



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Modelos de membrana celular y
su interacción con la cúrcuma

Model cell membranes and
their interaction with curcumin

Autora

Laura Dotor Delgado

Directora

Pilar Cea Minguenza

Departamento de Química Física
Curso 2019-2020

Contenido

1. Introducción y antecedentes	1
2. Objetivos	3
3. Materiales y métodos	3
3.1. Equipos.....	3
3.2. Reactivos y disolventes	4
3.3. Isotermas y transferencias	4
3.4. Mezclas y cálculos termoquímicos	6
3.5. AFM.....	8
4. Resultados y discusión	9
4.1. Isotermas ácido behénico, DPPC y colesterol.....	9
4.2. UV-Vis	9
4.3. Isotermas CCM.....	11
4.4. Isotermas mezcla CCM-DPPC-Colesterol (1:1:1).....	12
4.5. Miscibilidad.....	12
4.6. Transferencias.....	17
4.7. AFM.....	17
4.7.1. CCM $10^{-5}M$, $10 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$	17
4.7.2. Mezcla CCM-DPPC-Colesterol (1:1:1).....	18
5. Conclusiones y perspectivas de futuro.....	20

RESUMEN

La curcumina es un compuesto de gran interés en el ámbito farmacéutico debido a sus efectos antitumorales, antioxidantes, neuroprotectores, antidepresivos y antiinflamatorios. Para hacer una primera aproximación de su comportamiento con las membranas biológicas, claves en los procesos celulares, en este TFG se ha realizado un estudio de la interacción de la curcumina con un fosfolípido y con colesterol mediante los modelos de Langmuir y Langmuir-Blodgett. En el estudio termodinámico se ha determinado que, tanto para las mezclas binarias de curcumina con el fosfolípido como de curcumina con colesterol y para la mezcla ternaria de estas tres especies en la proporción 1:1:1, la curcumina es parcialmente miscible tanto con el fosfolípido como con el colesterol, siendo la miscibilidad mayor conforme las monocapas están más condensadas. Asimismo, las monocapas mixtas de los sistemas binario y ternario analizado muestran que dichas películas mistas se encuentran en fases más expandidas (más fluidizadas) comparadas con los compuestos puros. Por último, las monocapas de curcumina pura y de mezcla ternaria se han caracterizado mediante microscopia de fuerza atómica para estudiar su morfología, observándose regiones homogéneas que parecen sostener la conclusión de miscibilidad (parcial) entre los componentes obtenida del estudio termodinámico.

Curcumin is a relevant compound in pharmaceutical applications due its anti-cancer, antioxidant, neuroprotector, antidepressant and anti-inflammatory effects. For a better understanding of the interactions of curcumin with biological membranes, essential in cellular processes, in this final project a study of curcumin interactions with a phospholipid and cholesterol was performed by means of the Langmuir and Langmuir-Blodgett techniques. The thermodynamic study of binary mixtures incorporating curcumin and a phospholipid as well as curcumin and cholesterol is presented together with the study of a ternary mixture in the 1:1:1 ratio of the three components. The obtained results are indicative of a partial miscibility of curcumin with the phospholipid and cholesterol. The miscibility increases as the monolayer is more condensed. Additionally, both the binary and ternary mixtures here studied show more expanded (more fluid) phases as compared to those of the pure compounds. Finally, the monolayers of pure curcumin and ternary mixture were characterized by AFM to study its morphology; homogeneous images support the conclusion of (partial) miscibility of the components as deduced from the thermodynamic study.

1. Introducción y antecedentes

La vida es química. Desde el comienzo de la Historia, los seres humanos hemos estudiado el efecto de sustancias en los organismos vivos, recopilando estos conocimientos en textos como el *Papiro de Ebers y Smith* (5500 a.C.)¹ o el libro *Shénnóng Běnn Cǎo Jīng* (300 a.C-200 d.C)². La llegada de los europeos a América en el siglo XVI y la expansión de los imperios contribuyeron a ampliar el catálogo de remedios naturales, desarrollándose así la Farmacología y la Toxicología.

Las sustancias químicas no producidas por el propio organismo se denominan xenobióticos (del griego ξένο ‘extraño’ y βίο ‘vida’) y pueden tener origen natural o artificial. Las membranas biológicas cumplen un papel esencial en los procesos celulares: la magnitud del efecto de un xenobiótico sobre un organismo depende de la concentración de compuesto activo en el sitio de acción y la entrada del xenobiótico en las células ocurre a través de la membrana plasmática mediante canales, proteínas transportadoras, pinocitosis o difusión. Por ello es importante investigar su composición química, la distribución de sus constituyentes y las fuerzas que actúan entre estos.

Sin embargo, realizar estudios de células *in vivo* es muy difícil debido a la complejidad de las membranas, así que para una mejor comprensión se recurre a modelos de membranas celulares “simplificados” como liposomas, vesículas, monocapas de Langmuir y bicapas lipídicas soportadas. A la hora de su caracterización se emplean técnicas entre las que destaca el AFM (*Atomic Force Microscopy*). Estos modelos de membranas celulares son clave en la investigación del efecto de virus, drogas, nanopartículas y citotoxicidad, entre otros.³

El xenobiótico que se va a estudiar en este TFG es la curcumina (CCM).

Fue aislada por primera vez en 1815. Se trata del compuesto mayoritario (77%) de la *Cúrcuma Longa*, una planta herbácea de la familia de las *Zingiberáceas* y género *Curcuma* que se encuentra especialmente en la India y el sureste asiático; sus otros componentes son la demetoxicurcumina (18%) y la bisdemetoxicurcumina (5%).⁴ La planta fue registrada por primera vez en el libro *Xin xiu ben cao* (659 a.C.).⁵ Se ha empleado como medicina tradicional, tinte textil natural y como el ingrediente principal del curry; también se la conoce por el nombre del colorante comercial E-100ii.

En el ámbito farmacéutico e investigador, la curcumina (un polifenol cuya estructura se puede ver en la **Figura 1**) es un compuesto de gran interés debido a sus efectos antitumorales, antioxidantes, neuroprotectores, antidepresivos y antiinflamatorios; además presenta una baja toxicidad y no sufre reacciones adversas.

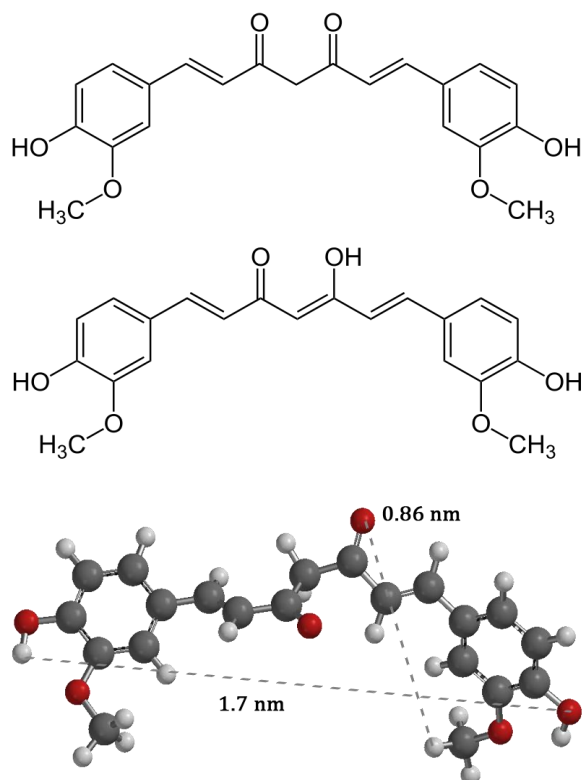


Figura 1. Estructura de la curcumina(arriba) forma diceto (centro) forma enólica (abajo) forma diceto, Spartan

Tabla 1. Propiedades físico-químicas de la curcumina^{6,7}

Fórmula	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
PM (g·mol⁻¹)	368,38
Apariencia	Sólido amarillo-anaranjado
Solubilidad	Insoluble en agua fría (logP = 3,0) Soluble en alcoholes, cloroformo
Estabilidad	Estable a pH ácido y temperatura ambiente
Estructura	β dicetona α-β insaturada, anillos p-fenólicos, alta conjugación Simétrica, sin centros estereogénicos Polimorfismo en su estructura cristalina Tautomería ceto-enol (predomina la forma enol tanto en disolventes acuosos como orgánicos)
Aceptores de enlaces de H	6 átomos
Donores de enlaces de H	2 átomos
Enlaces que pueden rotar	8 enlaces
Carga	0
Otros	Fotosensible, grupos cromóforos Leve fluorescencia Carácter anfipático: polaridad en la parte central de la molécula y los grupos adyacentes, interacción con proteínas y con los lípidos de las membranas biológicas

La dificultad a la hora de emplear la curcumina como fármaco radica en su baja biodisponibilidad; es decir, la fracción de xenobiótico que pasa a la circulación sistémica. En estudios con ratas, una única dosis oral de 2 g resultó en una concentración de menos de 5 µg·mL⁻¹ en el plasma sanguíneo,⁸ concluyendo que el compuesto tiene una baja absorción en el tracto gastrointestinal, lo cual se relaciona con su baja solubilidad en medio acuoso (**Tabla 1**).

Dado que los estudios de la interacción de la cúrcuma con modelos de membrana celular están en pleno desarrollo, apenas se encuentran referencias bibliográficas y el primer paso de este TFG fue optimizar las condiciones de trabajo: disolvente, concentración de curcumina y volumen a dispersar.

En cuanto a los componentes empleados en la fabricación de las membranas, se eligieron la DPPC y el colesterol. La dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) es un constituyente fundamental en las membranas biológicas, especialmente en las células pulmonares, y se suele emplear como fosfolípido principal en los modelos de membranas celulares debido a su carga neutra y estabilidad.⁹ Por otra parte, el colesterol es una molécula de naturaleza lipídica (esterol) clave en la composición de las membranas celulares ya que modula la fluidez y la asimetría de la bicapa.¹⁰

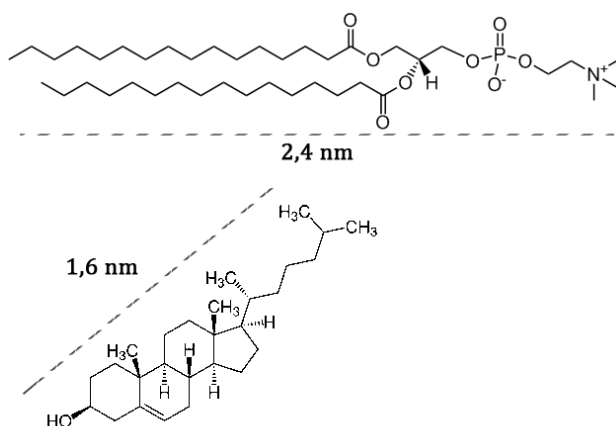


Tabla 2. Peso molecular DPPC y colesterol

	PM (g·mol ⁻¹)
DPPC	734,05
Colesterol	386,66

Figura 2. Estructuras de DPPC(arriba) y colesterol (abajo)

2. Objetivos

Este trabajo tiene un carácter esencialmente formativo, como corresponde a un Trabajo Fin de Grado, de modo que sus objetivos se centran en la consolidación de las competencias propias de un graduado en química. Para ello se ha desarrollado un proyecto en el marco de un grupo de investigación consolidado (grupo Platón, E-54). Tras el consecuente estudio bibliográfico, se planteó el trabajo de investigación siguiendo el método científico y se combinaron metodologías propias de la Química Física con los conocimientos en otros campos como Bioquímica, Ciencia de Materiales, Química Analítica y Química Orgánica.

El trabajo ha sido tutelado y supervisado por mi directora de TFG, con el propósito de cumplir los siguientes objetivos: alcanzar un importante grado de autonomía, espíritu crítico, rigor en el laboratorio, capacidad de interpretar los resultados obtenidos y aportar nuevas ideas. Otro de los propósitos de este trabajo es mejorar las competencias comunicativas tanto de forma escrita, mediante la memoria del TFG, como orales a través de la defensa ante el tribunal correspondiente.

En cuanto a los objetivos científicos de este TFG, el principal consiste en simular en el laboratorio membranas celulares a través del método de Langmuir-Blodgett en un medio controlado y analizar su interacción con la cúrcuma. De esta manera he adquirido formación en técnicas de nanofabricación de películas bidimensionales (monocapas y bicapas que simulan la membrana celular), estudios termodinámicos en superficie y técnicas de caracterización de materiales, especialmente en la microscopía de fuerza atómica (AFM).

3. Materiales y métodos

A continuación se indican los reactivos, disolventes y equipos empleados en el desarrollo de este TFG, así como la metodología seguida.

3.1. Equipos

- Cuba doble KSV de dimensiones 580 x 145 mm². En este TFG se empleó con la funcionalidad de cuba simple. Cuenta con dos barreras móviles y un brazo para realizar transferencias sobre diferentes sustratos.
- Cuba NIMA 702 de dimensiones 720 x 100 mm² con dos barreras móviles.
- Espectrofotómetro UV Varian Cary 50 Bio, con monocromador Czerny-Turner, haz doble, lámpara de Xenon y un rango de longitudes de onda 190-1100 nm. Cubeta de cuarzo 1 mm.
- AFM: Multimode 8 (Bruker), de la empresa Veeco-Bruker, equipado con una unidad de control Nanoscope V (Bruker), perteneciente al Laboratorio de Microscopías Avanzadas (LMA) en el INA. Cantilevers RTESPA-150 (Bruker), con una frecuencia de resonancia nominal de 150 kHz y una constante de Spring nominal de 5 N·m⁻¹.
- Ultrasonidos.
- Microbalanza modelo Mettler ME30, con una precisión de ± 0,001 mg.
- Microjeringa Hamilton de 10 mL.

3.2. Reactivos y disolventes

En la **Tabla 3** se recoge un listado de los reactivos y disolventes empleados en este trabajo indicándose su CAS, proveedor y pureza.

Tabla 3. Reactivos y disolventes

Compuesto	CAS	Proveedor	Pureza
Ácido behénico	112-85-6	Sigma-Aldrich	≥99%
DPPC	63-89-8	Sigma-Aldrich	≥99%
Colesterol	57-88-5	Sigma-Aldrich	≥99%
CCM 1	458-37-7	Sigma-Aldrich	≥94% (<i>curcuminoid content</i>), ≥80% (<i>Curcumin</i>)
CCM 2	458-37-7	Laboratorio de Barcelona (*)	
Cloroformo	67-66-3	Macron Fine Chemicals	≥99,8%
Etanol	64-17-5	Laboaragón	≥99,5%
Metanol	67-56-1	Fisher Scientific	≥99,9%
Agua Mili-Q	7732-18-5	Destilador Facultad	Resistividad 18,2 MΩ·cm

(*)La curcumina utilizada en este trabajo fue comprada a la compañía Sigma-Aldrich. Inicialmente, en una colaboración abierta con Aranzazú González y Nuria Aliaga del ICMAB, estas proporcionaron al grupo Platón diversos curcuminoides, entre los que se encontraba la curcumina. Durante la realización de este TFG se observó que el curcuminóide del ICMAB presentaba trazas de agua por lo que se decidió continuar, a propia sugerencia de las investigadoras, con la curcumina comercial.

3.3. Isotermas y transferencias

La técnica de Langmuir permite el estudio de películas en la interfase líquido-aire, proporcionando información sobre las fuerzas intermoleculares entre las moléculas constituyentes de las películas, así como interacciones entre moléculas diferentes cuando se preparan monocapas con más de un componente. Las películas formadas en la interfase aire-líquido pueden ser transferidas sobre soportes sólidos formando las conocidas como películas de Langmuir-Blodgett (películas LB).

El dispositivo diseñado por Irving Langmuir a principios del siglo XX para obtener monocapas consiste en una cuba poco profunda fabricada de un material hidrófobo como el teflón que no sea mojado por el líquido que la rellena (en este TFG agua Milli-Q) de modo que el menisco convexo formado sobre el teflón sobresalga ligeramente (**Figura 3**). Las barreras fabricadas con teflón se encuentran en contacto con la subfase y, durante la compresión de la monocapa, se deslizarán a lo largo de la cubeta con objetivo de modificar el área disponible por las moléculas que se dispersan sobre el agua. La medida de la tensión superficial (diferencia entre la tensión superficial del agua pura y del agua con la monocapa) se realiza mediante una balanza de Wilhelmy.

En cuanto al protocolo de preparación de las películas, primero se limpia el teflón con acetona y cloroformo; así nos cercioramos de arrastrar cualquier resto de material (incluyendo trazas de agua que son arrastradas con la acetona) que haya podido quedar en la superficie de la cubeta y favorecemos la hidrofobicidad del material (gracias al cloroformo). Seguidamente se prepara el papel para la balanza de Wilhelmy, limpiándolo con etanol y, una vez seco, se mantiene sumergido en un vaso con agua Milli-Q de modo que el agua empape bien el papel. Se llena la cuba y se realizan dos lavados; cuando se llena por tercera vez, se coloca el papel en la balanza. Se realiza un blanco para asegurarnos de que no hay motas de polvo o partículas en la superficie que puedan interferir en el experimento; en este experimento en particular procuramos que la presión de la balanza no supere $1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ tras la compresión total de las barreras (si lo hace se limpia bien la superficie y se repite; si vuelve a suceder lo mismo en un par de ocasiones, se comienza de nuevo todo el proceso de limpieza).



Figura 3. Menisco convexo del agua, KSV

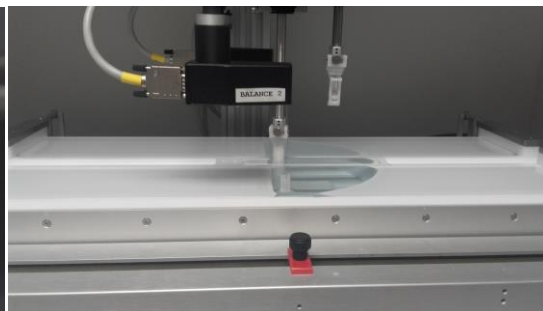


Figura 4. Cuba KSV

Cuando está preparada la cuba, se dispersa sobre la superficie del agua un volumen determinado de la disolución que contiene el compuesto a estudiar; para que la dispersión sea posible, el compuesto debe de ser soluble en un disolvente que sea a su vez volátil e insoluble con el agua. Además, el disolvente debe tener un coeficiente de extensión, S , positivo (en el caso del cloroformo el coeficiente de extensión sobre el agua a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ tiene un valor de $13,1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$). La dispersión se realiza con ayuda de la microjeringa, gota a gota, asegurándose de que estas no caen al fondo y que la presión de la balanza no supera los $1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Tras dispersar, se espera 30 minutos de modo que el disolvente se evapore y quede el tensoactivo en la superficie.

Conforme se comprimen las barreras, la balanza de Wilhelmy mide la fuerza que produce la interfase sobre el papel; la formación de la monocapa provoca la disminución de la tensión superficial, lo cual se traduce en un aumento de la presión superficial (π). La representación de π frente al área por molécula (A) a lo largo del proceso de compresión se conoce como isoterma π - A y en ella se pueden discernir las distintas fases y transiciones de fase por las que puede pasar una monocapa (aunque no todas las monocapas presentan todas las fases y transiciones de fase mostradas en la **Figura 5**).

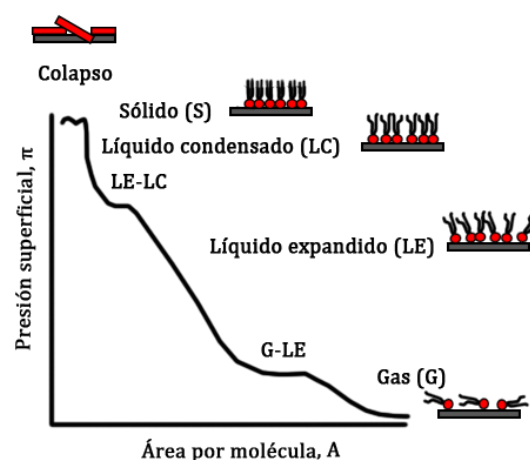


Figura 5. Gráfica representativa de una isoterma de compresión, genérica (Figura adaptada del libro *Physical Chemistry of Surfaces* de Adamson y Gast)¹¹

Es posible la transferencia de las películas, con ayuda de un brazo móvil, sobre substratos sólidos (mica en nuestro caso), donde las capas generalmente preservan un alto grado de orden. La técnica fue ideada por Katherine Blodgett, obteniéndose así las películas de Langmuir-Blodgett, y la transferencia puede ser por inmersión o por emersión (**Figura 6**).

Además, es posible la formación de una bicapa mediante una segunda inmersión o emersión de una monocapa LB en una disolución acuosa.

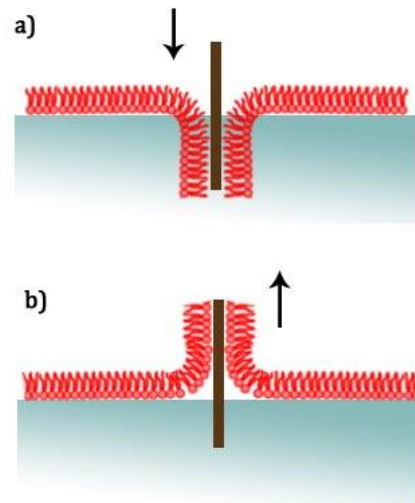


Figura 6. Transferencias a) por inmersión b) por emersión

3.4. Mezclas y cálculos termoquímicos

Los componentes de una monocapa mixta pueden ser miscibles, inmiscibles o parcialmente miscibles. El estudio detallado de las isotermas de presión superficial vs. área por molécula permite obtener información sobre dicha miscibilidad.¹²

Defay y Crisp aplicaron la regla de las fases al colapso de la monocapa y ésta puede emplearse, complementado por otros, como un criterio para establecer la miscibilidad en una película formada por sistemas multicomponentes. A temperatura y presión constantes y en ausencia de potenciales eléctricos impuestos externamente, el número de grados de libertad, f , para el sistema será:

$$f = C^B + C^S - P^B - P^S + 1 \quad (1)$$

donde C^B es el número de componentes que se equilibran en todo el sistema, C^S es el número de componentes restringidos a la superficie, P^B es el número de fases y P^S es el número de fases de la monocapa en equilibrio entre sí. Al aplicar esta regla en la zona del colapso, si los componentes son inmiscibles, se producirá el colapso a la presión de colapso, π_{col} , del componente con una π_{col} más baja. Si los componentes son totalmente miscibles, el colapso se producirá a presiones intermedias entre la presión de colapso de los dos componentes (proporcionalmente a las fracciones molares de éstos en la mezcla). La **Figura 7** resume estas ideas.

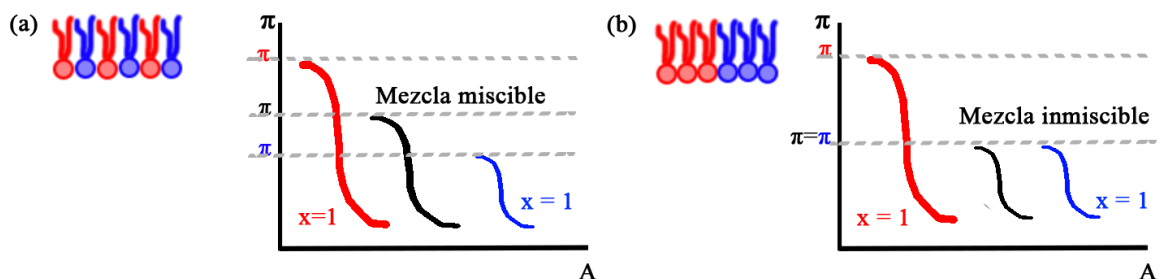


Figura 7. Isotermas presión superficial vs. área por molécula en monocapas mixtas de dos componentes (a) Componentes miscibles (b) Componentes inmiscibles.

Otro criterio para evaluar la miscibilidad de los componentes en las películas viene de la mano de las áreas de exceso. El área de exceso, A^E , se define como:

$$A^E = A_{\text{experimental}} - A_{\text{ideal}} \quad (2)$$

donde:

$$A_{\text{ideal}} = xA_1 + x_2A_2 \quad (3)$$

y por tanto

$$A^E = A_{12} - (x_1A_1 + x_2A_2) \quad (4)$$

A_{12} es el área por molécula en la película mixta, A_1 y A_2 son las áreas moleculares a la presión π de los componentes puros, x_1 y x_2 las fracciones molares. Así, si $A^E = 0$ los componentes son o bien miscibles o bien completamente inmiscibles, y si $A^E \neq 0$ los componentes son parcialmente miscibles.

Algunas dificultades asociadas a la determinación de la miscibilidad incluyen la obtención de isothermas no reproducibles, la formación desordenada de multicapas, la formación de complejos en la reacción, la formación de nuevas fases y la obtención de películas muy rígidas (donde el desbordamiento inducido por la rigidez de la película puede confundirse con el colapso).

Las mezcla de los componentes lleva asociada una energía del proceso de mezcla de los componentes puros conocida como energía libre de exceso de mezcla, ΔG_m^E . Para una monocapa mixta compuesta de dos componentes a una temperatura dada T , se tiene que:

$$\Delta G_m^E = \int_0^\pi A_{12} d\pi - x_1 \int_0^\pi A_1 d\pi - x_2 \int_0^\pi A_2 d\pi \quad (5)$$

Además, teniendo en cuenta:

$$\Delta G_m^{\text{ideal}} = RT(x_1 \ln x_1 + x_2 \ln x_2) \quad (6)$$

puede calcularse la energía libre del proceso de mezcla:

$$\Delta G_m = \Delta G_m^E + \Delta G_m^{\text{ideal}} \quad (7)$$

Otros parámetros de interés que se pueden determinar a partir de las isothermas de compresión son los del coeficiente de compresibilidad, C_s y del módulo de Young, K_s para detectar las fases y transiciones de fase:

$$C_s = - \frac{1}{A} \left(\frac{dA}{d\pi} \right)_T \quad (8)$$

$$K_s = C_s^{-1} = - A \left(\frac{d\pi}{dA} \right)_T \quad (9)$$

Los valores del módulo de Young se utilizan para asignar las fases y transiciones de fase en isothermas donde dichas transiciones de fase no resultan evidentes a partir de una simple inspección de la isoterma. De esta manera, valores de K_s entre 10-50 $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$ corresponden a la fase líquido expandido (LE), 100-250 $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$ a la fase líquido condensado (LC) y valores mayores de 250 $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$ a la fase sólido (S).^{11,13}

3.5. AFM

La invención del microscopio de sonda de barrido es uno de los mayores avances en ciencia de materiales. Incluye una gran familia de métodos de microscopía que comparten dos elementos de operación: una sonda en forma de punta y un mecanismo de *feedback* caracterizado por mantener constante el parámetro de interacción mientras la sonda escanea la muestra.¹⁴ La Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) comenzó a desarrollarse en 1986 para resolver las limitaciones del Microscopio de Efecto Túnel (STM): escanear materiales poco conductores como las biomoléculas.

Así, el AFM permite el estudio de la morfología de la monocapa y de algunas propiedades físicas como la adhesión o de las interacciones biomoleculares mediante la obtención de un mapa topográfico de la superficie de la muestra a escala nanoscópica.

Su mecanismo es el siguiente: la sonda o punta se encuentra en un soporte flexible denominado cantilever que sufre una deformación determinada dependiendo de la interacción punta-muestra. Esta interacción puede ser de dos tipos: interacción atómica de corto alcance (0,1 nm) o de largo alcance (1 nm), como las Fuerzas de Van der Waals atractivas o las fuerzas electrostáticas y/o magnéticas, que pueden ser atractivas o repulsivas. El valor de la interacción varía entre 10^{-7} y 10^{-9} N dependiendo de la distancia. La posición de la sonda se debe al movimiento de un piezoeléctrico (eje z), de los tornillos del equipo (eje x e y) y a la deflexión del cantilever, y es determinada por un láser que se refleja sobre un fotodiodo segmentado; de esta forma el movimiento se traduce en una diferencia de voltaje (**Figura 8**).

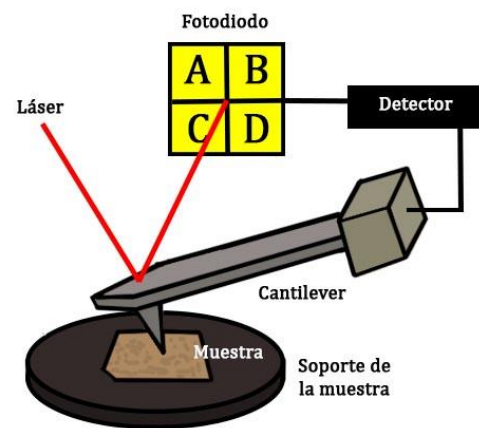


Figura 8. Mecanismo AFM

El modo de trabajo empleado en este TFG es el modo *tapping* en aire, en el que se produce un contacto intermitente entre la punta y la muestra de manera que se evita la fricción en los ejes x e y. La vibración del cantilever está definida a un valor próximo a su frecuencia de resonancia; tal y como se ha descrito en la sección 3.1. **Equipos** los cantilevers utilizados son RTESPA-150 (Bruker) y tienen una frecuencia de resonancia nominal de 150 kHz. Los parámetros utilizados para la obtención de imágenes en este trabajo fueron: *scan rate* 0,8 Hz y 512 x 512 pixels.

Se empleó el software Gwyddion 64Bit para procesar las imágenes obtenidas.

4. Resultados y discusión

4.1. Isotermas ácido behénico, DPPC y colesterol

Para familiarizarme con la fabricación de las películas y el empleo de los instrumentos (KSV y NIMA), realicé isotermas de ácido behénico que resultaron en consonancia con las de la literatura. Seguidamente realicé las isotermas de DPPC 10^{-4} M y colesterol 10^{-4} M (**Figura 9** y **Figura 10**) comprobando que los resultados eran reproducibles.

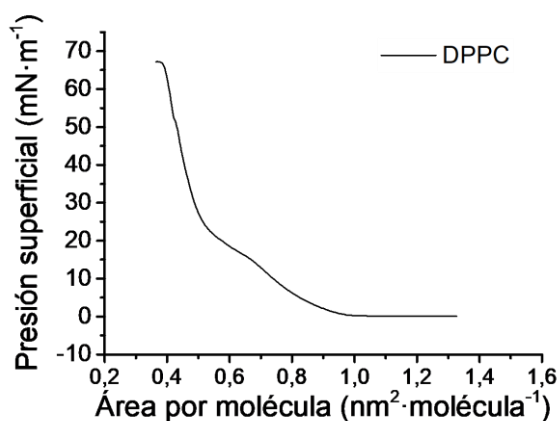


Figura 9. Isoterma DPPC

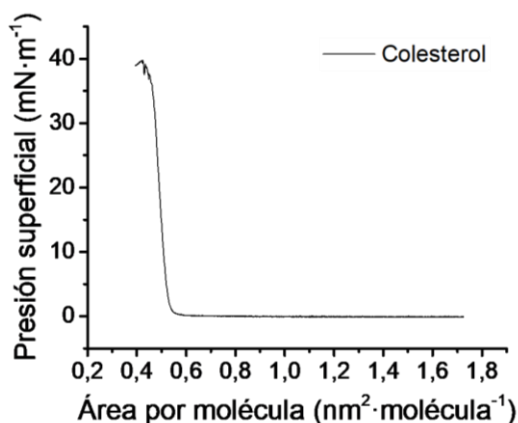


Figura 10. Isoterma colesterol

4.2. UV-Vis

Antes de realizar las isotermas con la CCM, se llevaron a cabo diversos experimentos de espectroscopia UV-Vis con el objetivo de determinar el rango de concentraciones en el que se cumple la ley de Lambert-Beer (**ecuación 10**) para evitar usar disoluciones donde las moléculas estén agregadas; en ese caso, nos daría lugar a isotermas no reproducibles y a películas formadas por multicapas o agregados tridimensionales en la superficie.

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C \quad (10)$$

A partir de una disolución de CCM comercial (Sigma-Aldrich) 10^{-3} M se realizaron las diluciones correspondientes para llevar a cabo el primer experimento. Se obtuvo la gráfica de absorbancia, A , frente a la longitud de onda, λ , (**Figura 11**) obteniendo una $\lambda_{\text{máx}}$ de 420 nm que concuerda con la literatura¹⁵. Las dos bandas observadas se atribuyen a la alta conjugación que presenta la molécula y a transiciones de transferencia de carga $n-\pi^*$ (carbonilo) y $\pi-\pi^*$ (dobles enlaces, aromáticos).

Seguidamente, se representaron los datos de absorbancia máxima frente a la concentración, obteniéndose una representación lineal de modo que se concluyó que se cumple la Ley de Lambert-Beer en el rango de concentraciones estudiado. Mediante un ajuste por mínimos cuadrados se obtuvo la pendiente de la recta y, sabiendo que el paso óptico es 0,1 cm, se calculó la absorptividad molar $58.953 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, cuyo valor es similar a los valores previamente publicados $55.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (teniendo en cuenta diferencias lógicas atribuibles a que el disolvente empleado en la literatura es metanol y la $\lambda_{\text{máx}}$ 425 nm).¹⁶

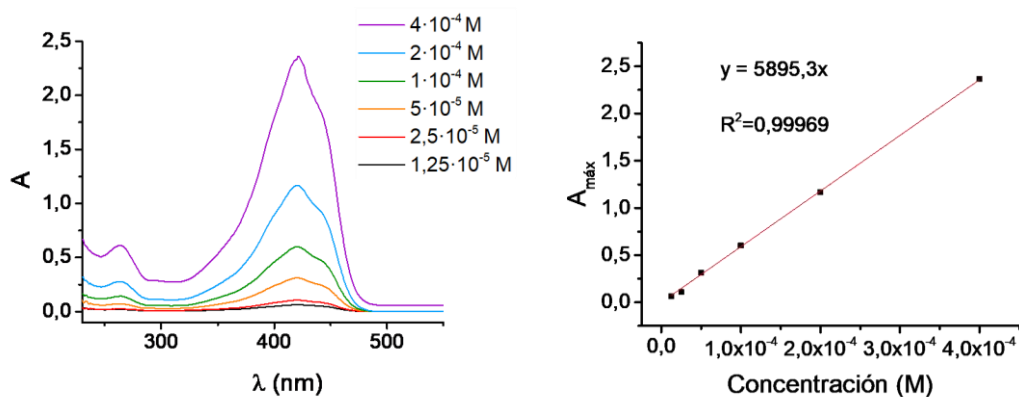


Figura 11. UV-vis de la disolución de curcumina comercial en cloroformo a las concentraciones indicadas (Izquierda) Absorbancia vs longitud de onda (Derecha) Absorbancia máxima vs concentración.

Se realizó el mismo procedimiento a partir de una disolución de CCM Barcelona 10^{-3} M y se obtuvieron las gráficas correspondientes (Figura 12). La $\lambda_{\text{máx}}$ resultó 420 nm y la absorptividad molar $59.475 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, concluyendo que también se cumple la Ley de Lambert-Beer y que los resultados concuerdan con los datos de la literatura.

Por último se comparó la disolución 10^{-4} M de la CCM comercial frente a una disolución 10^{-4} M de CCM de Barcelona. Como se ve en la Figura 13 la absorbancia de ambas disoluciones a la misma concentración difiere; el laboratorio admitió que el compuesto podía contener moléculas de agua, por lo que a partir de este momento se trabajó con la CCM comercial.

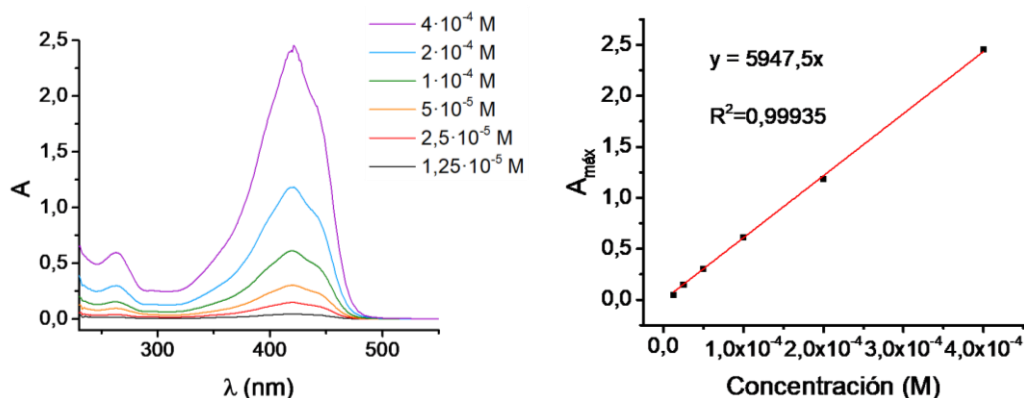


Figura 12. UV-Vis de la disolución de curcumina de Barcelona en cloroformo a las concentraciones indicadas (Izquierda) Absorbancia vs longitud de onda (Derecha) Absorbancia máxima vs concentración.

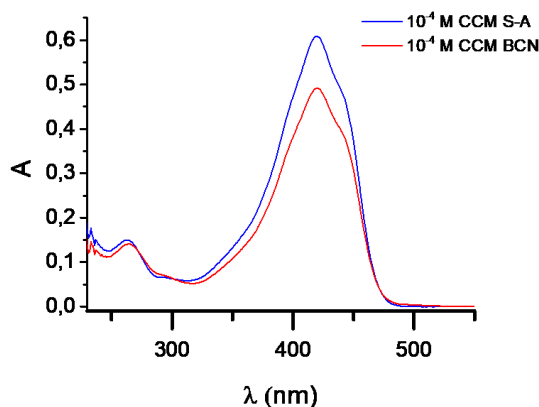


Figura 13. UV-Vis comparación de las disoluciones 10^{-4} M en cloroformo de curcumina comercial (línea azul) y de curcumina de de Barcelona (línea roja).

4.3. Isotermas CCM

Las isotermas de CCM publicadas previamente en la literatura y tomadas como referencia a efectos comparativos en este trabajo presentan las siguientes características:

Referencia 1. La isoterma de CCM pura muestra una presión de colapso de $9 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. NIMA Cuba Langmuir (Coventry, UK), área total 300 cm^2 , velocidad $20 \text{ cm}^2\cdot\text{min}^{-1}$. Disolución de CCM $200 \mu\text{M}$ en etanol.¹⁷

Referencia 2. La isoterma de CCM pura muestra una presión de colapso de $60 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Minicubeta KSV (Helsinki, Finland), velocidad $1 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$, subfase agua ultrapura $18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$. Disolución de CCM $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en metanol.¹⁸

En este TFG, primero se realizaron isotermas de diversas disoluciones de curcumina comercial en distintos disolventes variando el volumen dispersado. Se empleó tanto la cuba KSV como la NIMA. Como se puede observar en la **Figura 14, izquierda**, la presión de colapso alcanzada no superó los $6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ en ningún caso. Esto puede ser indicativo de que la CCM presenta poca actividad superficial; tres posibles causas son que el compuesto no se queda en la superficie, que se forman agregados y/o que no se ordena.

Con una disolución 10^{-5} M en cloroformo, en la KSV, sometiendo la disolución a ultrasonidos previamente a la dispersión por fin se consiguió que la presión subiera, obteniéndose isotermas reproducibles como se puede ver en la **Figura 14, derecha**. La isoterma correspondiente a la línea roja se obtuvo a partir de una disolución que no fue sometida a ultrasonidos y quizás por eso no subió la presión; probablemente se habían formado agregados.

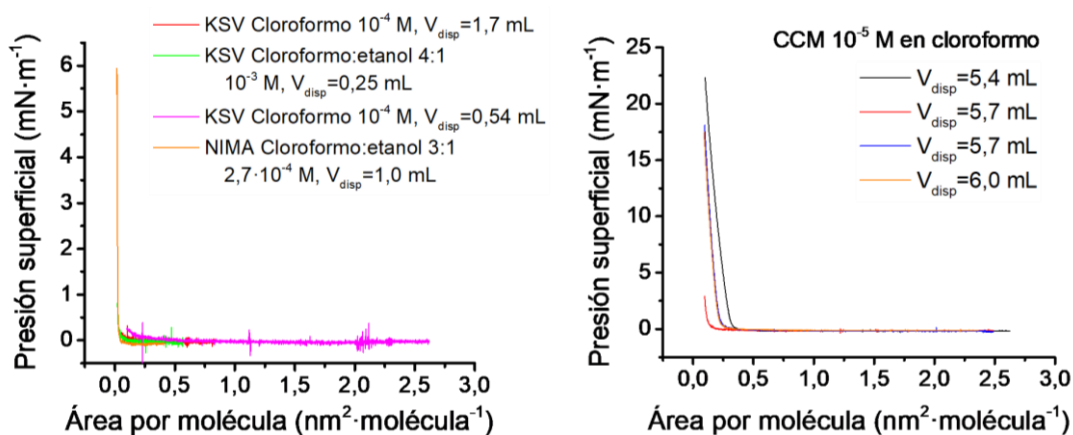


Figura 14. (Izquierda) Primeras isotermas en las que la presión de colapso no alcanzaba los valores esperados respecto a la literatura de referencia. Se emplearon diversas disoluciones de CCM cuyas características se indican en la leyenda y se utilizó tanto la cuba KSV como la NIMA. (Derecha) Isotermas de CCM 10^{-5} M en cloroformo, realizadas con la cuba KSV, con distintos volúmenes de dispersión.

En conclusión, las condiciones óptimas para la preparación de la disolución de CCM que se va a dispersar, teniendo en cuenta las dimensiones de la cuba que se usó, son: concentración 10^{-5} M en cloroformo, aplicar ultrasonidos a la disolución antes de dispersar para evitar la agregación y dispersar 6 mL de disolución. Al preparar la cuba se ha de evitar que el menisco esté muy pronunciado, lo cual puede provocar un desbordamiento temprano en el caso de isotermas muy rígidas.

4.4. Isotermas mezcla CCM-DPPC-Colesterol (1:1:1)

Recapitulando, para preparar la mezcla a dispersar se emplean las disoluciones DPPC en cloroformo 10^{-4} M, colesterol en cloroformo 10^{-4} M y CCM en cloroformo 10^{-5} M.

En 6 mL de disolución 10^{-5} M de CCM se calcula que hay $6 \cdot 10^{-8}$ mol de CCM, de modo que para mantener la proporción 1:1:1 se han de utilizar 0,6 mL de las disoluciones de colesterol y de DPPC. De esta forma se prepara un volumen final de 7,2 mL (la concentración final de CCM es $8,33 \cdot 10^{-6}$ M) del cual se dispersaron 5 mL.

Se registraron dos isotermas que fueron razonablemente reproducibles entre sí (**Figura 15, izquierda**). Asimismo, se observó que antes de cerrarse las barreras se desbordaba el agua; al hacer el blanco no ocurría y en las isotermas de CCM anteriores, en las que se dispersaban alrededor 6 mL tampoco había sucedido, por lo que se puede concluir que la mezcla forma una película rígida, lo cual provoca el desbordamiento al final del proceso de compresión (**Figura 15, derecha**).

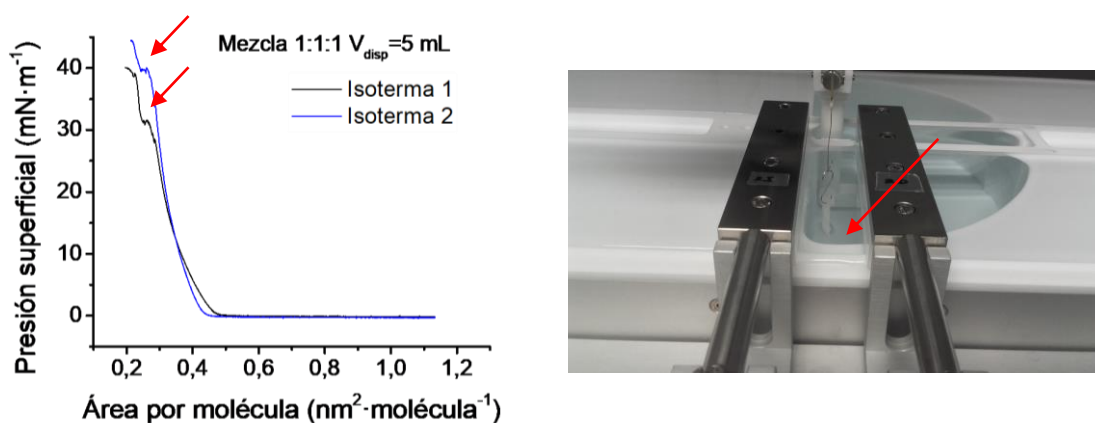


Figura 15. (Izquierda) Isotermas mezcla 1:1:1. Se ha señalado con flechas el momento del desbordamiento. (Derecha) Desbordamiento del agua en el borde del teflón señalado con una flecha.

4.5. Miscibilidad

En una primera exploración del sistema, se realizaron las isotermas de mezclas binarias CCM-DPPC y CCM-Colesterol a las siguientes fracciones molares de x_{CCM} 0,2 0,6 y 0,8 a expensas de, según se vieran las tendencias, hacer más puntos a otras fracciones molares. Sin embargo, debido al estado de alarma no se pudo completar el estudio, así que se presenta aquí con un número bajo de puntos pero que proporciona una información suficiente, en el marco de un TFG, del comportamiento del sistema. En un futuro, si se desea publicar estos datos, será necesario registrar un mayor número de datos.

Se comprueba que conforme se aumenta la fracción molar de CCM las isotermas están más comprimidas y la presión de colapso disminuye (**Figura 16**) lo cual cuadra con el comportamiento de los compuestos puros.

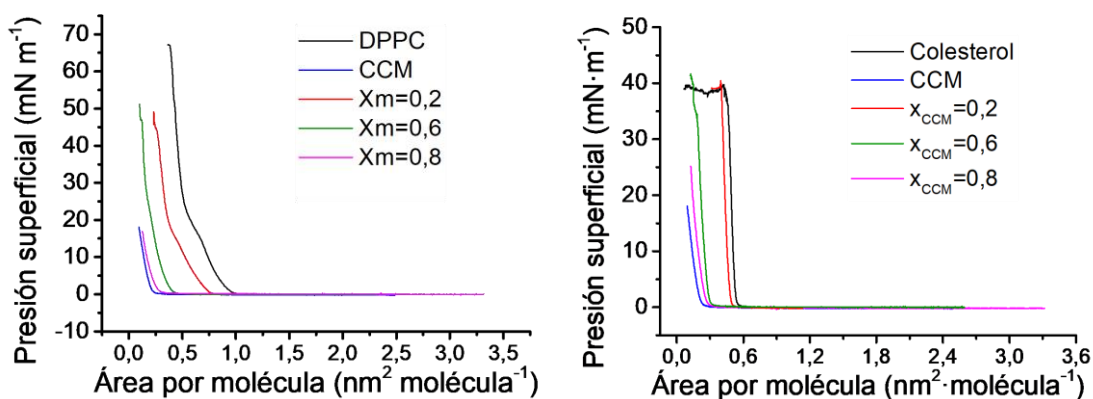


Figura 16. Isotermas de los compuestos puros y de las mezclas binarias (izquierda) CCM-DPPC y (derecha) CCM-Colesterol a las correspondientes fracciones molares de CCM.

Se calcularon las áreas de exceso, A^E , aplicando las **ecuaciones 2, 3 y 4**, tomando los valores directamente de las isotermas anteriores a las presiones 5, 10 y 15 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ y se representaron frente a la fracción molar de curcumina, x_{CCM} .

En vista de la **Figura 17**, se observan valores pequeños para las áreas de exceso. Los valores negativos indican interacciones atractivas entre los compuestos, mientras que valores positivos indican interacciones repulsivas. Generalmente se admite que el error en la determinación del área por molécula es de $0,05 \text{ nm}^2\cdot\text{molécula}^{-1}$ por lo que con los valores obtenidos parece que hay una cierta miscibilidad parcial. Como realmente estamos próximos al límite de la resolución de las medidas, habría sido conveniente ver si se puede obtener información adicional sobre la miscibilidad por otras vías como estudios adicionales en la interfase aire-agua y con AFM una vez se han transferido las películas en distintas proporciones (como veremos más adelante).

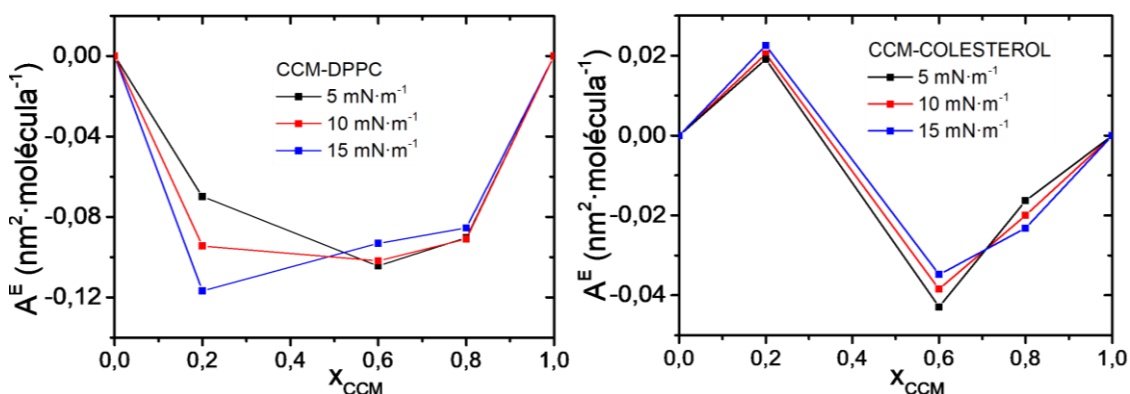


Figura 17. Representación del área de exceso frente a la fracción molar de CCM

Asimismo, se calculó la energía libre de exceso de la mezcla, ΔG_m^E aplicando la **ecuación 5** a las presiones 5, 10 y 15 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ y se representó frente a la fracción molar de curcumina (**Figura 18**). Valores positivos de ΔG_m^E indican la existencia de interacciones más débiles entre los componentes que entre los propios compuestos puros y sugieren cierta separación de fases entre los componentes en la interfase. Valores negativos de ΔG_m^E indican la presencia de interacciones entre los componentes en la interfase; en nuestro experimento se pueden observar este tipo de interacciones en la mezcla de DPPC-CCM en todas las fracciones molares analizadas, y en la mezcla

colesterol-CCM en las fracciones molares 0,6 y 0,8 a las tres presiones de estudio. Al aumentar la presión la ΔG_m^E disminuye indicando una mayor miscibilidad de los componentes. Estos resultados parecen apuntar a que los componentes son parcialmente miscibles. Esto habrá de confirmarse o descartarse con información complementaria que vamos a analizar a continuación.

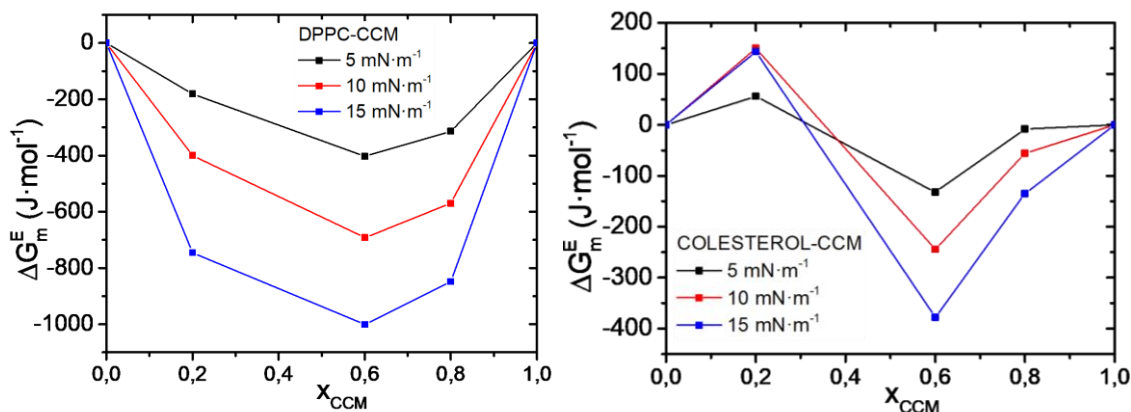


Figura 18. Representación de la energía libre de exceso frente a la fracción molar de CCM

Aplicando las **ecuaciones 6 y 7** se calculó la energía libre de la mezcla, ΔG_m , y se representó frente a la fracción molar de curcumina (**Figura 19**). Se ha de notar que la energía libre ideal, ΔG_m^{ideal} , no es cero y que la temperatura de trabajo es 295 K. Estos resultados parecen indicar que hay una buena miscibilidad entre los componentes ya que se observan energías de mezcla negativas a p y T constante. Por otra parte, estos valores se hacen algo más negativos al aumentar la presión, indicando así que la miscibilidad es mayor a medida que se tienen monocapas más condensadas.

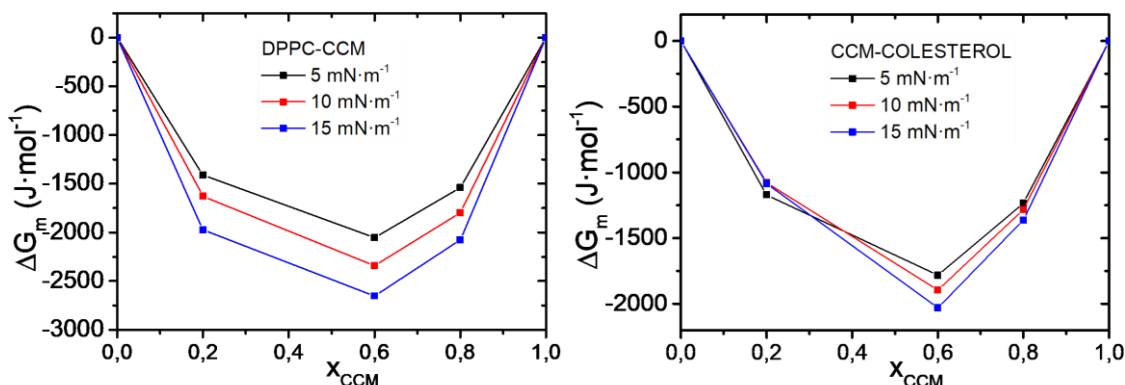


Figura 19. Representación de la energía libre de la mezcla frente a la fracción molar de CCM

Para terminar el estudio termoquímico y detectar las transiciones de fase se calculó el módulo de Young, K_s a partir de las **ecuaciones 8 y 9** y se representó frente a la presión superficial. En la **Figura 20** se observa el efecto que tiene la curcumina en la DPPC, apreciándose una clara disminución en el valor de K_s al aumentar la fracción molar de la curcumina; no sólo en valor absoluto al realizar la mezcla, sino que también su valor es más bajo que la K_s ponderada a las fracciones molares de cada componente. Es más, en el caso de x_{CCM} 0,8 se observa que la película mixta presenta valores algo inferiores de K_s en comparación con la curcumina pura. Un efecto similar se aprecia en el caso del colesterol, para el que la presencia de curcumina se traduce en una

disminución significativa en la K_s a lo largo de todo el proceso de compresión de las películas. Este resultado indica que, aunque las monocapas mixtas son más comprimidas ($A^E < 0$) y el proceso de mezcla es espontáneo ($\Delta G_m^E < 0$), al añadir curcumina las películas son más desordenadas (menores K_s). Estos resultados indican que existen fuerzas de atracción entre la curcumina y el DPPC (lo mismo ocurre entre la CCM y el colesterol), posiblemente entre las cabezas polares de los materiales, pero la CCM induce un mayor desorden en las cadenas alifáticas del fosfolípido resultando en una fase más expandida.

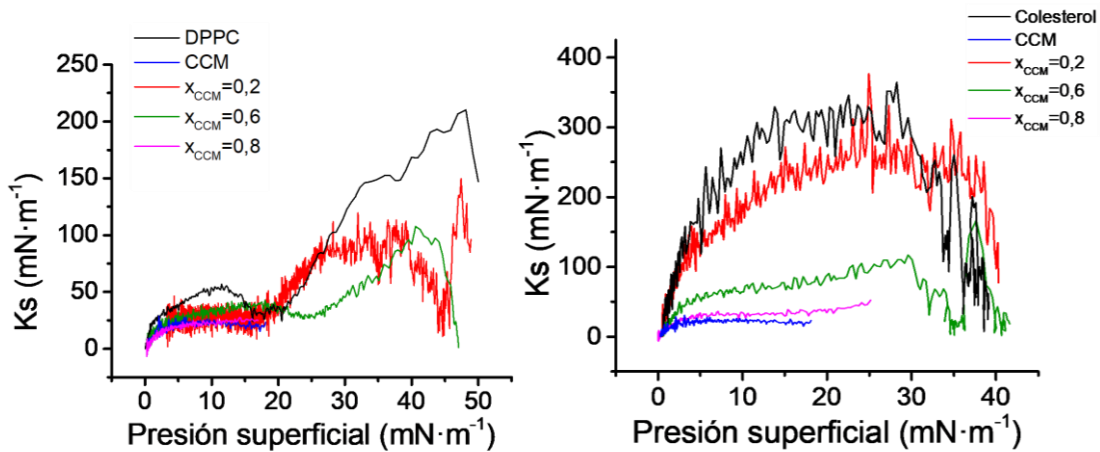


Figura 20. Representación de K_s frente a la fracción molar de CCM (Izquierda) CCM-DPPC (Derecha) CCM-Colesterol

En la **Figura 21, izquierda** se muestra una comparativa de las isothermas de mezcla 1:1:1 y las isothermas de los compuestos puros donde se observa claramente que el área de exceso para esta mezcla ternaria es negativa. También se calculó el módulo de Young, K_s a partir de las **ecuaciones 8 y 9** y se representó frente a la presión superficial; en la gráfica de la derecha se muestra comparándola respecto de los compuestos puros. Puede apreciarse cómo en la mezcla ternaria el módulo de Young de la proporción 1:1:1 es más bajo (por ejemplo K_s a $10 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1} = 74 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) que el ideal (K_s ideal a $10 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1} = 112$) $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ por lo que la mezcla ternaria exhibe una mayor fluidez de membrana.

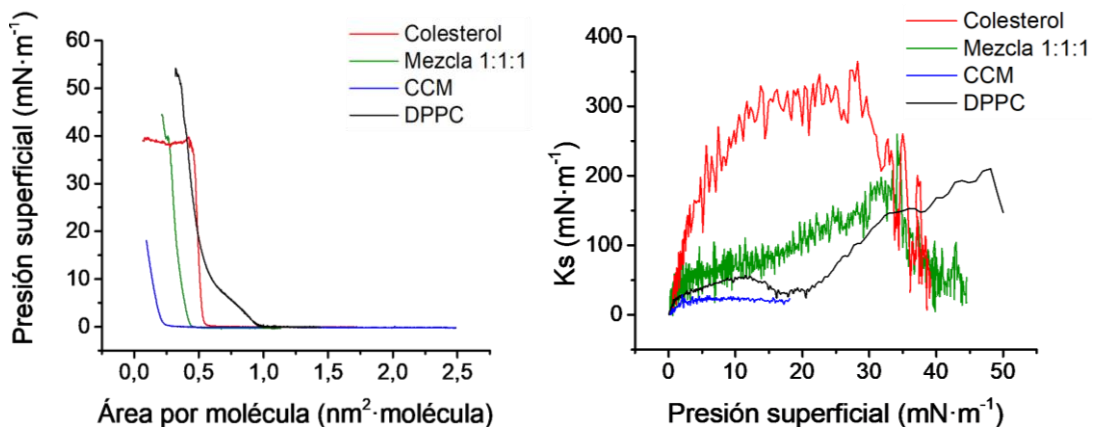


Figura 21. (Izquierda) Comparación de la isoterma de mezcla 1:1:1 con las isothermas de los compuestos puros. (Derecha) Comparación de los datos de K_s de mezcla 1:1:1 con las de los compuestos puros.

En la **Figura 22** se muestra un esquema con el modelo propuesto. Estos resultados son compatibles con observaciones previas en la literatura donde, a través de estudios de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), se ha demostrado la interacción entre la CCM y la cabeza polar del fosfolípido.¹⁹ Este efecto expansivo es aplicable también al caso del colesterol donde previsiblemente se producen también interacciones entre los grupos –OH de ambos materiales y donde factores estéricos entre el CCM y el colesterol pueden limitar una mayor compresión de la película (áreas de exceso más pequeñas que en el caso del DPPC y CCM).

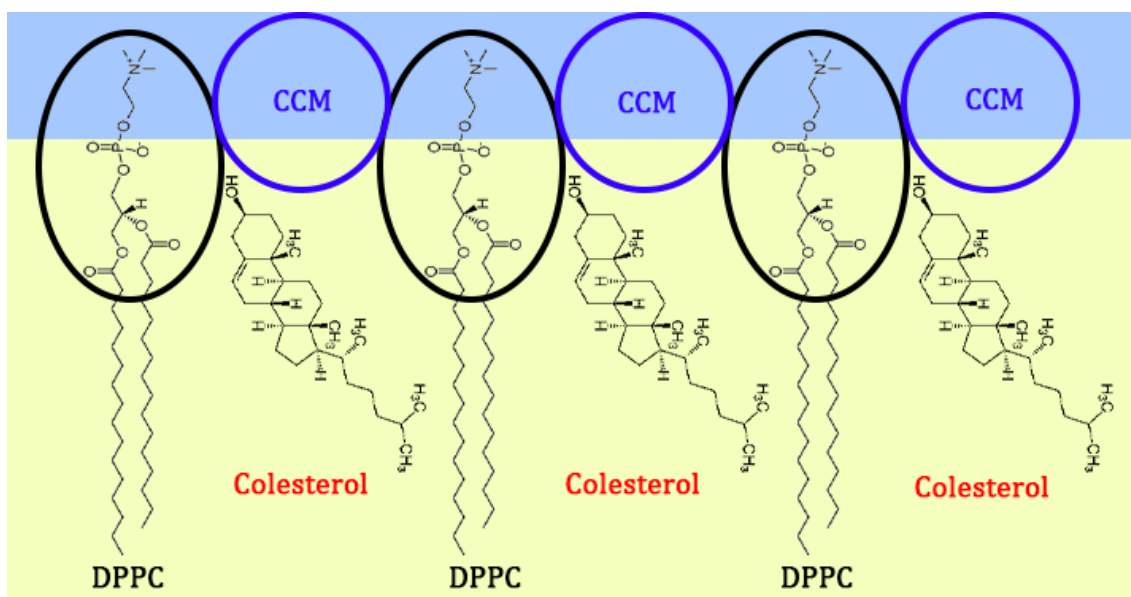


Figura 22. Esquema propuesto de la interacción de la CCM con una monocapa de DPPC y colesterol en una mezcla ternaria 1:1:1

4.6. Transferencias

Una vez optimizadas las condiciones para la preparación de monocapas con isothermas reproducibles, se realizaron las siguientes transferencias sobre sustratos de mica:

- Disolución CCM $10^{-5}M$ a la presión $10 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$
 - Inmersión
 - Emersión
- Mezcla CCM-DPPC-colesterol (1:1:1), emersión. Transferida a las presiones $5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, $15 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ y $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$.



Figura 23. Foto tomada durante el proceso de transferencia en la cuba KSV

4.7. AFM

En total se procesaron una treintena de imágenes con el software Gwyddeen y se dibujaron diversos perfiles para analizar la topografía de las capas depositadas. Para la presentación de esta memoria de TFG, se han seleccionado únicamente aquellas imágenes y perfiles más representativos de cada experimento; los perfiles están señalizados con una línea diagonal roja que va desde el extremo inferior izquierdo al superior derecho.

4.7.1. CCM $10^{-5}M$, $10 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$

Recordamos que las dimensiones de una molécula de curcumina son aproximadamente $1,7 \text{ nm} \times 0,86 \text{ nm}$ (Spartan, **Figura 1**). Las imágenes AFM muestran que se deposita una película de curcumina sobre un sustrato de mica tanto en el experimento de emersión como en el de inmersión a una presión de transferencia de $10 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

En las películas transferidas durante la emersión del sustrato (**Figura 25, derecha**), se observan regiones totalmente homogéneas de curcumina (y algún agregado en forma de filamento). En las películas transferidas durante la inmersión (**Figura 25, izquierda**), se observan regiones homogéneas de curcumina y una región de mica en la que las moléculas se distribuyen de una forma distinta o incluso pudiera haber mica sin cubrir por la película. La diferencia de altura entre estas regiones es de aproximadamente $0,6 \text{ nm}$, lo cual podría corresponderse con una proyección más o menos plana de la molécula (**Figura 24**) si asumimos que las zonas de menor altura corresponden con mica desnuda.

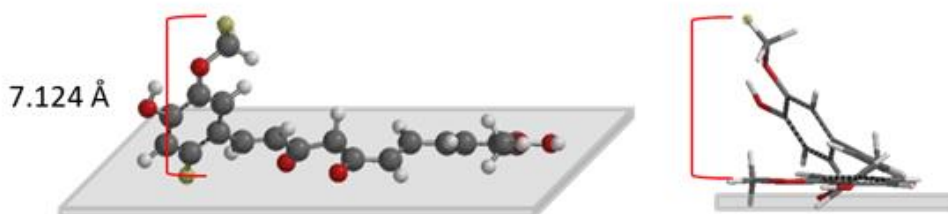


Figura 24. Posible disposición de una molécula de CCM sobre un soporte sólido.

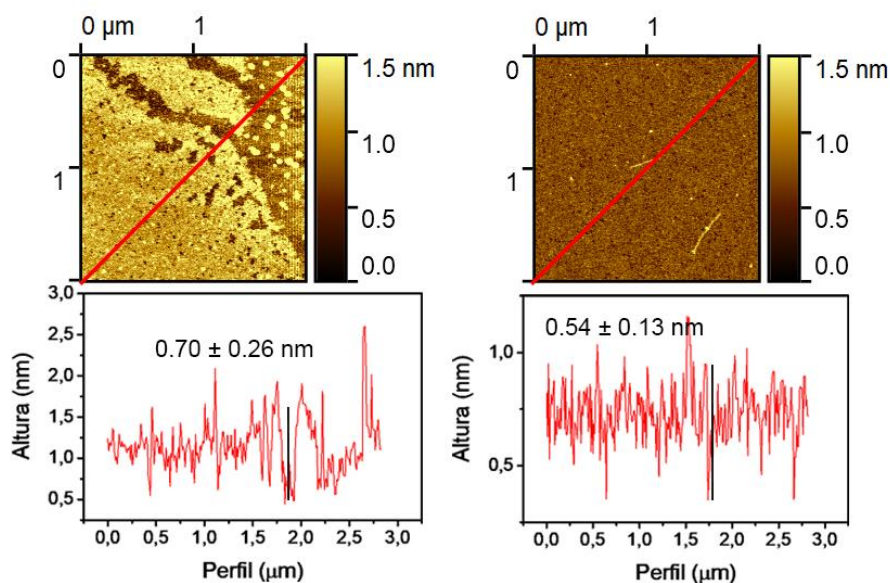


Figura 25. Transferencia de CCM 10^{-5} M a la presión $10 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Tamaño de las imágenes $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ (Izquierda) Experimento de inmersión (Derecha) Experimento de emersión. (Debajo) En ambos casos se representa el perfil correspondiente con una línea roja; asimismo se marca con una línea negra una altura representativa.

4.7.2. Mezcla CCM-DPPC-Colesterol (1:1:1)

Recordamos que la longitud de una molécula de DPPC es $2,4 \text{ nm}$ y la longitud de una molécula de colesterol es de $1,6 \text{ nm}$ (Figura 2), semejante a la curcumina. También, para ponernos en contexto cabe recordar que las películas de DPPC-Chol en proporción 1:1 son muy homogéneas, sin presencia de huecos ni de agregados tridimensionales.³

De las imágenes de AFM obtenidas para las películas CCM-DPPC-colesterol 1:1:1 se concluye que a todas las presiones de transferencia estudiadas la mica se ha cubierto completamente, formándose una película muy homogénea en la que no se aprecian poros o huecos. La ausencia de zonas sin cubrir impide hacer un perfil con el que obtener la altura de la monocapa; para conocer el espesor del material depositado se podría realizar un *scratch* o rascado, pero en este caso no fue posible determinarlo debido a que son muestras muy blandas y resultó particularmente complicado hacer dicho rascado asegurándonos de eliminar bien el material orgánico.

A la presión $5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (Figura 26, izquierda) se observan dominios que difieren en $0,5\text{-}1,5 \text{ nm}$ lo cual puede deberse a la presencia de dominios en los que las moléculas se disponen con distinta inclinación. También se aprecian pequeños agregados de 10 nm de altura aproximadamente.

A la presión $15 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (Figura 26, centro) se observan regiones más homogéneas, lo cual parece coincidir con lo observado en el caso anterior, y se mantiene la presencia de estructuras tridimensionales en forma de “filamentos” y “partículas” (altura $5\text{-}10 \text{ nm}$ aproximadamente).

A la presión $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (Figura 26, derecha) se observan dominios que poseen una altura de $1,7 \text{ nm}$ aproximadamente respecto a la región menos profunda de la película. Se aprecian aún más estructuras tridimensionales, lo cual puede indicar colapsos locales de la monocapa bien en la interfase aire-agua o bien inducidas por la mica.

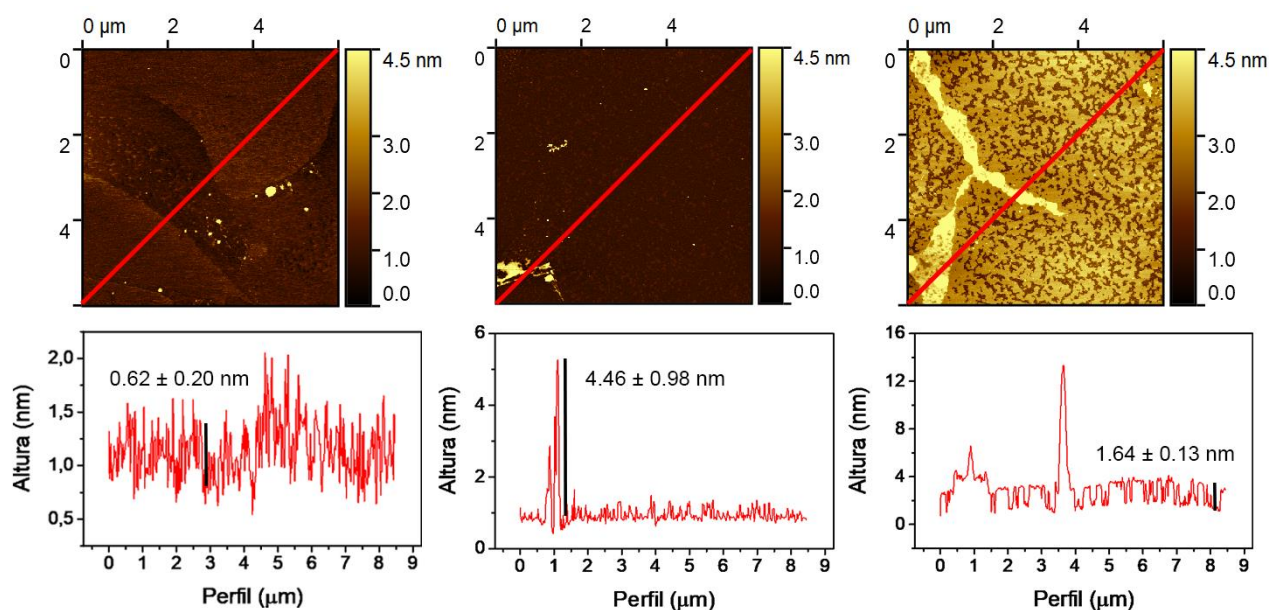


Figura 26. Imágenes de AFM de la transferencia de la mezcla 1:1:1, emersión.

Tamaño de las imágenes 6 μm x 6 μm .

(Izquierda) a la presión 5 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (Centro) a la presión 15 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (Derecha) a la presión 25 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$.
 (Debajo) En los tres casos se representa el perfil correspondiente con una línea roja; asimismo se marca con una línea negra una altura representativa.

Para terminar, en la **Figura 27** se muestra la ampliación (2 μm x 2 μm) de una región bastante homogénea de la muestra transferida a la presión 15 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ en la que la altura del perfil es 1,5 nm aproximadamente.

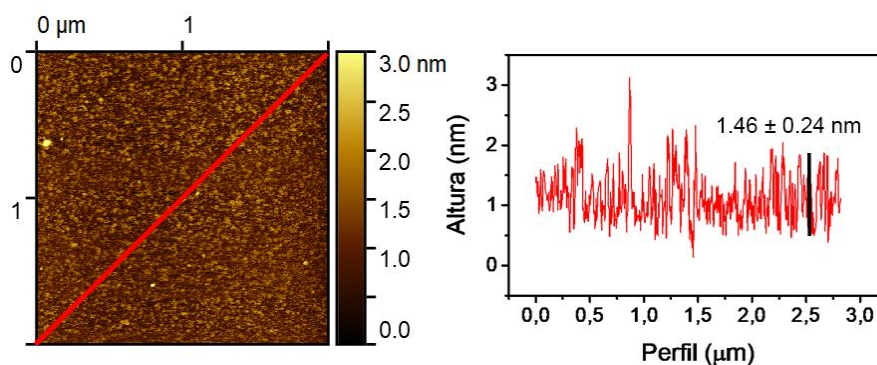


Figura 27. Imagen de AFM de la transferencia de la mezcla 1:1:1, emersión a la presión 5 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (ampliación de una región). Tamaño de la imagen 2 μm x 2 μm . A la derecha se representa el perfil correspondiente con una línea roja; asimismo se marca con una línea negra una altura representativa.

En definitiva, estas imágenes muestran una topografía bastante uniforme, sin presencia de dominios claros de uno u otro tipo de material. La presencia de agregados de mayor tamaño (no observables en isoterma de DPPC-chol en proporción 1:1, aunque sí a otros ratios entre estos dos componentes), podría indicar que éstos son inducidos por la cúrcuma, si bien serían necesarios otros estudios complementarios para indicar si dichos agregados son más ricos en cúrcuma o en otros componentes.

5. Conclusiones y perspectivas de futuro

En esta memoria de TFG se ha realizado una primera aproximación en el estudio del comportamiento de mezclas binarias de curcumina con DPPC y curcumina con colesterol mediante los modelos de Langmuir y Langmuir-Blodgett y también se ha analizado el caso de una mezcla ternaria de composición CCM-DPPC-colesterol 1:1:1.

Primero se obtuvieron las isotermas correspondientes a los compuestos puros, comprobándose que fueran reproducibles, y una vez optimizadas las condiciones de trabajo se estudiaron mezclas binarias y ternarias de los compuestos. En el estudio termoquímico se ha determinado que, tanto para las mezclas binarias CCM-DPPC (1:1) y CCM-Colesterol (1:1) como para la mezcla ternaria CCM-DPPC-Colesterol (1:1:1), la curcumina es parcialmente miscible, siendo la miscibilidad mayor conforme las monocapas están más condensadas, es decir, conforme aumenta la presión superficial. Esto se ve reflejado en los cálculos de áreas de exceso (A^E), de energía de Gibbs de mezcla de exceso (ΔG_m^E) y de energía de Gibbs de mezcla (ΔG_m), que son en su mayoría negativos. Además, se ha observado que la curcumina disminuye el módulo de Young, K_s del DPPC. Estos resultados indican que la curcumina presenta interacciones atractivas con el DPPC (previsiblemente con su parte polar), de forma que las moléculas de CCM se sitúan entre moléculas de DPPC, resultando en un área de exceso negativa (posible contribución de interacciones moleculares más efectos estéricos), pero impidiendo un buen empaquetamiento de las cadenas alquílicas del DPPC lo que resulta en menores valores del módulo de Young, es decir, monocapas con fases más expandidas o más fluidizadas. En el caso del sistema ternario también se han observado áreas de exceso negativas y valores de K_s inferiores al ideal. Por último, las monocapas de curcumina pura y de mezcla ternaria se han caracterizado mediante AFM. La curcumina forma monocapas homogéneas y en cuanto al sistema ternario se observan regiones homogéneas, sin dominios que puedan apreciarse dentro de la resolución de las imágenes, que sostienen la idea de miscibilidad (parcial) entre los componentes.

La realización de este trabajo me ha permitido consolidar los conocimientos y habilidades adquiridos a lo largo del Grado de Química, así como aprender nuevas técnicas y métodos de trabajo. Debido al estado de alarma, es cierto que no se ha podido explorar todo el rango de composiciones de las mezclas, lo que hubiera dado una visión detallada del problema, pero por suerte los datos recopilados hasta este momento sí han servido para mostrar una visión general del comportamiento de la curcumina y poder analizar distintas propiedades termodinámicas de mezcla. Igualmente, encuentro necesario matizar de nuevo que este TFG se trata de un estudio preliminar a un trabajo global y complejo que incluiría un estudio más riguroso de cálculos y mayor número de experimentos (realizando un sistema ternario completo, caracterizando las mezclas binarias mediante microscopía...) lo cual excede las horas planteadas para la realización de un TFG. Asimismo, hay que tener en cuenta las aproximaciones que se han considerado (en las membranas celulares las proporciones de los compuestos es variable y las estructuras son mucho más complejas) o algunas limitaciones de los equipos (el AFM empleado no cuenta con microscopía Raman o IR acoplada para poder analizar la composición de la muestra simultáneamente al barrido).

Como perspectivas de futuro, además de completar este estudio preliminar, se podrían plantear otros fosfolípidos como modelos de membranas para estudiar su interacción con la curcumina e introducir otros compuestos como glúcidos o proteínas.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Haas, L. F. Papyrus of Ebers and Smith. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 1999, 67 (5), 78; DOI:10.1136/jnnp.67.5.578
- (2) Yang, S. *The Divine Farmer's Materia Medica: A Translation of the Shen Nong Ben Cao Jing*. Blue Poppy Press USA, 2007.
- (3) Ruiz, S.; González-Orive A.; de la Fuente, J. M.; Cea P. Reversible Monolayer-Bilayer Transition in Supported Phospholipid LB Films under the Presence of Water: Morphological and Nanomechanical Behavior. *Langmuir* 2017, 33 (30), 7538-7547. DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b01268.
- (4) Li, X.; Mohammadi, A.S.; Ewing, A.G. Single cell amperometry reveals curcuminoids modulate the release of neurotransmitters during exocytosis from PC12 cells. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2016, 781, pp 30-35; DOI: 10.1016/j.jelechem.2016.10.025.
- (5) Feng, Y.; Wang, N.; Cheung, F.; Zhu, M.; Li, H. Molecular and Cellular Mechanism Studies on Anticancer Effects of Chinese Medicines. In *Book Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies*; Olsztynska, S., Eds.; InTech, 2011; pp 335-337; DOI: 10.5772/13613.
- (6) PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/969516> (Acceso 2019-2020)
- (7) González-Albadalejo, J.; Sanz, D.; Claramunt, R. M.; Lavandera, J. L.; Alkorta, I.; Elguero, J. Curcumina y curcuminoides: química, estudios estructurales y propiedades biológicas. *Real Acad Farm*, 2015, 81 (4), pp. 278-310
- (8) DrugBank. (<https://www.drugbank.ca/drugs/DB11672>) (Acceso 2019-2020)
- (9) Toimil P.; Prieto G.; Miñones J Jr.; Sarmiento F. A comparative study of F-DPPC/DPPC mixed monolayers. Influence of subphase temperature on F-DPPC and DPPC monolayers. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2010, 12, 13323-13332. DOI: 10.1039/c0cp00506a.
- (10) Krause, M. R.; Regen, S. L. The structural role of cholesterol in cell membranes: from condensed bilayers to lipid rafts. *Acc. Chem. Res.* 2014, 47, 3512-3521. DOI: 10.1021/ar500260t.
- (11) Adamson, A. W.; Gast, A.P. *Physical Chemistry of Surfaces*, 6th Edition. Wiley-Interscience. 1997.
- (12) Fernández-Botello, A.; Comelles, F.; Alsina, M. A.; Cea, P.; Reig, F. A monolayer study on interactions of docetaxel with model lipid membranes. *J. Phys. Chem. B* 2008, 112, 13834-13841. DOI:10.1021/jp806423k.
- (13) Gaines, G. L. *Insoluble monolayers at liquid-gas interface*; Interscience Publishers and John Wiley & Sons: New York, 1966.
- (14) García, R. *Amplitude Modulation Atomic Force Microscopy*. Wiley-VCH, 2010. DOI: 10.1002/9783527632183
- (15) Benassi, R.; Ferrari, E.; Lazzari, S.; Spagnolo, F.; Salladini, M. Theoretical study on Curcumin: A comparison of calculated spectroscopic properties with NMR, UV-vis and IR experimental data. *Journal of Molecular Structure*, 2008, 892, pp 168-176. DOI:10.1016/j.molstruc.2008.05.02
- (16) Priyadarsini, K. I. The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. *Molecules*, 2014, 19, 20091-20112; DOI: 10.3390/molecules19122009

(17) Karewicz, A. Et al. Interaction of curcumin with lipid monolayers and liposomal bilayers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011 (88) pp 231-239. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.06.037.

(18) Xu G. Et al. Investigation of Surface Behavior of DPPC and Curcumin in Langmuir Monolayers at the Air-Water Interface. *Hindawi*, 2017. Article ID 6582019, 12 pages. DOI: 10.1155/2017/6582019.

(19) Kotenkov, S.A., Gnezdilov, O.I., Khaliullina, A.V. et al. Effect of Cholesterol and Curcumin on Ordering of DMPC Bilayers. *Applied Magnetic Resonance*, 2019, 50, 511–520; DOI: 10.1007/s00723-018-1102-2