostren

rastres d'inserció profunda i, a ràtios pròxims als efectius, indueixen permeabilització i fusió. Aquest canvi biofísic es correlaciona amb un canvi biològic com que l'activitat s'estén a bacteris Gram+ i, en bacteris sencers, la citometria de flux evidencia despolarització i permeabilització de membrana amb cinètiques compatibles amb el mecanisme proposat [273].

La conclusió és que l'acció antibacteriana de les polimixines i anàlegs no és un únic mecanisme, sinó un paisatge de règims governat per composició, fase i concentració; i el règim més rellevant farmacològicament pot ser no lític i basat en contactes i intercanvi selectiu que desorganitzen la identitat de la membrana. Quan el blanc terapèutic és una propietat emergent de la interfície com càrrega, amfipatia, organització lateral i capacitat de contacte, no cal trencar la membrana per guanyar-la. sovint n'hi ha prou amb desplaçar el seu equilibri.

6.1.4. Interacció de nanopartícules amb membranes model

El coneixement acumulat sobre interaccions lípid-pèptid es va traslladar al desenvolupament de sistemes terapèutics avançats [274-275].

6.1.4.1. Nanopartícules polimèriques per a la inflamació ocular

La inflamació ocular continua essent una de les indicacions més prevalents en oftalmologia, i el seu tractament amb col·liris d'AINes com el dexibuprofèn (DXI) està condicionat per una limitació farmacocinètica estructural: el temps de contacte precorneal és molt curt i la fracció realment absorbida és baixa, fet que obliga a pautes freqüents i compromet l'adherència terapèutica [276]

En aquest marc, es planteja i demostra una estratègia coherent com és encapsular DXI en nanopartícules polimèriques biodegradables de PLGA (i PLGA-PEG) per millorar biodisponibilitat i sostenir l'alliberació, i validar aquesta proposta mitjançant una correlació explícita entre models biofísics de membrana (*in vitro*), assajos de permeació (*ex vivo*) i resposta farmacodinàmica (*in vivo*).

L' estudi sistemàtic de formulació [276] explora com el percentatge

de PEG (0–15%) i el tensioactiu (PVA, Tween 80 o Lutrol) modulen, simultàniament, (i) el perfil d'alliberació del fàrmac i (ii) la manera com el sistema nanoestructurat llegeix i perturba una membrana corneal modelitzada. Les nanopartícules mostren, de forma consistent, un alliberament sostingut de DXI en comparació amb el fàrmac lliure, amb paràmetres cinètics ajustats a un model hiperbòlic que evidencien diferències atribuïbles a la combinació polímer–tensioactiu i al grau de PEGilació [276–278]. El punt diferencial del treball és que aquestes diferències de formulació no es tracten només com a variables tecnològiques, sinó com a determinants físics de la interacció amb la interfície lipídica: a les monocapes de Langmuir, per exemple, la presència de Tween 80 provoca una expansió marcada del sistema (increment de l'àrea a pressió superficial fisiològica), compatible amb un augment potencial de permeabilitat de la membrana; en canvi, les formulacions amb Lutrol mostren una expansió molt més subtil [276]. En paral·lel, els estudis de potencial dipolar amb di-8-ANEPPS quantifiquen l'afinitat aparent de les nanopartícules per la membrana model i revelen una tendència robusta, el tensioactiu Tween s'associa a la interacció més alta en totes les sèries, mentre que l'increment de PEG tendeix a augmentar la capacitat màxima d'unió, independentment del tensioactiu. Aquesta arquitectura experimental permet, després, connectar mecanisme i translació. D'una banda, els assajos *ex vivo* indiquen un patró de tropisme corneal, les nanopartícules de PLGA permeen globalment millor a través de còrnia que no pas a través d'esclera, mentre que el 5% de PEG afavoreix lleugerament la permeació escleral; en canvi, increments addicionals de PEG augmenten marginalment l'esclera però incrementen de manera significativa la còrnia [278]. D'altra banda, els assajos de tolerància ocular, obtinguts amb HET-CAM (prova d'avaluació de la irritació ocular- Membrana corioalantoidea) i proves *in vivo*, classifiquen les formulacions com a no irritants, un requisit imprescindible per a una estratègia en forma de col·liri [276]. Finalment, la comparació terapèutica conclou que, tot i que Tween pot ser útil quan es busca incrementar permeabilitat (pel seu efecte d'expansió de membrana), el millor rendiment antiinflamatori global s'observa amb Lutrol, que s'interpreta com un possible efecte sinèrgic antiinflamatori; i, dins d'aquesta lògica, s'identifica com a formulació més favorable la basada en PLGA-PEG 15% amb Lutrol, tant per eficàcia com per un perfil d'alliberació adequat [276].

Un segon aspecte [278] aprofundeix en un problema que, en l'àmbit ocular, és científicament i clínicament ineludible i és que l'edat altera la composició lipídica corneal i, per tant, altera la física de la barrera. Es van desenvolupar dos models de membrana corneal dependents de l'edat: una membrana *adulta* (ACMM) amb composició PS/PC/PE/CHOL/SM (4/18/22/40/16) i una membrana *envellida* (ECMM) amb PS/PC/PE/CHOL/SM (2,5/9,5/12/61/15), definida per un increment del ràtio CHOL/SM que rigiditza la membrana. Sobre aquesta base, es va estudiar una formulació concreta, les DXI-NPs de PLGA-PEG 15% amb Lutrol, amb les característiques nanoestructurals descrites ($Z_{av} \sim 155$ nm, $PI \sim 0,076$, potencial ζ negatiu $\sim -22,5$ mV i EE $\sim 94\%$) [278].

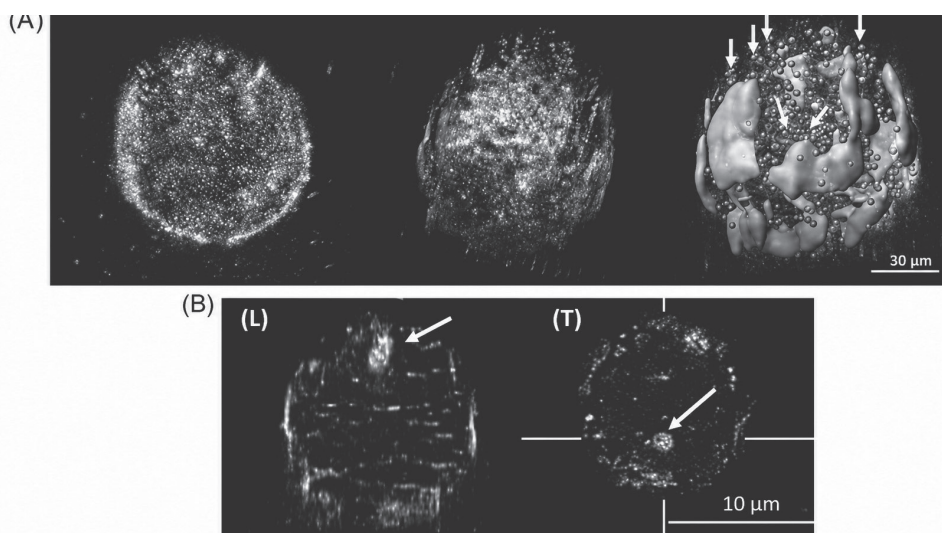


Figura 6-12. (A) Imatges confocal de GUVs d'ACMM i fotografia d'una imatge 3D confocal deconvolucionada de vídeo que mostra l'efecte de les GUV sobre la composició d'ACMM després de 30 minuts d'incubació amb DXI-NPs a 32 °C. Zones més clares: fase lipídica fluida, boletes més fosques: DXI-NPs (fletxes blanques) (B) plans: longitudinal (L) i transversal o equatorial (T) de GUVs d'ACMM marcats. Imatge publicada a Esteruelas G, Ortiz A, Prat J, Vega E, Muñoz-Juncosa M, López MLG, et al. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2023; **228**:113394 [278].

Els resultats biofísics convergeixen en un mecanisme d'interacció seqüencial i, alhora, selectiu segons l'estat de la membrana. Les DXI-NPs són tensioactives (adsorbeixen a la interfície aire-aigua amb un ajust de Langmuir per al corba d'adsorció amb valors de pressió màxima, π_{\max} i constant d'adsorció K_d definits, i presenten una finestra d'inserció a monocapa quantificada mitjançant la pressió d'exclusió (π_e), amb valors

propers als $24,0 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (ACMM) i $21,7 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (ECMM). A pressions baixes (membrana menys compactada) el comportament és similar; però, quan la membrana s'organitza en fases (Le/Lc) i apareixen dominis més condensats, els efectes divergeixen, el mòdul compressional augmenta en presència de nanopartícules i, en ACMM, l'àrea per molècula disminueix a altes pressions, interpretant-se com un procés de recobriment i expulsió de la NP de la membrana [278]. En paral·lel, el potencial dipolar disminueix (desplaçament al vermell de di-8-ANEPPS) en ambdós models però l'efecte és molt menor a ECMM; la quantificació d'unió dona una constant d'unió molt més baixa al model d'adult, ACMM ($17,82 \pm 6,7$) que en el d'ancià, ECMM ($68,70 \pm 2,8$), és a dir, una interacció més gran amb la membrana adulta i més fluida. La lectura mecànica es reforça amb anisotropia. A ACMM augmenta l'anisotropia de DPH (indicant inserció/pertorbació a la regió hidrofòbica), mentre que a ECMM predominen canvis coherents amb una interacció més superficial a nivell de caps polars (ANS i TMA-DPH) [278].

La microscòpia confocal permet tancar el cercle causal, les nanopartícules no es distribueixen homogèniament, sinó que s'adhereixen preferentment a regions més ordenades (Lo) (figura 6-12 A) i, després de l'adhesió, es detecten fenòmens compatibles amb embolcallament i internalització en el model ACMM (figura 6-12 B), incloent-hi alteracions locals de la membrana (p. ex., forats) i localització interna del senyal de les NP. En ECMM, en canvi, la captació és significativament menor i no s'observa internalització als temps estudiats.

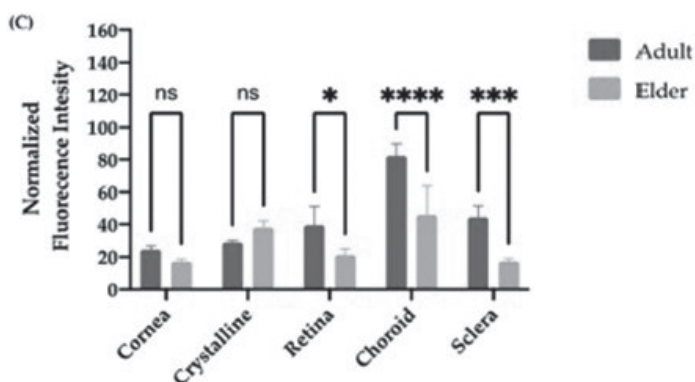


Figura 6-13. Histograma de la intensitat de fluorescència normalitzada per a diferents teixits oculars (no estadísticament significant * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$) ($n=3$). Imatge publicada a Esteruelas G, Ortiz A, Prat J, Vega E, Muñoz-Juncosa M, López MLG, et al. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2023; **228**:113394 [278].

Aquestes diferències *in vitro* troben un paral·lel directe *in vivo* (figura 6-13): després de 24 h, les DXI-NPs es distribueixen principalment al segment posterior, i la retenció global és superior en animals adults que en animals d'edat més avançada, amb diferències significatives a teixits del segment posterior (esclera, retina i coroides; $p < 0,01$), en coherència amb una penetració/interacció més gran quan la membrana és menys rígida. La figura 6-12 recull l'histograma de la intensitat de fluorescència en els diferents teixits oculars demostrant les diferències entre la membrana d'adult i d'ancià.

La conclusió explícita és, per tant, doble: (i) es proposa un model corneal dependent de l'edat com a plataforma biofísica nova i útil; i (ii) es posa en relleu que el disseny de medicaments i nanosistemes oculars ha d'incorporar el factor edat com a variable estructural, si es vol avançar cap a una medicina realment personalitzada en població envellida.

6.1.4.2. Nanopartícules lipídiques per a malalties cutànies hiperproliferatives.

La psoriasi és un model paradigmàtic de malaltia inflamatòria crònica de la pell, amb una prevalença global al voltant del 2% i variabilitat segons poblacions. El seu interès, més enllà de la clínica, és conceptual: la lesió psoriàsica evidencia com la disfunció de la barrera cutània i la immunitat innata/adaptativa poden retroalimentar-se fins a sostenir una inflamació persistent. En el cas de la psoriasi en plaques, la via $\text{TNF}\alpha$ -IL-23-Th17 i la producció d'IL-17 per diverses poblacions cel·lulars s'han consolidat com a eix mecanístic central; alhora, molècules com l'I-37 i altres pèptids antimicrobians participen en l'activació de cèl·lules dendrítiques i en la propagació del bucle inflamatori que culmina en hiperproliferació de queratinòcits i alteració de la diferenciació epidèrmica [279].

Aquesta comprensió mecanística explica també l'arquitectura terapèutica actual: en formes lleus o moderades, la teràpia tòpica continua essent l'esquelet del tractament; en formes moderades-greus, s'hi afegeixen estratègies sistèmiques, inclosos fàrmacs convencionals, petites molècules i, sobretot, biològics dirigits a dianes immunològiques

(anti-TNF, anti-IL-17, anti-IL-23, etc.). Tanmateix, la revisió remarca que, malgrat els avenços, persisteixen límits de resposta, problemes d'absorció i toxicitat potencial, i una necessitat constant d'innovació tant en molècules com en formes farmacèutiques i vies d'administració, cosa que contextualitza l'auge de la nanomedicina cutània [279].

En el treball *Psoriasis: From Pathogenesis to Pharmacological and Nano-Technological-Based Therapeutics* es fa un exercici molt útil per al discurs: s'ordena, amb mirada de conjunt, les principals estratègies nanotecnològiques explorades en psoriasi. Hi apareixen les nanopartícules polimèriques (nanosferes, nanocàpsules, dendrímers i micel·les), amb l'objectiu d'augmentar solubilitat, millorar penetració i modular alliberament; i les plataformes lipídiques (liposomes, liposferes, ethosomes, SLNs i NLCs), destacant-ne la biocompatibilitat i el potencial per estabilitzar càrregues hidrofòbiques i actuar com a potenciadors de penetració. La revisió dedica també un bloc específic a les microneedles, presentant-les com a via intradèrmica mínimament invasiva per superar l'estrat còrni i millorar biodisponibilitat local; i conclou que, malgrat que encara hi ha poques dades clíniques i dificultats d'escalat/esterilització segons plataforma, la combinació de nanopartícules i dispositius obre una finestra realista cap a formulacions més eficaces i segures [279].

Aquesta visió general encaixa de manera natural amb el cas translacional que aporten les NLCs carregades amb riluzole. En aquest cas, la hipòtesi és explícita: el riluzol podria ser útil en dermatosis hiperproliferatives com la psoriasi, però la seva baixa solubilitat aquosa i la fotosensibilitat en limiten l'ús; per això es proposa encapsular-lo en nanostructured lipid carriers per millorar estabilitat i obtenir un perfil d'alliberament sostingut. La formulació s'optimitza per DoE i es caracteritza fisicoquímicament; en l'estudi d'alliberament, el riluzole lliure mostra una sortida acumulada del 75% a 24 h, mentre que les RLZ-NLCs presenten un esclat inicial seguit d'un alliberament sostingut fins al 45% a 24 h, coherent amb una modulació real de la cinètica. Amb seguretat, les RLZ-NLCs es classifiquen com a no irritants al test HET-CAM, a diferència del fàrmac lliure, que es descriu com a lleument irritant. I, funcionalment, l'efecte antiproliferatiu sobre queratinòcits HaCaT es manté amb la formulació, mentre que les NLCs buides no mostren efecte antiproliferatiu; a més, es discuteix que l'alliberament

sostingut podria contribuir a neutralitzar la capacitat angiogènica observada amb el fàrmac lliure en el model *in ovo*. Tot plegat exemplifica, amb dades, la idea central de la revisió: en patologia cutània, el “vehicle” no és accessori, sinó una part del mecanisme terapèutic [280].

Finalment, en la revisió de les nanoplataformes biodegradables per al lliurament d'antígens amplien el relat cap a un altre escenari on la mateixa lògica es fa visible: en vacunació i immunoteràpia oncològica, la resposta immune depèn críticament de com es governa l'exposició de l'antigen i la seva captació per cèl·lules presentadores d'antigen (APCs). Es revisa com paràmetres com mida, càrrega i hidrofobicitat, i la funcionalització superficial, condicionen biodistribució, drenatge limfàtic i activació immunitària en nanopartícules polimèriques. [281] S'introdueix els hidrogels/nanogels com a sistemes que poden protegir antígens i ajustar l'alliberament (incloent-hi respostes a estímuls com pH o condicions redox/temperatura), i situa les microneedles com a plataforma de lliurament transdèrmic/intradèrmic amb potencial de càrrega d'hidrogels i nanopartícules, resumint-ne propietats i avantatges en una taula de característiques principals [282].

En conjunt, aquests textos permeten formular una idea amb valor discursiu: allò que canvia la farmacologia no és només la diana, sinó l'arquitectura de l'arribada. En psoriasi, on la barrera cutània és alhora escut i problema, i en immunoteràpia, on l'eficàcia depèn del diàleg amb APCs, les nanoplataformes (NLCs, nanopartícules polimèriques, hidrogels i microneedles) emergeixen com a dispositius capaços de reescriure la relació entre molècula, teixit i temps [279, 282].

Des de la inhibició de la fusió viral fins a la permeabilització bacteriana, passant per la reorganització lipídica i la modulació terapèutica controlada, els resultats disponibles convergeixen en un marc conceptual unificador: la membrana lipídica emergeix com una diana biofísica funcional, les propietats estructurals i termodinàmiques de la qual poden determinar el resultat biològic. Paràmetres com la fluïdesa, l'ordre lipídic, la coexistència de fases, el potencial dipolar o la permeabilitat no constitueixen variables accessòries, sinó determinants centrals en la regulació dels processos infecciosos i en el disseny racional de noves estratègies terapèutiques. En aquest context, l'estudi de la interacció de molècules amb potencial terapèutic requereix

inevitablement l'ús de membranes model; tanmateix, **emergeix una paradoxa suggestiva: allò que estudiem amb models experimentals esdevé un model conceptual** per pensar la vida mateixa, en tant que la membrana defineix límits, intercanvis i equilibris que sustenten l'organització i l'adaptabilitat dels sistemes vius.

7. DE LA INTERFÍCIE BIOFÍSICA A LA METÀFORA DE LA VIDA

La metàfora de la membrana s'ha consolidat com una imatge conceptual d'una fecunditat excepcional per pensar els límits, les fronteres i les relacions d'intercanvi entre un dins i un fora. Aquesta fecunditat no és merament literària, en teoria cognitiva de la metàfora, sinó que opera com a marc que orienta la percepció i l'acció, perquè projecta estructures d'experiència corpòria sobre dominis abstractes [283].

Així, la membrana ofereix una alternativa a la imaginació del mur: substitueix la separació rígida per un llinar regulador, i permet descriure el límit selectiu com a condició relacional, un lloc on la distinció és inseparable del contacte.

Aquesta potència interpretativa prové, en bona part, d'un referent àmpliament exposat: la membrana biològica. Hem vist com el model del mosaic fluid va establir la membrana com una arquitectura dinàmica on lípids i proteïnes no configuren una barrera passiva, sinó una interfície funcional, termodinàmicament plausible i capaç de reorganització constant [2]. En la recerca posterior, aquesta dinàmica s'ha refinat fins a descriure la membrana com un sistema organitzat per principis de compartimentació i mobilitat lateral, amb conseqüències directes sobre reconeixement molecular i transducció de senyals [24]. I, encara més, ha quedat clar que l'estabilitat biològica depèn sovint d'ajustos continus de propietats físiques. La homeoviscositat, l'adaptació de la composició lipídica per mantenir una viscositat compatible amb la funció, il·lustra que la identitat del sistema no s'aconsegueix malgrat el canvi, sinó mitjançant una regulació activa del canvi [284].

Tanmateix, justament perquè la metàfora és poderosa, exigeix una lectura crítica. Les metàfores científiques que migren cap a l'esfera moral o política poden aclarir fenòmens complexos, però també poden naturalitzar categories històriques (puresa/contaminació, normal/anòmal, dins/fora) i legitimar respostes defensives com si fossin inevitables. La crítica clàssica a les metàfores de la malaltia mostra com certs imaginaris incrementen l'estigma i simplifiquen indegudament processos biològics i socials [285]. Aplicat a la membrana, això obliga a evitar un paral·lelisme del vocabulari immunològic (invasió/

defensa/enemic) cap a persones, idees o col·lectius.

Aquí la genealogia històrica és decisiva. Laura Otis ha mostrat com, al segle XIX, la progressiva consolidació de la biologia cel·lular i l'impacte cultural de la teoria microbiana van convertir la membrana en una figura central per imaginar el cos, la nació i la ment. La descripció científica de barreres semipermeables i d'amenaques invisibles va fertilitzar discursos socials sobre protecció, invasió, por al contagi i fantasmes de contaminació [283].

La membrana deixava de ser només una estructura biològica per esdevenir un llenguatge disponible per pensar fronteres ideològiques i morals: un límit que cal governar perquè es percep alhora necessari i vulnerable.

Aquesta tradició és especialment eloqüent perquè revela un diàleg bidireccional entre ciència i cultura. La literatura i la política no només reflecteixen la ciència, sinó que també modelen les seves imatges i la seva retòrica. En el marc dels debats sobre identitat i alteritat, la membrana opera com un instrument de conceptualització: descriu la necessitat de delimitar per existir i, alhora, la impossibilitat d'existir sense intercanvi. En termes estrictes, **una frontera absolutament impermeable equival a la mort del sistema; una frontera totalment porosa, a la dissolució de la identitat**. Aquesta ambivalència és, precisament, el seu valor hermenèutic.

Els exemples il·lustratius guanyen força quan la metàfora es posa a prova en fenòmens concrets. En farmacologia, per exemple, la membrana és literalment una diana, intervenir sobre la vida és, sovint, intervenir sobre l'indar i permeabilitats. Hem vist com les polimixines (com la polimixina B) apunten a lipopolisacàrids (LPS) de l'embolcall de bacteris gramnegatius i desorganitzen barreres d'una manera que depèn del context fisiològic de la cèl·lula, i fins i tot de la seva activitat metabòlica [286]. Aquesta dependència recorda una lliçó útil per a la metàfora: la selectivitat no és una propietat moral del filtre, sinó una propietat situada d'un sistema en funcionament. En un altre registre, l'amfotericina B mostra com la selectivitat de membrana pot ser alhora virtut i risc; la seva activitat s'associa a la interacció preferent amb ergosterol en membranes fúngiques (en contrast amb coles-

terol), però aquesta preferència no anul·la del tot la toxicitat, perquè els l·lindars materials rarament són absoluts [287].

En l'Àmbit social, la metàfora il·lumina processos de selecció cultural: comunitats i individus operen com membranes que filtren llengües, normes, tecnologies i relats. El punt crític és el criteri; la selecció pot ser oberta i adaptativa (integrant diferència i generant aprenentatge) o bé restrictiva i jeràrquica (construint exclusió). Aquesta tensió es veu amb claredat en contextos de mobilitat internacional. La metàfora de la bombolla d'expatriats s'ha utilitzat per descriure fronteres comunitàries transparents però efectives, espais protectors que no impliquen aïllament total, sinó graus variables de separació i integració amb l'entorn local [288]. La idea és especialment útil perquè evita la dicotomia simple integrat/no integrat i descriu la porositat com a variable regulable.

En el món tecnològic, la metàfora adquireix una literalitat nova. Les interfícies digitals actuen com membranes informacionals ja que no només permeten comunicació, sinó que tradueixen, filtren i condicionen què travessa el l·lindar entre subjecte i entorn digital. La teoria cultural de la interfície ha insistit en aquest caràcter d'efecte de mediació, on la superfície és ja una política de representació i d'accés. L'exemple de gran valor pedagògic és la personalització algorítmica, l'usuari percep un flux natural d'informació, però el l·lindar està modelat per criteris opacs que poden restringir l'exposició a la diferència amb conseqüències sobre opinió pública i identitat [289]. Aquí la membrana deixa de ser només figura i esdevé descripció funcional, una semipermeabilitat que decideix quina realitat és visible.

Aquesta mateixa lògica de la membrana es pot aplicar a les institucions del coneixement. La universitat institució que conec bé, entesa com un organisme viu, necessita una permeabilitat selectiva prou oberta per incorporar noves preguntes, llenguatges i tecnologies; i prou autònoma per preservar el temps llarg del coneixement i la funció crítica. En el debat sobre avaluació científica, aquesta permeabilitat s'ha vist tensionada per l'ús de mètriques com a substitut del judici expert [290]. Quan el sistema d'avaluació es torna hipertròfic, la membrana institucional pot rigidificar-se, disminueix la fluidesa d'intercanvis (idees, reconeixement, cooperació) i augmenten les respostes defensives.

En aquest punt, també convé evitar psicologismes, les emocions com la comparació persistent, l'enveja o la hipervigilància reputacional no són només trets individuals, sinó respostes plausibles a entorns estructuralment competitiu i amb recursos percebuts com a escassos. La psicologia organitzacional descriu l'enveja laboral com un fenomen emergent en contextos d'alta comparació social i competència, amb impacte potencial sobre confiança i cooperació [291]. La metàfora permet, així, formular una exigència institucional, la selectivitat és necessària per garantir rigor, però només una permeabilitat prou flexible manté capacitat adaptativa i vitalitat col·lectiva. La metàfora ofereix una síntesi d'alt valor per pensar la modernitat. Sense límit no hi ha identitat; sense intercanvi no hi ha vida. El seu interès no és proporcionar una consigna (obrir o tancar), sinó imposar una disciplina del pensament: descriure la qualitat del llindar, els criteris del filtratge i els costos de la rigidesa. Com en els sistemes biològics, el repte és governar una porositat responsable: protegir sense aïllar, connectar sense dissoldre, seleccionar sense convertir la diferència en amenaça.

En el context contemporani, també pot oferir una imatge especialment fecunda per pensar la intel·ligència artificial o avançada (IA) com sembla que es prefereix anomenar. En aquest cas, la metàfora resulta útil perquè la IA no s'entén bé ni com una entitat completament autònoma ni com un instrument merament passiu, sinó com una interfície activa en què es produeixen intercanvis continus entre dades, models, infraestructures, institucions i subjectes humans. Com una membrana, aquests sistemes no només separen un dins i un fora, sinó que regulen el que entra, el que surt, el que es transforma i el que es fa visible [292–293].

Aquesta metàfora permet, a més, desplaçar-nos d'una imatge excessivament antropomòrfica de la IA cap a una comprensió més relacional i més material. Diversos treballs recents han advertit que les metàfores humanitzadores tendeixen a ocultar que els sistemes d'IA són, en realitat, sistemes sociotècnics configurats per dades, treball humà, disseny d'interfícies i infraestructures de càlcul. Pensar-los en termes de membrana pot ser més precís que pensar-los en termes de persona, la membrana no pensa com un subjecte, però selecciona, media, respon i manté una certa coherència funcional enmig d'un flux constant d'interaccions [294].

La metàfora també és suggestiva des del punt de vista ètic i polític. Una membrana no és només una superfície d'intercanvi; és també un dispositiu de protecció, de vulnerabilitat i de selecció. Aplicada a la IA, aquesta idea permet pensar qüestions tan centrals com el filtratge de continguts, la governança de les dades, la preservació de la privadesa, la modulació de riscos o la necessitat de mantenir fronteres operatives entre decisió humana i automatització. No es tracta, doncs, només d'una tecnologia que processa informació, sinó d'un conjunt de llindars regulats que decideixen quins senyals són admesos, quines respostes són possibles i quines formes de relació entre l'humà i la màquina esdevenen socialment acceptables [292].

Finalment, la metàfora de la membrana permet entendre que la relació entre humans i IA no és estàtica, sinó coevolutiva. Tal com passa en els sistemes vius, la frontera no és aquí una línia immòbil, sinó una zona de negociació i d'adaptació contínua. La IA transforma les pràctiques humanes, però també és transformada pels usos, les expectatives i els marcs institucionals que la contenen. En aquest sentit, parlar de membrana potser és més fecund que parlar de mur o d'eina perquè suggereix alhora identitat i permeabilitat, autonomia relativa i dependència, protecció i intercanvi. I és justament en aquesta tensió on la metàfora recupera tota la seva força per pensar, avui, la nostra convivència amb les intel·ligències artificials [295].

Només queda desitjar que el coneixement que neix d'aquestes interfícies, entre molècules, disciplines i mirades, continuï transformant-se en comprensió, en salut i en responsabilitat compartida.

Moltes gràcies.

8. REFERÈNCIES

1. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson AD, Lewis J, Raff M, et al. *Essential Cell Biology*. New York: Garland Science; 2015.
2. Singer S.J, Nicolson G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 1972; **175** (4023): 720-31. Doi: <https://doi.org/10.1126/science.1174621>.
3. Van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; **9**(2):112-124. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>.
4. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 1997; **387**(6633):569-572. Doi: <https://doi.org/10.1038/42408>.
5. Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*. 2010; **327**(5961): 46-50. Doi: <https://doi.org/10.1126/science.1174621>.
6. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000; **1**(1): 31-39. Doi: <https://doi.org/10.1038/35036052>.
7. Sezgin E, Levental I, Mayor S, et al. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017; **18**:361-374. Doi: <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.16>.
8. Ikonen E. Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2001; **13**(4):470-477. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(00\)00238-6](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(00)00238-6).
9. Israelachvili JN, Marčelja S, Horn RG. Physical principles of membrane organization. *Q Rev Biophys*. 1980; **13**(2):121-200. Doi: <https://doi.org/10.1017/s0033583500001645>.
10. Seddon, J. M. Structure of the inverted hexagonal (HII) phase, and non-lamellar phase transitions of lipids. *Biochim Biophys Acta -Rev on Biomem*, 1990; **1031**(1), 1-69. Doi: [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(90\)90002-t](https://doi.org/10.1016/0304-4157(90)90002-t).
11. Seddon JM, Templer RH. Polymorphism of lipid-water systems. In: Lipowsky R, Sackmann E, editors. *Handbook of Biological Physics*. Vol. 1. Amsterdam: North-Holland; 1995. p.97-160. Doi: [http://doi.org/10.1016/s1383-8121\(06\)80020-5](http://doi.org/10.1016/s1383-8121(06)80020-5).
12. Huang Y, Gui S. *Factors affecting the structure of lyotropic liquid crystals and the correlation between structure and drug diffusion*. *RSC Adv*. 2018; **8**: 6978–6987. DOI: 10.1039/C7RA12008G
13. Seddon JM, Templer RH. Cubic phases of self-assembled amphiphilic aggregates. *Philos Trans R Soc Lond A*. 1993; **344** (1672):377-401. Doi: <https://doi.org/10.1098/rsta.1993.0092>
14. Shechter E. *Biochimie et biophysique des membranes* (aspects structuraux et fonctionnels). 2e éd. Paris: Masson; 1993.
15. Marsh D. *Handbook of Lipid Bilayers*. Boca Raton (FL): CRC Press; 2013. Doi: <https://doi.org/10.1201/b11712>.

16. Marsh D. Equation of state for phospholipid self-assembly. *Biophys. J.* 2016; **110**(1):188-196. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.11.012>.
17. Israelachvili JN. *Intermolecular and Surface Forces*. 3rd ed. London: Academic Press; 2011.
18. Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill Jr. AH, Murphy RC, ... Edward AD. A comprehensive classification system for lipids. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2005; **107**(5):337-364. Doi: <https://doi.org/10.1002/ejlt.200405001>
19. Fantini J, Garmy N, Mahfoud R, Yahi N. Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimer's and prion diseases. *Expert Rev Mol Med.* 2002; **4**(27):1-22. Doi: <https://doi.org/10.1017/s1462399402005392>
20. Brown DA, London E. Structure and function of sphingolipid-and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 2000; **275**(23):17221-17224. Doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.r000005200>.
21. Ikonen E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; **9**(2):125-138. Doi: <https://doi.org/10.1038/nrm2336>.
22. Paradies G, Paradies V, De Benedictis V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochim Biophys Acta -Bioenergetics.* 2014; **1837**(4):408-417. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.10.006>.
23. Mashanov G I, Nenasheva TA, Mashanova A, Lape R, Birdsall N J, Sivilotti L, Molloy J E. Heterogeneity of cell membrane structure studied by single molecule tracking. *Faraday Discuss.* 2021; **232**: 358-374. Doi <https://doi.org/10.1039/D1FD00035G>.
24. Kusumi, A, Fujiwara, T K, Chadda R, Xie M, Tsunoyama, T A, Kalay, Z., ... Suzuki, K G. Dynamic organizing principles of the plasma membrane that regulate signal transduction: commemorating the fortieth anniversary of Singer and Nicolson's fluid-mosaic model. 2012. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **28**, 215-250. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100809-151736>.
25. Di Paolo G, De Camilli P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature.* 2006; **443**(7112): 651-657. Doi: <https://doi.org/10.1038/nature05185>.
26. Lemièrè J, Valentino F, Campillo C, Sykes C. How cellular membrane properties are affected by the actin cytoskeleton. *Biochimie.* 2016; **130**:33–40. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.09.019>.
27. Trimble WS, Grinstein S. Barriers to the free diffusion of proteins and lipids in the plasma membrane. *J Cell Biol.* 2015; **208**(3):259–271. Doi: <https://doi.org/10.1083/jcb.201410071>.
28. Feigenbaum A, Dole P, Aucejo S, Dainelli D, de la Cruz Garcia C, Hankemeier T, et al. Functional barriers: properties and evaluation. *Food Addit Contam.* 2005; **22**(10):956–967. Doi: <https://doi.org/10.1080/02652030500227776>
29. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts, K, Walter P. Ion channels

- and the electrical properties of membranes. In: *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York: Garland Science; 2002. Disponible a: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26910/>
30. Cevc G. Membrane electrostatics. *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Bioembr.* 1990; **1031**(3):311-382. Doi: [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(90\)90015-5](https://doi.org/10.1016/0304-4157(90)90015-5).
 31. McLaughlin S. The electrostatic properties of membranes. *Annu Rev Biophys Biophys Chem.* 1989; **18**:113-136. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.18.060189.000553>.
 32. Sarkar P, Chattopadhyay A. Membrane dipole potential: an emerging approach to explore membrane organization and function. *J Phys Chem B.* 2022; **126**(24):4415-4430. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.2c02476>.
 33. Zhan H, Lazaridis T. Influence of the membrane dipole potential on peptide binding to lipid bilayers. *Biophys Chem.* 2012; **161**:1-7. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2011.10.002>.
 34. ISO. Colloidal systems — Methods for zeta-potential determination — Part 2: Optical methods (ISO 13099-2:2025). Geneva: International Organization for Standardization; 2025. Available from: ISO, <https://www.iso.org/standard/86762.html>
 35. Yong-guang S, Xue-lian W, Yong C, Wang-jun Q, Peng-mei L and Lei Z. Machine learning predicts lipid emulsion stability in parenteral nutrition using multi-laboratory literature data. *Front. Nutr.* 2025; **12**:1668464. Doi: <https://doi.org/10.3389/fnut.2025.1668464>.
 36. Helfrich W. Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments. *Z Naturforsch C.* 1973; **28**(11):693-703. doi: <https://doi.org/10.1515/znc-1973-11-1209>.
 37. McMahon HT, Gallop JL. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature.* 2005; **438**(7068): 590-596. doi: <https://doi.org/10.1038/nature04396>.
 38. McMahon HT, Boucrot E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011; **12**(8):517-533. doi: <https://doi.org/10.1038/nrm3151>.
 39. Simunovic M, Evergren E, Callan-Jones A, Bassereau P. Curving cells inside and out: roles of BAR domain proteins in membrane shaping and its cellular implications. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2019; **35**:111-129. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-060558>.
 40. Cullis PR, de Kruijff B. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1979; **559**(4):399-420. doi: [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(79\)90012-1](https://doi.org/10.1016/0304-4157(79)90012-1).
 41. Callan-Jones A, Sorre B, Bassereau P. Curvature-driven lipid sorting in biomembranes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011; **3**(2): a004648. doi: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004648>.
 42. Israelachvili JN. Intermolecular and Surface Forces. London: Academic Press; 2011.
 43. De Nicola, A, Hezaveh, S, Zhao, Y, Kawakatsu, T, Roccatano, D, Milano,

- G. (2014). Micellar drug nanocarriers and biomembranes: how do they interact?. *hys. Chem. Chem. Phys.*, **16**(11), 5093-5105. Doi: <https://doi.org/10.1039/C3CP54242D>.
44. Zimmerberg J, Kozlov MM. How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006; **7**(1):9-19. doi: <https://doi.org/10.1038/nrm1784>.
 45. Chen A, Leikina E, Melikov K, Podbilewicz B, Kozlov MM, Chernomordik LV. Fusion-pore expansion during syncytium formation is restricted by an actin network. *J Cell Sci.* 2008; **121**(21):3619-3628. Doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.032169>.
 46. Jahn R, Grubmüller H. Membrane fusion. *Curr Opin Cell Biol.* 2002; **14**:488-495. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(02\)00356-3](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(02)00356-3).
 47. Chernomordik LV, Zimmerberg J, Kozlov MM. Membranes of the world unite! *J. Cell Biol.* 2006; **175**(2):201. Doi: <https://doi.org/10.1083/jcb.200607083>.
 48. Weinreb G, Lentz BR. Analysis of membrane fusion as a two-state sequential process: evaluation of the stalk model. *Biophys. J.* 2007; **92**(11):4012-4029. Doi: <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.090043>.
 49. Yang Z, Gou L, Chen S, Li N, Zhang S, Zhang L. Membrane fusion involved in neurotransmission: glimpse from electron microscope and molecular simulation. *Front Mol Neurosci.* 2017;**10**:168. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00168>.
 50. Lentz BR. PEG as a tool to gain insight into membrane fusion. *Eur Biophys J.* 2007; **36**(4):315-326. <https://doi.org/10.1007/s00249-006-0097-z>
 51. Papahadjopoulos D, Nir S, Düzgünes N. Molecular mechanisms of calcium-induced membrane fusion. *J Bioenerg Biomembr.*1990; **22**(2):157-179. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF00762944>
 52. Stryer L, Haugland RP. Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc Natl Acad Sci.* 1967; **58**(2):719-726. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.58.2.719>.
 53. Markossian S, Grossman A, Baskir H, Arkin M, Auld D, Austin C, et al. ed. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.
 54. Teissié J, Eynard N, Gabriel B, Rols MP. Electropermeabilization of cell membranes. *Adv Drug Deliv Rev.* 1999; **35**(1):3-19. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(98\)00060-x](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(98)00060-x).
 55. Harrison SC. Viral membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2008; **15**(7):690-698. Doi: <https://doi.org/10.1038/nsmb.1456>.
 56. Wessels L, Weninger K. Physical aspects of viral membrane fusion. *ScientificWorldJournal.* 2009; **9**(1):764-780. Doi: <https://doi.org/10.1100/tsw.2009.76>.
 57. Devaux PF, Morris R. Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. *Traffic.* 2004; **5**(4):241-246. Doi: <https://doi.org/10.1046/j.1525-1413.2004.00041.x>.

- org/10.1111/j.1600-0854.2004.0170.x.
58. Pomorski T, Menon AK. Lipid flippases and their biological functions. *Cell. Mol. Life Sci.* 2006; **63**(24):2908-2921. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6167-7>.
 59. Menon AK. Sterol gradients in cells. *Current Opinion in Cell Biology.* 2018; **53**: 37-43. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.04.012>
 60. Rothman JE, Lenard J. Membrane Asymmetry: The nature of membrane asymmetry provides clues to the puzzle of how membranes are assembled. *Science.* 1977; **195**(4280):743-753. Doi: <https://doi.org/10.1126/science.402030>
 61. Exton JH. Phosphoinositide phospholipases and G proteins in hormone action. *Annu. Rev. Physiol.* 1994; **56**(1):349-369. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.56.030194.002025>
 62. Verkleij AJ, Zwaal RF, Roelofsen B, Comfurius P, Kastelijn D, van Deenen LL. The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1973; **323**(2):178-193. Doi: [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(73\)90143-0](https://doi.org/10.1016/0005-2736(73)90143-0).
 63. McConnell HM, Kornberg RD. Inside-outside transitions of phospholipids in vesicle membranes. *Biochemistry.* 1971; **10**(7):1111-1120. Doi: <https://doi.org/10.1021/bi00783a003>.
 64. Op den Kamp JAF. Lipid asymmetry in membranes. *Ann. Rev. Biochem.* 1979; **48**(1): 47-71. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.48.070179.000403>.
 65. Hope MJ, Redelmeier TE, Wong KF, Rodriguez W, Cullis PR, et al. Phospholipid asymmetry in large unilamellar vesicles induced by transmembrane pH gradients. *Biochemistry.* 1989; **28**(10):4181-4187. Doi: <https://doi.org/10.1021/bi00436a009>.
 66. Devaux PF. Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry.* 1991; **30**(5): 1163-1173. Doi: <https://doi.org/10.1021/bi00219a001>.
 67. Kornberg RD, McConnell HM. Lateral diffusion of phospholipids in a vesicle membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1971; **68**(10):2564-2568. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.68.10.2564>.
 68. Schram V, Tocanne JF, Lopez A. Influence of obstacles on lipid lateral diffusion: computer simulation of FRAP experiments and application to proteoliposomes and biomembranes. *Eur Biophys J.* 1994; **23**(5):337-348. Doi: <https://doi.org/10.1007/bf00188657>
 69. Chen Y, Lagerholm BC, Yang B, Jacobson K. Methods to measure the lateral diffusion of membrane lipids and proteins. *Methods.* 2006; **39**(2):147-153. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.05.008>
 70. Korlach J, Schwille P, Webb WW, Feigenson GW. Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999; **96**(15): 8461-8466. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.96.15.8461>.

71. Milhiet PE, Giocondi MC, Le Grimellec C. AFM imaging of lipid domains in model membranes. *Sci. World J.* 2003; **3**(1):59-74. Doi: <https://doi.org/10.1100/tsw.2003.12>.
72. Veatch SL, Keller SL. Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol. *Biophys. J.* 2003; **85**(5): 3074-3083. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74726-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74726-2).
73. Veatch SL, Keller SL. Miscibility phase diagrams of giant vesicles containing sphingomyelin. *Phys Rev Lett.* 2005; **94**(14):148101. Doi: <https://doi.org/10.1103/physrevlett.94.148101>.
74. Giles CH, Forrester SD, Roberts GG. Chapter 1: Historical Introduction. In: Roberts G, editor. *Langmuir-Blodgett Films*. London: Plenum Press; 1990. Doi: <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-3716-2>.
75. Tanford C. *Ben Franklin stilled the waves: An informal history of pouring oil on water with reflections on the ups and downs of scientific life in general*. New York: Oxford University Press; 2004.
76. Kleinzeller A. Chapter 1 Charles Ernest Overton's Concept of a Cell Membrane. Davld W. Deamer, Arnost Kleinzeller, Douglas M. Fambrough, *Current Topics in Membranes*, Academic Press, Volume 48,1999, Pages 1-22, [https://doi.org/10.1016/S0070-2161\(08\)61039-4](https://doi.org/10.1016/S0070-2161(08)61039-4).
77. Langmuir I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. 1917. *J Am Chem Soc.* **39** (9):1848-1906. Doi: <https://doi.org/10.1021/ja02254a006>.
78. Gorter E, Grendel F. On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *J Exp Med.* 1925. 41:439-443. doi: 10.1084/jem.41.4.439.
79. Bangham AD, Horne RW. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J Molec Biol.* 1964; **8**: 660-668. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(64\)80115-7](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(64)80115-7).
80. Yu J, Fischman DA, Steck TL. Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents. *J Supramol Struct.* 1973; **1**:233-248. <https://doi.org/10.1002/jss.400010308>.
81. McConnell M, Tamm LK, Weis RM. Periodic structures in lipid monolayer phase transitions. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1984; **81**:3249-3253. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.81.10.3249>
82. Angelova MI, Dimitrov SD . Liposome electroformation. *Faraday Discuss.* 1986. **81**:303-311. Doi: <https://doi.org/10.1039/DC9868100303>.
83. Van Meer V, Stelzer EH, Wijnaendts-van-Resandt RW, Simons K. Sorting of sphingolipids in epithelial (Madin-Darby canine kidney) cells. *J Cell Biol.* 1987; **105**:1623-1635. <https://doi.org/10.1083/jcb.105.4.1623>
84. Sezgin E, Schwille P. Model membrane platforms to study protein-membrane interactions. *Mol Membr Biol.* 2012; **29**(5):144-154. Doi: <https://doi.org/10.3109/09687688.2012.700490>.
85. Bacia K, Schuette CG, Kahya N, Jahn R, Schwille P. SNAREs prefer liquid-disordered over 'raft' (liquid-ordered) domains when reconstitu-

- ted into giant unilamellar vesicles. *J Biol Chem*. 2004. **279**:37951-37955. Doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.m407020200>.
86. Kahya N, Brown DA, Schwille P. Raft partitioning and dynamic behavior of human placental alkaline phosphatase in giant unilamellar vesicles. *Biochemistry*. 2005;44(20):7479-7489. Doi: <https://doi.org/10.1021/bi047429d>.
 87. Baumgart T, Capraro BR, Zhu C, Das SL. Thermodynamics and mechanics of membrane curvature generation and sensing by proteins and lipids. *Ann Rev Phys Chem*. 2011; 62:483-506. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.012809.103450>.
 88. Scott RE. Plasma-membrane vesiculation - new technique for isolation of plasma-membranes. *Science*. 1976; **194**:743-745. Doi: <https://doi.org/10.1126/science.982044>.
 89. Siontorou CG, Nikoleli GP, Nikolelis DP, Karapetis SK. Artificial lipid membranes: past, present, and future. *Membranes*. 2017; **7**(3):38. Doi: <https://doi.org/10.3390/membranes7030038>.
 90. Chan YHM, Boxer SG. Model membrane systems and their applications. *Curr Opin Chem Biol*. 2007; **11**(6):581-587. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.09.020>.
 91. Tamm LK, McConnell HM. Supported phospholipid bilayers. *Biophys J*. 1985; **47**(1):105-113. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(85\)83882-0](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(85)83882-0).
 92. Pérez-Conesa S, Testa I, Delemotte L. Identification of electroporation sites in the complex lipid organization of the plasma membrane. *eLife*. 2022; **11**:e74773. doi: <https://doi.org/10.7554/eLife.74773>.
 93. Luchini A, Vitiello G. Mimicking the Mammalian Plasma Membrane: An Overview of Lipid Membrane Models for Biophysical Studies. *Biomimetics*. 2021; **6**(1):3. doi: <https://doi.org/10.3390/biomimetics6010003>.
 94. Peetla C, Stine A, Labhassetwar V. Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery. *Mol Pharm*. 2009; **6**(5):1264-1276. doi: <https://doi.org/10.1021/mp9000662>.
 95. Castellana ET, Cremer PS. Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design. *Surf Sci Rep*. 2006; **61**(10):429-444. doi: <https://doi.org/10.1016/j.surfrep.2006.06.001>.
 96. Routledge SJ, Linney JA, Goddard AD. Liposomes as models for membrane integrity. *Biochem Soc Trans*. 2019; **47**(3):919-932. Doi: <https://doi.org/10.1042/BST20190123>.
 97. Stefaniu C, Brezesinski G, Möhwald H. Langmuir monolayers as models to study processes at membrane surfaces. *Adv Colloid Interface Sci*. 2014; **208**:197-213. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0001-8686\(02\)00071-4](https://doi.org/10.1016/s0001-8686(02)00071-4).
 98. Dynarowicz-Latka P, Wnętrzak A, Chachaj-Brekiesz A. Advantages of the classical thermodynamic analysis of single- and multi-component Langmuir monolayers from molecules of biomedical importance: theory and applications. *J R Soc Interface*. 2024; **21**(210):20230559. Doi: <https://doi.org/10.1098/rsif.2023.0559>.

99. Brockman H. Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? *Curr Opin Struct Biol.* 1999; **9**(4):438-443. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(99\)80061-x](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(99)80061-x)
100. Chávez A, Pujol M, Haro I, Alsina MA, Cajal Y. Miscibility of the hepatocyte membrane lipids at the air/water interface and interaction with the sequence (110-121) of the capsid protein VP3 of hepatitis A virus. *Langmuir.* 1999; **15**:1101-1107. Doi: <https://doi.org/10.1021/la981022q>.
101. Nunes C, Brezesinski G, Lopes D, Lima JLFC, Reis S, Lúcio M. Lipid-drug interaction: biophysical effects of tolmetin on membrane mimetic systems of different dimensionality. *J Phys Chem B.* 2011; **115**(43):12615–12623. Doi: <https://doi.org/10.1021/jp206013z>.
102. Vié V, Van Mau N, Chaloin L, Lesniewska E, Le Grimellec C, Heitz F. Detection of peptide-lipid interactions in mixed monolayers, using isotherms, atomic force microscopy, and Fourier transform infrared analyses. *Biophys J.* 2000; **78**(2):846-856. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(00\)76642-2](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(00)76642-2)
103. Fendler JH. Microemulsions, micelles, and vesicles as media for membrane mimetic photochemistry. *J Phys Chem.* 1980; **84**(12):1485-1491. Doi: <https://doi.org/10.1021/j100449a012>
104. Jelinek R, Kolusheva S. Membrane interactions of host-defense peptides studied in model systems. *Curr Protein Pept Sci.* 2005; **6**(1):103-114. doi: <https://doi.org/10.2174/1389203053027511>.
105. Maget-Dana R. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 1999; **1462**(1-2):109-140. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(99\)00203-5](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(99)00203-5)
106. Gaines Jr. GL. Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces. New York, USA: Wiley; 1966.
107. Sánchez-Martín MJ, Amigo JM, Pujol M, Haro I, Alsina MA, Busquets MA. Fluorescence study of the dynamic interaction between E1(145-162) sequence of hepatitis GB virus C and liposomes. *Anal Bioanal Chem.* 2009; **394**:1003-1010. doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2593-8>.
108. Alsina MA, Mestres C, Rabanal F, Busquets MA, Reig F. *Langmuir* 1993; **9**(4):1129–1133. <https://doi.org/10.1021/la00028a042>
109. Mestres C, Ortiz A, Haro I, Reig F, Alsina MA. Influence of phospholipidic charge on the interaction of a multiple antigenic peptide from hepatitis A virus with monolayers and bilayers. *Langmuir.* 1997; **13**(21):5669-5673. Doi: <https://doi.org/10.1021/la960737v>.
110. Sánchez-Martín MJ, Haro I, Alsina MA, Busquets MA, Pujol M. A Langmuir monolayer study of the interaction of E1(145-162) hepatitis G virus peptide with phospholipid membranes. *J Phys Chem B.* 2010; **114**:448-456. Doi: <https://doi.org/10.1021/jp906900k>.
111. Perez-Lopez S, Vila-Romeu N, Alsina Esteller MA, Espina M, Haro I, Mestres C. Interaction of GB virus C/hepatitis G virus synthetic peptides

- with lipid Langmuir monolayers and large unilamellar vesicles. *J Phys Chem B*. 2009; **113**(1):319-327. Doi: <https://doi.org/10.1021/jp806938y>
112. Larios C, Miñones J, Haro I, Alsina MA, Busquets MA, Miñones Trillo J. Study of adsorption and penetration of E2(279-298) peptide into Langmuir phospholipid monolayers. *J Phys Chem B*. 2006; **110**(46): 23292-23299. Doi: <https://doi.org/10.1021/jp0628582>.
 113. Alsina MA, Mestres C, Garcia Anton JM, Espina M, Haro I, Reig F. Interaction energies of cholesterol, phosphatidylserine, and phosphatidylcholine in spread mixed monolayers at the air-water interface. *Langmuir*. 1991;**7**(5):975-977. doi:10.1021/la00053a026. Doi: <https://doi.org/10.1021/la00053a026>.
 114. Eeman M, Deleu M. From biological membranes to biomimetic model membranes. *Biotechnol Agron Soc Environ*. 2010; **14**(4):719-736. Doi: <https://hdl.handle.net/2268/81993>.
 115. McConlongue CW, Vanderlick TK. A close look at domain formation in DPPC monolayers. *Langmuir*. 1997; **13**:7158-7164. Doi: <https://doi.org/10.1021/la970898e>.
 116. Dufrêne YF, Barger WR, Green JBD, Gu L. Nanometer-scale surface properties of mixed phospholipid monolayers and bilayers. *Langmuir*. 1997; **13**:4779-4784. Doi: <https://doi.org/10.1021/la970221r>
 117. Reviakine I, Brisson A. Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy. *Langmuir*. 2000; **16**(4):1806-1815. Doi: <https://doi.org/10.1021/la9903043>
 118. Milhiet PE, Giocondi MC, Le Grimellec C, Van Mau N, Heitz F, Le Grimellec, C. Domain formation in models of the renal brush border membrane outer leaflet. *Biophys J*. 2001; **81**(1):547-555. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(01\)75721-9](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(01)75721-9).
 119. Motschmann H, Teppner R. Ellipsometry in interface Science. *Studies in Interface Science*. 2001; **11**: 1-42. doi:10.1016/S1383-7303(01)80014-4
 120. Sung W, Kim D, Shen YR. Sum-frequency vibrational spectroscopic studies of Langmuir monolayers. *Curr Appl Phys*. 2013;**13**(4): 619-632. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cap.2012.12.002>.
 121. Kim EM, Jeong HJ. Liposomes: biomedical applications. *Chonnam Med J*. 2021; **57**(1):27-35. Doi: <https://doi.org/10.4068/cmj.2021.57.1.27>.
 122. Vemuri S, Rhodes CT. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm Acta Helv*. 1995; **70**(2): 95-111. Doi: [https://doi.org/10.1016/0031-6865\(95\)00010-7](https://doi.org/10.1016/0031-6865(95)00010-7).
 123. Menger FM, Lee JJ, Aikens P, Davis S. Vesicle size: dependence on experimental parameters. *J Colloid Interface Sci*. 1989; **129**(1):185-191. Doi: [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(89\)90429-3](https://doi.org/10.1016/0021-9797(89)90429-3)
 124. Subba Reddy K, Durga Srinivasa Rao M, Venkatesh P. A review on: liposomes, *Int J Indig Herb Drug*. 2022; **7**(1): 08-11. Doi: <https://doi.org/10.46956/ijjhd.v7i1.271>.
 125. Lasic DD. The mechanism of vesicle formation. *Biochem J*. 1988; **256**(1):1-11 Doi: <https://doi.org/10.1042/bj2560001>

126. Szoka FC Jr., Papahadjopoulos D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annu Rev Biophys Bioeng.* 1980; **9**:467-508. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.09.060180.002343>.
127. Bozzuto G., Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nano-medicine.* 2015; **10**:975-999. Doi: <https://doi.org/10.2147/ijn.s68861>.
128. Chatterjee SN, Agarwal S. Liposomes as membrane model for study of lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.* 1988; **4**(1):51-72. Doi: [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(88\)90011-1](https://doi.org/10.1016/0891-5849(88)90011-1)
129. Elhissi A, Ahmed W, Hassan IU, Dhanak VR, D'Emanuele A. Carbon nanotubes in cancer therapy and drug delivery. *J Drug Deliv.* 2015; **2012**:837327. Doi: <https://doi.org/10.1155/2012/837327>.
130. Sharma A, Sharma US. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *Int J Pharm.* 1997; **154**(2):123-40. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(97\)00135-X](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(97)00135-X).
131. Storm G, Crommelin DJA. Liposomes: quo vadis? *Pharm Sci Technol Today.* 1998;**1**(1):19-31. Doi: [https://doi.org/10.1016/S1461-5347\(98\)00007-8](https://doi.org/10.1016/S1461-5347(98)00007-8).
132. Noble CO, Kirpotin DB, Hayes ME, Mamot C, Hong K, Park JW, Benz CC, Marks JD, Drummond DC. Development of ligand-targeted liposomes for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2014; **18**(4):375-88. Doi: <https://doi.org/10.1517/14728222.8.4.335>.
133. Sawant, RR, Torchilin, VP. Liposomes as 'smart' pharmaceutical nanocarriers. *Soft Matter*, 2010; **6**(17), 4026-4044. Doi: <https://doi.org/10.1039/B923535N>.
134. Kono K, Nakai R, Morimoto K, Takagishi T. Thermosensitive polymer-modified liposomes that release contents around physiological temperature. *Biochim Biophys Acta.* 1999; **1416**(1-2):239-50. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(98\)00226-0](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(98)00226-0).
135. Aryasomayajula B, Salzano G, Torchilin VP. Multifunctional liposomes. *Methods Mol Biol.* 2017; **1530**:41-61 Doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6646-2_3.
136. Mui B, Chow L, Hope MJ. Extrusion technique to generate liposomes of defined size. *Methods Enzymol.* 2003; **367**:3-14. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(03\)67001-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(03)67001-1).
137. Lombardo, D.; Kiselev, M.A. Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 543. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030543>.
138. Uhumwangho MU, Okor RS. Current trends in the production and biomedical applications of liposomes: a review. *J Med Biomed Res.* 2005; **4**(1):9-21. doi:10.4314/jmbr.v4i1.10663.
139. Bagatolli LA, Gratton E. A correlation between lipid domain shape and binary phospholipid mixture composition in free standing bilayers: a two-photon fluorescence microscopy study. *Biophys J.* 2000; **79**(1):434-447. 0006-3495/00/07/434/14.

140. Boban Z, Mardešić I, Subczynski WK, Raguz, M. Giant Unilamellar Vesicle Electroformation: What to Use, What to Avoid, and How to Quantify the Results. *Membranes* **2021**, *11*, 860. Doi: <https://doi.org/10.3390/membranes11110860>.
141. Sercombe L, Veerati T, Moheimani F, Wu SY, Sood AK and Hua S. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Front. Pharmacol.* 2015; **6**:286. doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00286>.
142. Dejeu IL, Vicaș LG, Marian E, Ganea M, Frentz OD, Maghiar PB, Bodea FI, Dejeu GE. Innovative Approaches to Enhancing the Biomedical Properties of Liposomes. *Pharmaceutics* 2024; **16**(12):1525. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16121525>.
143. Sackmann E. Supported membranes: scientific and practical applications. *Science*. 1996; **271**(5245): 43-48. Doi: <https://doi.org/10.1126/science.271.5245.43>.
144. Loose M, Schwille P. Biomimetic membrane systems to study cellular organization. *J Struct Biol.* 2009; **168**(1):143-151. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.03.016>.
145. Nguyen PA, Field CM, Groen AC, Mitchison TJ, Loose M. Using supported bilayers to study the spatiotemporal organization of membrane-bound proteins. *Methods Cell Biol.* 2015; **128**: 223-248. Doi: <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2015.01.007>.
146. Lee CK, Wang YM, Huang LS, Lin S. Atomic force microscopy: determination of unbinding force, off rate and energy barrier for protein-ligand interaction. *Micron.* 2007; **38**(5):446-461. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2006.06.014>.
147. Mingeot-Leclercq MP, Deleu M, Brasseur R, Dufrene YF. Atomic force microscopy of supported lipid bilayers. *Nat Protoc* 2008; **3**, 1654–1659. Doi: <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.149>.
148. Goksu EI, Vanegas JM, Blanchette CD, Lin WC, Longo ML. AFM for structure and dynamics of biomembranes. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2009; **1788** (1):254-266. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.08.021>.
149. Chan EC, New LS, Yap CW, Goh LT. Pharmaceutical metabolite profiling using quadrupole/ion mobility spectrometry/time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2009; **23**(3):384-394. Doi: <https://doi.org/10.1002/rcm.3887>.
150. Crane JM, Tamm LK. Fluorescence microscopy to study domains in supported lipid bilayers. *Methods Mol Biol.* 2007; **400**:481-8. Doi: https://doi.org/10.1007/978-1-59745-519-0_32.
151. Puu G, Gustafson I. Planar lipid bilayers on solid supports from liposomes: factors of importance for kinetics and stability. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 1997; **1327**(2):149-161. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(97\)00052-7](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(97)00052-7).
152. Keller CA, Kasemo B. Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance. *Biophys J.* 1998;

- 75**(3):1397-1402. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)74057-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)74057-3).
153. Gerelli Y. Exploring interactions between lipid membranes and nanoparticles through neutron and X-ray reflectometry techniques. In: *Advances in biomembranes and lipid self-assembly*. Vol. 38. London: Academic Press; 2023. p. 37–61.
 154. Gerelli Y. Phase transitions in a single supported phospholipid bilayer: real-time determination by neutron reflectometry. *Phys Rev Lett*. 2019; **122**(24):248101. Doi: <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.122.248101>,
 155. Blodgett KB. Films built by depositing successive monomolecular layers on a solid surface. *J Am Chem Soc*. 1935; **57**(6):1007–1022. Doi: <https://doi.org/10.1021/ja01310a001>.
 156. Kovalchuk MV, Boikova AS, Dyakova YA, Marchenkova MA, Opolchentsev AM, Pisarevsky YV, et al. Modification of the Langmuir–Schaefer method for fabrication of ordered protein films. *Crystallogr Rep*. 2017; **62**(4):632–638. Doi: <https://doi.org/10.1134/S1063774517040125>.
 157. Cremer PS, Boxer SG. Formation and spreading of lipid bilayers on planar glass supports. *J Phys Chem B*. 1999; **103**(13):2554–2559. Doi: <https://doi.org/10.1021/jp9840338>.
 158. Kleijn JM. Order in phospholipid Langmuir–Blodgett layers and the effect of the electrical potential of the substrate. *Biophys J*. 1999; **76**(1):323–332. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77194-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77194-3)
 159. Coronado S, Herrera J, Pino MG, Martín S, Ballesteros-Rueda L, Cea P. Advancements in engineering planar model cell membranes: current techniques, applications, and future perspectives. *Nanomaterials*. 2024; **14**(18):1489. Doi: <https://doi.org/10.3390/nano14181489>.
 160. Jass J, Tjärnhage T, Puu G. From liposomes to supported, planar bilayer structures on hydrophilic and hydrophobic surfaces: an atomic force microscopy study. *Biophys J*. 2000; **79**(6):3153–3163. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76574-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76574-2).
 161. Reviakine I, Simon A, Brisson A. Effect of Ca²⁺ on the morphology of mixed DPPC–DOPS supported phospholipid bilayers. *Langmuir*. 2000; **16**(4):1473–1477. Doi: <https://doi.org/10.1021/la990842q>
 162. Richter RP, Brisson AR. Following the formation of supported lipid bilayers on mica: a study combining AFM, QCM-D, and ellipsometry. *Biophys J*. 2005; **88**(5):3422–3433. Doi: <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.053728>
 163. Anderson TH, Min Y, Weirich KL, Zeng H, Fygenon D, Israelachvili JN. Formation of supported bilayers on silica substrates. *Langmuir*. 2009; **25**(12):6997–7005. Doi: <https://doi.org/10.1021/la900181n>.
 164. Jackman JA, Cho N-J. Supported lipid bilayer formation: beyond vesicle fusion. *Langmuir*. 2020; **36**(6):1387–1400. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b03706>.
 165. Tibergh F, Harwigsson I, Malmsten M. Formation of model lipid bilayers at the silica–water interface by co-adsorption with non-ionic dodecyl maltoside surfactant. *Eur Biophys J*. 2000; **29**(3):196–203. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00061-000-0000-0>.

- org/10.1007/s002490000086.
166. Vacklin HP, Tiberg F, Thomas RK. Formation of supported phospholipid bilayers via co-adsorption with β -D-dodecyl maltoside. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2005; **1668**(1):17–24. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.11.005>.
 167. Hardy GJ, Nayak R, Zauscher S. Model cell membranes: techniques to form complex biomimetic supported lipid bilayers via vesicle fusion. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2013; **18**(5):448–458. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.06.004>.
 168. Larson RG. Multiscale modeling of dendrimers and their interactions with bilayers and polyelectrolytes. *Molecules.* 2009; **14**(1):423–438. Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules14010423>.
 169. Richter RP, Bérat R, Brisson AR. Formation of solid-supported lipid bilayers: an integrated view. *Langmuir.* 2006; **22**(8):3497–3505. Doi: <https://doi.org/10.1021/la052687c>.
 170. Peetla C, Stine A, Labhasetwar V. Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery. *Mol Pharm.* 2009; **6**(5):1264–1276. Doi: <https://doi.org/10.1021/mp9000662>.
 171. Rossi C, Chopineau J. Biomimetic tethered lipid membranes designed for membrane-protein interaction studies. *Eur Biophys J.* 2007; **36**(8):955–965. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00249-007-0166-5>.
 172. Rossi C, Doumiati S, Lazzarelli C, Davi M, Meddar F, Ladant D, et al. A tethered bilayer assembled on top of immobilized calmodulin as a nanosensor for membrane-active peptides. *Biosens Bioelectron.* 2011; **26**(8):3684–3690. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.02.018>.
 173. Ingólfsson HI, Lopez CA, Uusitalo JJ, de Jong DH, Gopal SM, Periole X, et al. The power of coarse graining in biomolecular simulations. *WIRES Comput Mol Sci.* 2014; **4**(3):225–248. Doi: <https://doi.org/10.1002/wcms.116>
 174. Marrink SJ, Corradi V, Souza PCT, Ingólfsson HI, Tieleman DP, Sansom MSP. Computational modeling of realistic cell membranes. *Chem Rev.* 2019; **119**(9):6184–6226. Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00460>.
 175. Matthews C, Weare J, Kravtsov A, Jennings E. Umbrella sampling: a powerful method to sample tails of distributions. *Mon Not R Astron Soc.* 2018; **480**(3):4069–4079. Doi: <https://doi.org/10.1093/mnras/sty2090>.
 176. Martinotti C, Ruiz-Perez L, Deplazes E, Mancera RL. Molecular dynamics simulation of small molecules interacting with biological membranes. *ChemPhysChem.* 2020; **21**(14):1486–1514. Doi: <https://doi.org/10.1002/cphc.202000219>.
 177. Dufrêne YF, Ando T, Garcia R, Alsteens D, Martinez-Martin D, Engel A, et al. Imaging modes of atomic force microscopy for molecular biology. *Nat Nanotechnol.* 2017; **12**(4):295–307. Doi: <https://doi.org/10.1038/nnano.2017.45>.
 178. Garcia-Manyès S, Sanz F. Nanomechanics of lipid bilayers by force

- spectroscopy with atomic force microscopy. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2010; **1798**(4):741–749. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.12.014>.
179. Dimova R. Recent developments in the field of bending rigidity measurements on membranes. *Adv Colloid Interface Sci.* 2014; **208**:225–234. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.03.003>.
 180. Lakowicz JR. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer; 2006. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>.
 181. Struck DK, Hoekstra D, Pagano RE. Membrane fusion monitored by FRET. *Biochemistry* 1981; **20**(14):4093-9. Doi: <https://doi.org/10.1021/bi00517a023>.
 182. Loura LMS, Prieto M. FRET in membrane biophysics: An Overview. *Front. Physiol.* 2011; **2**:82. Doi: <https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00082>.
 183. Lewis RN, McElhaney RN. Calorimetric and spectroscopic studies of the thermotropic phase behavior of lipid bilayer model membranes composed of a homologous series of linear saturated phosphatidylserines *Biophys J.* 2000; **79**(4):2043-55. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(00\)76452-6](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(00)76452-6)
 184. Heimburg, T. Lipid Melting. In *Thermal Biophysics of Membranes*, T. Heimburg (Ed.). 2007, Doi: <https://doi.org/10.1002/9783527611591.ch6>.
 185. McElhaney RN. The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes. *Chem Phys Lipids.* 1982. **30** (1-2): 229-259 [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(82\)90053-6](https://doi.org/10.1016/0009-3084(82)90053-6),
 186. Seelig, J. Deuterium magnetic resonance: theory and application to lipid membranes. *Quarterly reviews of biophysics*, 1977. **10** (3), 353-418. Doi: <https://doi.org/10.1017/S0033583500002948>.
 187. Prosser RS, Evanics F, Kitevski J L, Al-Abdul-Wahid MS. Current applications of bicelles in NMR studies of membrane-associated amphiphiles and proteins. *Biochemistry*, 2006; **45**(28), 8453-8465. Doi: <https://doi.org/10.1021/bi060615u>.
 188. Marsh, D. Electron spin resonance in membrane research: protein–lipid interactions from challenging beginnings to state of the art. *Eur Biophys J.* 2010; **39**, 513–525 Doi: <https://doi.org/10.1007/s00249-009-0512-3>
 189. Nagle JF, Tristram-Nagle S. Structure of lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta. Rev in Biomem.* 2000. 1469(3): 159-195. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(00\)00016-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(00)00016-2).
 190. Kučerka N, Nagle JF, Sachs JN, Feller SE, Penczer J, Jackson A, Katsaras J. Lipid bilayer structure determined by the simultaneous analysis of neutron and X-ray scattering data. *Biochim Biophys Acta.* 2008; **1778**(11):2769–2781. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.06.010>
 191. Eggeling C, Ringemann C, Medda R, Schwarzmann G, Sandhoff K, Polyakova S, et al. Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature.* 2009; **457**(7233):1159–1162. <https://doi.org/10.1038/nature07596>
 192. Frankel, D J, Pfeiffer JR, Surviladze Z, Johnson AE, Oliver J M, Wilson B

- S, Burns AR. (2006). Revealing the topography of cellular membrane domains by combined atomic force microscopy/fluorescence imaging. *Biophysical Journal*, 2006; **90**(7), 2404-2413. Doi: <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.073692>
193. Casado A, Giuffrida MC, Sagristá ML, Castelli F, Pujol M, Alsina MA, Mora M. Langmuir monolayers and Differential Scanning Calorimetry for the study of the interactions between camptothecin drugs and biomembrane models. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 2026; **1858**(2): 422-433.
 194. Brezesinski G, Möhwald H. Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci*, 2003; **100**:563-584. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(02\)00071-4](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(02)00071-4) .
 195. Berne BJ, Pecora R. *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*. Mineola (NY): Dover Publications; 2000.
 196. Almgren M, Edwards K, Karlsson G. Cryo transmission electron microscopy of liposomes and related structures. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 2000; **174**(1-2):3-21. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(00\)00516-1](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(00)00516-1)
 197. Sauerbrey G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Z Phys*. 1959; **155**(2): 206-222. <https://doi.org/10.1007/BF01337937>
 198. Reimhult E, Höök F, Kasemo B. Intact vesicle adsorption and supported biomembrane formation from vesicles in solution: influence of surface chemistry, vesicle size, temperature, and osmotic pressure. *Langmuir*. 2003; **19**(5):1681-1691. <https://doi.org/10.1021/la0263920>.
 199. Velazquez-Campoy A, Freire E. Isothermal titration calorimetry to determine association constants for high-affinity ligands. *Nat Protoc*. 2006; **1**(1):186-191. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.28>,
 200. Pignatello R, Musumeci T, Basile L, Carbone C, Puglisi G. Biomembrane models and drug-biomembrane interaction studies: involvement in drug design and development. *J Pharm Bioallied Sci*. 2011; **3**(1):4-14. Doi: <https://doi.org/10.4103/0975-7406.76461>
 201. Seddon AM, Casey D, Law RV, Gee A, Templar RH, Ces O. Drug interactions with lipid membranes. *Chem Soc Rev*. 2009; **38**(9):2509-2519. Doi: <https://doi.org/10.1039/B813853M> .
 202. Mayne CG, Saam J, Schulten K, Tajkhorshid E, Gumbart JC. Rapid parameterization of small molecules using the force field toolkit. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2016;**1858**(10):2485-2494. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.04.016>.
 203. Harris J, Chipot C, Roux B. How is membrane permeation of small ionizable molecules affected by protonation kinetics? *J Phys Chem B*. 2024; **128**(3):795-811. Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.3c06765>.
 204. Domingues MM, Inácio RG, Raimundo JM, Martins M, Castanho MARB, Santos NC. Biophysical characterization of polymyxin B interaction with LPS aggregates and membrane model systems. *Biopolymers*.

- 2012; **98**(4):338–344. Doi: <https://doi.org/10.1002/bip.22095>.
205. Cardoso RMS, Lairion F, Disalvo EA, Loura LMS, Moreno MJ. Dipole potential of monolayers with biologically relevant lipid compositions. *Molecules*. 2024; **29**(24):5843. Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules29245843>.
 206. Lichtenberger LM, Zhou Y, Jayaraman V, Doyen JR, O’Neil RG, Dial EJ, et al. Insight into NSAID-induced membrane alterations: interaction of NSAIDs with phosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2012; **1821**(7):994–1002. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2012.04.001>
 207. Goldman SD, Funk RS, Krise JP. Mechanisms of amine accumulation in, and egress from, lysosomes. *Bioanalysis*. 2009; **1**(8):1445–1459. Doi: <https://doi.org/10.4155/bio.09.131>.
 208. Halliwell WH. Cationic amphiphilic drug-induced phospholipidosis. *Toxicol Pathol*. 1997; **25**(1):53–60. Doi: <https://doi.org/10.1177/019262339702500107>.
 209. Carrasco-Correa EJ, Ruiz-Allica J, Rodríguez-Fernández JF, Miró M. Human artificial membranes in (bio)analytical science. *TrAC Trends Anal Chem*. 2021; **145**:116446. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116446>.
 210. Avdeef A. Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state). *Curr Top Med Chem*. 2001;**1**(4):277–351. Doi: <https://doi.org/10.2174/1568026013395107>.
 211. Ortiz A, Cajal Y, Haro I, Reig F, Alsina MA. Fluorescence study on the interaction of a multiple antigenic peptide from hepatitis A virus with lipid vesicles. *Biopolymers*. 2000; **53**(6):455–466. Doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(20000605\)53:6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(20000605)53:6).
 212. Seydel JK, Wiese M. Drug-membrane interactions: analysis, drug distribution, modeling. Weinheim: Wiley-VCH; 2009.
 213. Bhandary S, Basu R, Das S, Nandy P. Effect of some statin group of drugs on the phase profile of liposomal membrane: a fluorescence anisotropy study. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2009; **71**(1):120–127. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.01.015>
 214. Goldstein DB. The effects of drugs on membrane fluidity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1984; **24**:43–64. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.24.040184.000355>.
 215. Ferreira H, Lúcio M, Lima JLC, Cordeiro-da-Silva A, Tavares J, Reis S. Effect of anti-inflammatory drugs on splenocyte membrane fluidity. *Chem Phys Lipids*. 2005; **135**(2):179–189. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2005.02.002> .
 216. Biscaia-Caleiras M, Lourenço AS, Moreira JN, Simões S. Unveiling the impact of membrane fluidity in shaping lipid-based drug delivery systems development. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2026; **1868**(1):184461. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2025.184461>.
 217. Shimolina L, Gulín A, Khlynova A, Ignatova N, Druzhkova I, Gubina

- M, et al. Effects of paclitaxel on plasma membrane microviscosity and lipid composition in cancer cells. *Int J Mol Sci.* 2023; **24**(15):12186. Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms241512186>.
218. Pedrosa-Bustos M, Moncho-Jordá A, Gálvez-Ruiz MJ. Recent advances in anticancer drug-membrane interactions: insights from Langmuir monolayers and molecular dynamics simulations. *Biophys Rev.* 2025; **17**:10659–10676. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12551-024-01069-5>.
219. Jiang P, Zhang C, Lin C, Wang Y. From drug discovery to development: structure-based approaches for membrane protein modulation. *Drug Discov Today.* 2025; **30**:104550. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2025.104550>.
220. Epanand RM, Vogel HJ. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta.* 1999; **1462**(1–2):11–28. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00198-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00198-4)
221. Bechinger B, Gorr S-U. Antimicrobial peptides: mechanisms of action and resistance. *J Dent Res.* 2017; **96**(3):254–260. <https://doi.org/10.1177/0022034516679973>.
222. Galatola R, Vasconcelos A, Pérez Y, Cruz A, Pujol M, Alsina MA, et al. A cyclic GB virus C-derived peptide with anti-HIV-1 activity targets the fusion peptide of HIV-1. *Eur J Med Chem.* 2014; **86**:589–604. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.09.018>.
223. Schreier S, Malheiros SVP, de Paula E. Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. *Biochim Biophys Acta.* 2000; **1508**(1–2):210–234. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(00\)00012-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(00)00012-5).
224. Reasor MJ, Kacew S. Drug-induced phospholipidosis: are there functional consequences? *Exp Biol Med* (Maywood). 2001; **226**(9):825–830. <https://doi.org/10.1177/153537020122600903>.
225. Gray KC, Palacios DS, Dailey I, Endo MM, Uno BE, Wilcock BC, et al. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; **109**(7):2234–2239. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1117280109>.
226. Weber P, Wagner M, Schneckenburger H. Cholesterol dependent uptake and interaction of doxorubicin in MCF-7 breast cancer cells. *Int J Mol Sci.* 2013; **14**(4):8358–8366. Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms14048358>.
227. Phan HT, Yoda T, Chahal B, Morita M, Takagi M, Vestergaard MDC. Structure-dependent interactions of polyphenols with a biomimetic membrane system. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2014; **1838**(10):2670–2677. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.06.013>.
228. Heimburg T. Lipid ion channels and the role of membranes in the propagation of nerve pulses. *Chem Phys Lipids.* 2013; **171**:1–13. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.08.002>.
229. Jung D, Rozek A, Aktion M, Hancock REW. Structural transitions as determinants of the action of antimicrobial peptides. *Chem Biol.* 2004; **11**(7):949–957. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.04.020>.

230. Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Role of cardiolipin in mitochondrial function and dynamics in health and disease: molecular and pharmacological aspects. *Cells*. 2019; **8**(7):728. Doi: <https://doi.org/10.3390/cells8070728>.
231. Tsuchiya H, Mizogami M, Ueno T, Takakura K. Interaction of local anaesthetics with lipid membranes under inflammatory acidic conditions. *Inflammopharmacology*. 2007; **15**(4):164–170. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10787-007-1579-4>.
232. Cantor RS. The lateral pressure profile in membranes: a physical mechanism of general anesthesia. *Biochemistry*. 1997; **36**(9):2339–2344. Doi: <https://doi.org/10.1021/bi9627323>.
233. Chin JH, Goldstein DB. Effects of low concentrations of ethanol on the fluidity of spin-labeled erythrocyte and brain membranes. *Mol Pharmacol*. 1977; **13**(3):435–441. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0026-895X\(25\)11220-0](https://doi.org/10.1016/S0026-895X(25)11220-0).
234. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 2002; **415**(6870):389–395. Doi: <https://doi.org/10.1038/415389a>.
235. Raghuraman H, Chattopadhyay A. Melittin: a membrane-active peptide with diverse functions. *Biosci Rep*. 2007; **27**(4–5):189–223. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10540-006-9030-z>.
236. Kilby JM, Hopkins S, Venetta TM, DiMassimo B, Cloud GA, Lee JY, et al. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med*. 1998; **4**(11):1302–1307. Doi: <https://doi.org/10.1038/3293>.
237. Marzolini C, Gibbons S, Seddon D, Khoo S. Drug–drug interactions potential with the HIV-1 capsid inhibitor lenacapavir. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2025; **21**(2):161–172. <https://doi.org/10.1080/17425255.2024.2415295>.
238. Sánchez-Martín MJ, Urbán P, Pujol M, Haro I, Alsina MA, Busquets MA. Biophysical investigations of GBV-C E1 peptides as potential inhibitors of HIV-1 fusion peptide. *ChemPhysChem*. 2011; **12**(15):2816–2822. Doi: <https://doi.org/10.1002/cphc.201100239>.
239. Ortiz A, Arciniegas S, Prat J, Muñoz-Juncosa M, Pujol M. Lipid domains in LB films and giant vesicles to study GBV-C peptides interaction in the context of HIV-1 FP inhibition at membranes. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 2019; **578**:123620. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.123620>.
240. Chernomordik LV, Kozlov MM. Mechanics of membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol*. 2008; **15**(7):675–683. Doi: <https://doi.org/10.1038/nsmb.1455>.
241. Xia S, Zhu Y, Liu M, Lan Q, Xu W, Wu Y, et al. Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein. *Cell Mol Immunol*. 2020; **17**:765–767. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0374-2>.
242. Brittes J, Lucio M, Nunes C, Lima JLFC, Reis Y. Effects of resveratrol

- on membrane biophysical properties: relevance for its pharmacological effects. *Chemistry and physics of lipids*, 2010; **163**(8), 747-754. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2010.07.004>.
243. Ollila S, Hyvönen-Iipo MT, Vattulainen L. *J. Phys. Chem. B*. 2007; **111**(12): 3139–3150. Doi: <https://doi.org/10.1021/jp065424f>.
 244. Lichtenberger LM, Zhou Y, Jayaraman V, Doyen JR, O’Neil RG, Dial EJ, et al. Insight into NSAID-induced membrane alterations, pathogenesis and therapeutics: Characterization of interaction of NSAIDs with phosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2012; **1821**(7):994–1002. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.04.002>.
 245. Reig F, Haro I, Polo D, Egea MA, Alsina MA. Interfacial interactions of hydrophobic peptides with lipid bilayers. *J Colloid Interface Sci*. 2002; **246**(1):60–69. Doi: <https://doi.org/10.1006/jcis.2001.8056>.
 246. Carmona MA, Alsina MA, Pintó RM, Sanchez G, Guix S, Pujol M. Physicochemical studies of hepatitis A virus recombinant proteins: interaction with monolayers as membrane models. *Mater Sci Eng C*. 1999; **8–9**:481–485. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0928-4931\(99\)00054-5](https://doi.org/10.1016/S0928-4931(99)00054-5).
 247. N A, 2006 BJDIPFL, doi:10.1016/j.febslet 55. 08.061.
 248. Ichikawa Y, Ghanefar M, Bayeva M, Wu R, Khechaduri A, Naga Prasad SV, et al. Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. *J Clin Invest*. 2014; **124**(2):617–630. Doi: <https://doi.org/10.1172/JCI72931>.
 249. Sarkis J, Vié V. Biomimetic models to investigate membrane biophysics affecting lipid–protein interaction. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020; **8**:270. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00270>.
 250. Stone NRH, Bicanic T, Salim R, Hope W. Liposomal Amphotericin B (AmBisome®): A Review of the Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Clinical Experience and Future Directions. *Drugs*. 2016; **76**, 485–500. Doi: <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0538-7>.
 251. Alakoskela JM, Vitovič P, Kinnunen PKJ. Screening for the drug–phospholipid interaction: correlation to phospholipidosis. *ChemMedChem*. 2009; **4**(8):1224–1251. Doi: <https://doi.org/10.1002/cmdc.200900052>.
 252. Rodrigues AC. Efflux and uptake transporters as determinants of statin response. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2010; **6**(5):621–632. Doi: <https://doi.org/10.1517/17425251003713519>.
 253. Pereira-Leite C, Nunes C, Reis S. Interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with membranes: in vitro assessment and relevance for their biological actions. *Prog Lipid Res*. 2013; **52**(4):571–584. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.08.003>.
 254. Lúcio M, Lima JLFC, Reis S. Drug-membrane interactions: significance for medicinal chemistry. *Curr Med Chem*. 2010; **17**(17):1795–1809. Doi: <https://doi.org/10.2174/092986710791111233>.
 255. Chávez A, Busquets MA, Pujol M, Alsina MA, Cajal Y. pH-induced destabilization of lipid bilayers by a peptide from the VP3 protein of the capsid of hepatitis A virus. *Analyst*. 1998; **123**(11):2251–2256. Doi: <https://doi.org/10.1039/98AN00000A>.

- doi.org/10.1039/a804562c.
256. Chávez A, Pujol M, Haro I, Alsina MA, Cajal Y. Membrane fusion by an RGD-containing sequence from the core protein VP3 of hepatitis A virus and the RGA-analogue: implications for viral infection. *Biopolymers*. 2001; **58**(1):63–77. Doi: [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(200101\)58:1](https://doi.org/10.1002/1097-0282(200101)58:1).
 257. Chávez A, Pujol M, Alsina MA, Cajal Y. Membrane fusion induced by a lipopeptidic epitope from VP3 capsid protein of hepatitis A virus. *Luminescence*. 2001; **16**(2):135–143. Doi: <https://doi.org/10.1002/bio.629>.
 258. Koedel Y, Eissmann K, Wend H, Fleckenstein B, Reil H. Peptides derived from a distinct region of GB virus C glycoprotein E2 mediate strain-specific HIV-1 entry inhibition. *J Virol*. 2011; **85**(14):7037–7047. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.02366-10>.
 259. Jung S, Eichenmüller M, Donhauser N, Neipel F, Engel AM, Hess G, et al. HIV entry inhibition by the envelope 2 glycoprotein of GB virus C. *AIDS*. 2007; **21**(5):645–647. Doi: <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32803277c7>,
 260. Chang Q, McLinden JH, Stapleton JT, Sathar MA, Xiang J. Expression of GB virus C NS5A protein from genotypes 1, 2, 3 and 5 and a 30 aa NS5A fragment inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in a CD4+ T-lymphocyte cell line. *J Gen Virol*. 2007; **88**(12):3341–3346. Doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.83198-0>.
 261. Sánchez-Martín MJ, Busquets MA, Girona V, Haro I, Alsina MA. Peptide membrane interactions of the HIV-1 fusion peptide: studies with model membranes. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2011; **1808**(11):2838–2846. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.05.020>
 262. Sánchez-Martín MJ, Urbán P, Pujol M, Haro I, Alsina MA, Busquets MA. Biophysical investigations of GBV-C E1 peptides as potential inhibitors of HIV-1 fusion peptide. *ChemPhysChem*. 2011; **12**(15):2816–2822. Doi: <https://doi.org/10.1002/cphc.201100239> .
 263. Sánchez-Martín MJ, Cano A, Busquets MA, Alsina MA. Peptides derived from GB virus C E1 protein as potential inhibitors of HIV-1 fusion: interaction with model membranes. *Int J Pharm*. 2012; **434**(1–2):160–168. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.07.051>.
 264. Galatola R, Cruz A, Gómara MJ, Prat J, Alsina MA, Haro I, Pujol M. Surface behavior of peptides from E1 GBV-C protein: Interaction with anionic model membranes and importance in HIV-1 FP inhibition. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2015; **1848**(2): 392–407. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.10.033>.
 265. Ortiz A, Domènech O, Muñoz-Juncosa MM, Pérez-Payá E, Haro I, Gómara MJ, et al. Effect of a synthetic HIV-1 fusion peptide and a GBV-C peptide on lipid membranes: a comparative study. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 2015; **469**:203–212. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.12.048> .
 266. Ortiz A, Gómara MJ, Prat J, Muñoz-Muñoz MM, Alsina MA, Pujol M, et al. Interaction of the GBV-C E2-derived peptide P62 with anio-

- nic and zwitterionic phospholipid membranes: a comparative study. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2017; **529**:655–664. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.04.024>
267. Ortiz A, Domènech O, Muñoz-Juncosa M, Prat J, Haro I, Girona V, Alsina MA, Pujol M. A study of HIV-1 FP inhibition by GBV-C peptides using lipid nano-assemblies. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.*, 2015, 480: 184-190. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2014.12.048
 268. Clausell A, Pujol M, Alsina MA, Cajal Y. Interaction of polymyxin B and a deacylated derivative with monolayers of bacterial lipids. *J Phys IV France.* 2001;**11**(PR5): Pr5-145–Pr5-150.
 269. Clausell A, Pujol M, Alsina MA, Cajal Y. Influence of polymyxins on the structural dynamics of *Escherichia coli* lipid membranes. *Talanta.* 2003; **60**(2–3):225–234. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(03\)00068-9](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(03)00068-9) .
 270. Clausell A, Busquets MA, Pujol M, Alsina MA, Cajal Y. Polymyxin B–lipid interactions in Langmuir–Blodgett monolayers of *Escherichia coli* lipids: a thermodynamic and atomic force microscopy study. *Biopolymers.* 2004; **75**(6):480–490. Doi: <https://doi.org/10.1002/bip.20088>.
 271. Clausell A, Rabanal F, Garcia-Subirats M, Asunción Alsina M, Cajal Y. Gram-negative outer and inner membrane models: insertion of cyclic cationic lipopeptides. *J Phys Chem B.* 2007; **111**(3):551–563. Doi: <https://doi.org/10.1021/jp064005n>.
 272. Grau-Campistany A, Rabanal F, Pujol M, Cajal Y. Membrane interaction of polymyxin B and synthetic analogues studied in biomimetic systems: implications for antibacterial action. In: Muñoz-Torrero D, Cortés A, Mariño EL, editors. *Recent advances in pharmaceutical sciences III*. Trivandrum: Transworld Research Network; 2013. p. 61–75.
 273. Grau-Campistany A, Manresa A, Pujol M, Rabanal F, Cajal Y. Tryptophan-containing lipopeptide antibiotics derived from polymyxin B with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2016; **1858**(2):333–343. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.11.020>
 274. Rascol E, Devoisselle JM, Chopineau J. The relevance of membrane models to understand nanoparticles–cell membrane interactions. *Nanoscale.* 2016; **8**(9):4780–4798. Doi: <https://doi.org/10.1039/C5NR07835J> .
 275. Contini, C., Schneemilch, M., Gaisford, S., & Quirke, N. Nanoparticle–membrane interactions. *J. Exp. Nanosci.* 2018; 13(1), 62-81. Doi: <https://doi.org/10.1080/17458080.2017.1413253>.
 276. Sánchez-López E, Esteruelas G, Ortiz A, Espina M, Prat J, Muñoz M, et al. Dexibuprofen biodegradable nanoparticles: one step closer towards a better ocular interaction study. *Nanomaterials.* 2020; **10**(4):720. <https://doi.org/10.3390/nano10040720> .
 277. Esteruelas G, Sánchez-López E, Ortiz A, García MA, Prat J, Muñoz MM, Espina M, Pujol M. Obtenció de nanopartícules polimèriques per a l'administració ocular de fàrmacs i estudis d'interacció amb tècniques biofísiques. *Edusfarm.* 2019-2020; **11-12**:271-285. doi:10.1344/EDUS-

- FARM2019-2000.11-12.15.
278. Esteruelas G, Ortiz A, Prat J, Vega E, Muñoz-Juncosa M, López MLG, et al. Novel customized age-dependent corneal membranes and interactions with biodegradable nanoparticles loaded with dexibuprofen. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2023; **228**:113394. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113394> .
 279. Petit RG, Cano A, Ortiz A, Espina M, Prat J, Muñoz M, et al. Psoriasis: from pathogenesis to pharmacological and nano-technological-based therapeutics. *Int J Mol Sci*. 2021; **22**(9):4983. <https://doi.org/10.3390/ijms22094983>.
 280. Llorente X, Esteruelas G, Bonilla L, Agudelo MG, Filgaira I, López-Ramajo D, et al. Riluzole-loaded nanostructured lipid carriers for hyperproliferative skin diseases. *Int J Mol Sci*. 2023; **24**(9):8053. <https://doi.org/10.3390/ijms24098053> .
 281. Vega E, Madariaga Burgos J, Souto EB, García ML, Pujol M, Sánchez-López E. Biodegradable nanoplatforms for antigen delivery: part I – state of the art review of polymeric nanoparticles for cancer immunotherapy. *Expert Opin Drug Deliv*. 2024; **21**(8):1251–1262. <https://doi.org/10.1080/17425247.2024.2352981>.
 282. Madariaga Burgos J, Vega E, García ML, Pujol M, Sánchez-López E, Souto EB. Biodegradable nanoplatforms for antigen delivery: part II – nanoparticles, hydrogels, and microneedles for cancer immunotherapy. *Expert Opin Drug Deliv*. 2024; **21**(9):1385–1394. <https://doi.org/10.1080/17425247.2024.2370618>.
 283. Otis L. *Membranes: Metaphors of invasion in nineteenth-century literature, science, and politics*. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 2000.
 284. Sinensky M. Homeoviscous adaptation—a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974; **71**(2):522–525. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.2.522> .
 285. DiGiacomo, S. M. Metaphor as illness: Postmodern dilemmas in the representation of body, mind and disorder. *Medical Anthropology*, 1992; **14**(1), 109–137. <https://doi.org/10.1080/01459740.1992.9966068>
 286. Borrelli C, Douglas EJA, Riley SMA, Lemonidi, AE, Larrouy-Maumus G, Lu WJ *et al*. Polymyxin B lethality requires energy-dependent outer membrane disruption. *Nat Microbiol*. 2025; **10**, 2919–2933. <https://doi.org/10.1038/s41564-025-02133-1>.
 287. Lu X, Zhang J, Ming Y, Wang Y, He R, Li Y, et al. Next-generation antifungal drugs: mechanisms, current progress, and perspectives. *Acta Pharm Sin B*. 2025; **15**(8): 3852 – 3887 <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2025.06.01>.
 288. Miao C, Gaggiotti H, Brewster C. Popping the ‘bubble’ metaphor: separation and integration of expatriate communities. *J Global Mobility*, 2023; **11** (1): 110-124. Doi: <https://doi.org/10.1108/JGM-05-2022-0016>
 289. Alawode, O. D. Invisible Influence: How Algorithmic News Feeds Are

- Reshaping Public Opinion Without Disclosure. *IOSR-JHSS*. 2025; 30(8), 58-73. Doi: 10.9790/0837-3008025873.
290. Hicks D, Wouters P, Waltman L, de Rijcke S, Rafols I. Bibliometrics: the Leiden Manifesto for research metrics. *Nature*. 2015; **520**(7548): 429–431. Doi: <https://doi.org/10.1038/520429a>.
 291. Duffy MK, Lee K, Adair EA. Workplace envy. *Annu Rev Organ Psychol Organ Behav*. 2021; **8**:19–44. <https://doi.org/10.1146/annurev-orgpsych-012420-055746>.
 292. Nam SH. Membranes as an alternative model for boundaries in technological societies: rethinking the human-technology relation through nonconscious cognition. *J Sci Technol Arts*. 2025; **17**(2):167–183. Doi: <https://doi.org/10.34632/jsta.2025.17776>.
 293. Cheng M, Lee AY, Rapuano K, et al. Metaphors of AI indicate that people increasingly perceive AI as warm and human-like. *Commun Psychol*. 2026; **4**:8. <https://doi.org/10.1038/s44271-025-00376-6>
 294. So J, Cheng C, Murthy SK. Beyond anthropomorphism: a spectrum of interface metaphors for LLMs. *arXiv* [Preprint]. 2026: arXiv:2603.04613. <https://arxiv.org/abs/2603.04613>.
 295. Kim YJ, Zhang CX, Fang C. Navigating the human–AI divide: boundary work in the age of generative AI. *Comput Human Behav Artif Hum*. 2025; **6**:100214. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chbah.2025.100214>.



REIAL ACADÈMIA DE FARMÀCIA DE CATALUNYA