



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Químicas-Programa de Doctorado en Ciencias con
Mención en Química

ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES DE
METABOLITOS VEGETALES CON MEMBRANAS
CELULARES Y MODELOS MOLECULARES



Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con Mención en Química

JOSÉ RODOLFO COLINA LÓPEZ

CONCEPCIÓN-CHILE

2019

Profesor guía: Dr. Mario Suwalsky Weinsymer
Departamento de Polímeros, Facultad de Ciencias Químicas
Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección de Postgrado y a la Red Doctoral de Ciencia, Tecnología y Ambiente (REDOC) de la Universidad de Concepción por la beca de doctorado otorgada y el apoyo para asistencia a congresos y pasantía.

Al Dr. Mario Suwalsky por la oportunidad de realizar esta investigación en su laboratorio, por su confianza e invaluable apoyo académico y personal.

Al Dr. David Contreras por su constante apoyo y disposición académica y personal.

A Fernando Neira por su asistencia técnica y amabilidad en todo momento.

Al Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción, especialmente a Nataly Moreno por su asistencia técnica en los ensayos de resonancia paramagnética electrónica.

Al Dr. Luis Felipe Aguilar por su apoyo durante las estadías en el Laboratorio de Fotofísica y Espectroscopía Molecular del Instituto de Química de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

Al Dr. Kazimierz Strzałka y a la Dra. Malgorzata Jemiola-Rzeminska por su hospitalidad y apoyo durante la estadía de investigación en el Centro de Biotecnología Malopolska de la Universidad Jagelonica.

A la Dra. Marcela Manrique de la Universidad de Antioquia por su disposición y colaboración en los estudios de calorimetría diferencial de barrido.

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS.....	3
OBJETIVOS.....	4
OBJETIVO GENERAL.....	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
CAPÍTULO 1	
ASPECTOS GENERALES.....	5
1.1. METABOLITOS DE ORIGEN VEGETAL.....	5
1.2. LA MEMBRANA CELULAR.....	6
1.2.1. Estructura de la membrana celular.....	7
1.2.2. La bicapa lipídica.....	9
1.2.3. Fosfolípidos.....	10
1.2.4. Propiedades físicas de la bicapa lipídica.....	12
1.2.4.1. Fluidez de la bicapa lipídica.....	13
1.2.4.2 Comportamiento termotrópico de la bicapa lipídica.....	13
1.3. EFECTO DE ESPECIES OXIDANTES EN LA MEMBRANA CELULAR.....	15
1.3.1. Ácido hipocloroso.....	16
CAPÍTULO 2	
MODELOS DE MEMBRANA Y TÉCNICAS UTILIZADOS PARA ESTUDIAR LAS INTERACCIONES DE METABOLITOS VEGETALES CON LA MEMBRANA CELULAR.....	18
2.1. MODELOS DE MEMBRANA CELULAR.....	18
2.1.1. Multibicapas lipídicas.....	18
2.1.2. Liposomas.....	19
2.1.3. Eritrocitos humanos.....	20
2.1.4. Membranas aisladas de eritrocitos humanos sin sellar (IUM).....	23

2.2. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA ESTUDIAR LAS INTERACCIONES DE METABOLITOS VEGETALES CON LA MEMBRANA CELULAR	23
2.2.1 Difracción de rayos X	23
2.2.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	25
2.2.3. Espectroscopía de fluorescencia	26
2.2.4. Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica	29
2.2.5. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	30
2.2.6. Ensayos de hemólisis	31

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1. MATERIALES	33
3.1.1. Metabolitos vegetales	33
3.1.2. Fosfolípidos	34
3.1.3. Otros materiales	35
3.2. MÉTODOS	35
3.2.1. Estudios de difracción de rayos X en multibicapas de DMPC y DMPE	35
3.2.2. Estudios de calorimetría diferencial de barrido (DSC) en vesículas de DMPC y DMPE	36
3.2.3. Estudios de espectroscopía de fluorescencia en vesículas de DMPC y membranas aisladas de eritrocitos humanos	37
3.2.4. Estudios de espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR) en vesículas de DMPC y membranas aisladas de eritrocitos humanos	38
3.2.5. Estudios de microscopía electrónica de barrido (SEM) en eritrocitos humanos.....	39
3.2.6. Ensayos de hemólisis en eritrocitos humanos	40
3.2.7. Tratamiento de los extractos acuosos de hojas y corteza de la planta <i>Pilocarpus goudotianus</i>	41
3.2.7.1. Preparación del material vegetal.....	41
3.2.7.2. Determinación de polifenoles totales	41
3.2.7.3. Análisis de HPLC-MS	41
3.2.8. Análisis estadístico	42

CAPÍTULO 4

RESULTADOS	43
4.1. ESTUDIOS DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X EN MULTIBICAPAS DE DMPC Y DMPE	43
4.2. ESTUDIOS DE CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC) EN VESÍCULAS DE DMPC Y DMPE	48
4.3 ESTUDIOS DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA EN VESÍCULAS DE DMPC Y MEMBRANAS AISLADAS DE ERITROCITOS HUMANOS	53

4.4. ESTUDIOS DE ESPECTROSCOPÍA DE RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA (EPR) EN VESÍCULAS DE DMPC Y MEMBRANAS DE ERITROCITOS HUMANOS	56
4.5. OBSERVACIONES DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) EN ERITROCITOS HUMANOS	58
4.6. ENSAYOS DE HEMÓLISIS EN ERITROCITOS HUMANOS	65
4.7. CONTENIDO E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL EXTRACTO DE HOJAS Y CORTEZA DE <i>PILOCARPUS GOUDOTIANUS</i>	66

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN	72
CONCLUSIONES	81
APÉNDICE 1	83
APÉNDICE 2	89
APÉNDICE 3	91
Referencias	94



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición lipídica de membranas naturales	10
Tabla 2. Temperatura principal de transición (T_m) de DMPC puro y mezclas binarias DMPC/metabolitos vegetales obtenida a partir de los termogramas de DSC.....	50
Tabla 3. Ancho a media altura del pico principal de transición ($\Delta T_{1/2}$) de DMPC puro y mezclas binarias DMPC/metabolitos vegetales obtenido a partir de los termogramas de DSC	51
Tabla 4. Temperatura principal de transición (T_m) de DMPE puro y mezclas binarias DMPE/metabolitos vegetales obtenida a partir de los termogramas de DSC.....	52
Tabla 5. Ancho a media altura del pico principal de transición ($\Delta T_{1/2}$) de DMPE puro y mezclas binarias DMPE/metabolitos vegetales obtenido a partir de los termogramas de DSC.....	53
Tabla 6. Concentración inhibitoria media de la hemólisis causada por HClO en eritrocitos humanos (CI 50) para cada uno de los compuestos vegetales	66
Tabla 7. Contenido total de polifenoles expresado como equivalentes de ácido gálico (EAG) en los extractos de <i>P. goudotianus</i>	67
Tabla 8. Compuestos identificados en el extracto acuoso de la corteza de <i>P. goudotianus</i>	68
Tabla 9. Compuestos identificados en el extracto acuoso de las hojas de <i>P. goudotianus</i>	69



ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Representación de la membrana celular tal como fue propuesta por Singer y Nicolson en su modelo del mosaico fluido.....	8
Fig. 2. Modelo estructural de membrana celular. Este modelo de la membrana plasmática de una célula eucariota es una actualización del modelo propuesto por Singer y Nicolson en 1972.....	9
Fig. 3. Estructura de glicerofosfolípidos.....	12
Fig. 4. Comportamiento termotrópico y diferentes estructuras adoptadas por las fosfatidilcolinas en medio acuoso	15
Fig. 5. Representación esquemática de diferentes tipos de liposomas utilizados en los estudios de membrana.....	20
Fig. 6. Diferentes morfologías observadas en eritrocitos humanos después de la incubación con moléculas que interactúan con la membrana.....	21
Fig. 7. Distribución de las principales clases de fosfolípidos entre las dos monocapas de la membrana del eritrocito humano.....	22
Fig. 8. Diagrama de un experimento de difracción de rayos X en multicapas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) en fase gel.....	25
Fig. 9. Diagrama de un experimento de calorimetría diferencial de barrido (DSC) para determinar el comportamiento termotrópico de una muestra de fosfolípido.....	26
Fig. 10. Localización de las sondas fluorescentes laurdan y DPH entre las moléculas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) en una membrana	28
Fig. 11. Localización en la membrana de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y espectros característicos de las sondas paramagnéticas 5-SASL y TEMPO.....	29
Fig. 12. Diagrama de la observación de una muestra de eritrocitos humanos utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM).....	31
Fig. 13. Diagrama de un ensayo de hemólisis.....	32
Fig. 14. Patrón de difracción de rayos X de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) en agua (H ₂ O), y disoluciones de (A) ácido cafeico, (B) ácido gálico, (C) galato de epigallocatequina (GEGC), (D) crocina, (E) corteza y (F) hojas de <i>P. goudotianus</i>	43
Fig. 15. Patrón de difracción de rayos X de dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE) en agua (H ₂ O), y disoluciones de (A) ácido cafeico, (B) ácido gálico, (C) galato de epigallocatequina (GEGC), (D) crocina, (E) corteza y (F) hojas de <i>P. goudotianus</i>	45
Fig. 16. Patrón de difracción de rayos X de (A) dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y (B) dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE) en agua (H ₂ O) y diferentes concentraciones de ácido hipocloroso (HClO).....	46

Fig. 17. Patrón de difracción de rayos X de DMPE en agua (H ₂ O), ácido hipocloroso (HClO), y disoluciones de (A) ácido cafeico, (B) ácido gálico, (C) galato de epigallocatequina (GEGC), (D) crocina, (E) corteza y (F) hojas de <i>P. goudotianus</i>	47
Fig. 18. Termogramas de DSC de vesículas multilamelares (MLV) de DMPC en presencia de (A) ácido cafeico, (B) ácido gálico, (C) galato de epigallocatequina (GEGC), (D) crocina, (E) corteza (F) y hojas de <i>P. goudotianus</i>	48
Fig. 19. Termogramas de DSC de vesículas multilamelares (MLV) de DMPE en presencia de (A) ácido cafeico, (B) ácido gálico, (C) galato de epigallocatequina (GEGC), (D) crocina, (E) corteza y (F) hojas de <i>P. goudotianus</i>	51
Fig. 20. Medidas de polarización generalizada (PG) de laurdan en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC a 18 °C y 37 °C tratadas con diferentes concentraciones de ácido cafeico, ácido gálico, galato de epigallocatequina (GEGC), corteza y hojas de <i>P. goudotianus</i>	53
Fig. 21. Medidas de anisotropía (r) de DPH en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC a 18 °C y 37 °C tratadas con diferentes concentraciones de ácido cafeico, ácido gálico, galato de epigallocatequina (GEGC), crocina, corteza y hojas de <i>P. goudotianus</i>	55
Fig. 22. Medidas de polarización generalizada (PG) de laurdan y anisotropía (r) de DPH en membranas aisladas de eritrocitos humanos sin sellar (IUM) a 37 °C, tratadas con diferentes concentraciones de ácido cafeico, ácido gálico, galato de epigallocatequina, crocina, corteza y hojas de <i>P. goudotianus</i>	56
Fig. 23. Medidas de los parámetros espectroscópicos F y 2A _{max} obtenidos por EPR usando las sondas TEMPO y 5-SASL en LUV de DMPC e IUM tratadas con diferentes concentraciones de crocina.....	57
Fig. 24. Interacción y efecto protector de ácido cafeico sobre la morfología de eritrocitos humano.....	58
Fig. 25. Interacción y efecto protector de ácido gálico sobre la morfología de eritrocitos humanos.....	59
Fig. 26. Interacción y efecto protector de galato de epigallocatequina sobre la morfología de eritrocitos humanos.....	60
Fig. 27. Interacción y efecto protector de crocina sobre la morfología de eritrocitos humanos.....	61
Fig. 28. Interacción y efecto protector del extracto de la corteza de <i>Pilocarpus goudotianus</i> (P. corteza) sobre la morfología de eritrocitos humanos.....	62
Fig. 29. Interacción y efecto protector del extracto de las hojas de <i>Pilocarpus goudotianus</i> (P. hojas) sobre la morfología de eritrocitos humanos.....	63
Fig. 30. Porcentaje de hemólisis de eritrocitos humanos (RBC) incubados con 0.5 mM de HClO y diferentes concentraciones de (A) ácido cafeico, (B) ácido gálico, (C) galato de epigallocatequina (GEGC), (D) crocina, extractos de (E) corteza y (F) hojas de <i>Pilocarpus goudotianus</i>	65

LISTA DE ABREVIATURAS

CI 50	Concentración inhibitoria media de la hemólisis
CTP	Contenido total de polifenoles
DMPC	Dimiristoilfosfatidilcolina
DMPE	Dimiristoilfosfatidiletanolamina
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
EPR	Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica
GEGC	Galato de epigallocatequina
IUM	Membranas aisladas de eritrocitos humanos sin sellar
Laurdan	6-dodecanoil-2-dimetilaminonaftaleno
LUV	Vesículas unilamelares grandes
MLV	Vesículas multilamelares
MVs	Metabolitos vegetales
PBS	Buffer fosfato
PG	Polarización generalizada
RBC	Eritrocitos humanos
SA	Ángulo bajo
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SUV	Vesículas unilamelares pequeñas
TEMPO	2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi
WA	Ángulo amplio
5-SASL	Ácido 5-doxilesteárico



RESUMEN

Las plantas producen una amplia variedad de fitoquímicos necesarios para sus funciones metabólicas o para protegerse de patógenos invasores. La presencia de estos metabolitos en la dieta humana ha sido asociada con una reducción en la incidencia de enfermedades mortales crónicas como la aterosclerosis y el cáncer. Esta investigación abarcó el estudio de las interacciones y el efecto protector de los metabolitos vegetales (MVs), ácido gálico, ácido cafeico, galato de epigallocatequina, crocina, y los extractos de la planta *Pilocarpus goudotianus* en eritrocitos humanos (RBC) y modelos moleculares de su membrana. Estos últimos conformados por bicapas lipídicas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE), representativos de las clases de fosfolípidos ubicadas en la monocapa externa e interna de la membrana del eritrocito humano, respectivamente. Los experimentos de difracción de rayos X y de calorimetría diferencial de barrido (DSC) mostraron que los MVs producen perturbaciones estructurales y termotrópicas en multibicapas y vesículas de DMPC; sin embargo, estos efectos no se observaron en DMPE. Las espectroscopías de fluorescencia y de resonancia paramagnética electrónica (EPR), revelaron que los MVs inducen alteraciones en la dinámica y el orden molecular en vesículas de DMPC y en membranas aisladas de eritrocitos (IUM). La presencia de los MVs también indujo alteraciones morfológicas en los RBC, de su forma discoide normal a equinocitos. Estos hallazgos indican que las moléculas de los MVs se ubicaron preferencialmente en la monocapa externa de la membrana de los eritrocitos. La evaluación del efecto protector mostró que, con excepción de crocina, los MVs inhibieron las alteraciones morfológicas y la lisis inducida por HClO en los RBC. Los resultados de este estudio sugieren que la inserción de algunos MVs en la monocapa externa de la membrana de los RBC podría prevenir los efectos nocivos de HClO en los glóbulos rojos, protegiéndolos del daño oxidativo.

ABSTRACT

Plants produce a wide variety of phytochemicals necessary for their metabolic functions or to protect themselves from invading pathogens. The presence of these metabolites in the human diet has been associated with a reduction in the incidence of chronic deadly diseases such as atherosclerosis and cancer. This research included the study of the interactions and protective effect of plant metabolites (MVs), gallic acid, caffeic acid, epigallocatechin gallate, crocin, and the extracts from *Pilocarpus goudotianus* on human erythrocytes (RBC) and molecular models of its membrane. The latter consisted of bilayers built-up of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and dimyristoylphosphatidylethanolamine (DMPE), representative of phospholipid classes located in the outer and inner monolayers of the RBC membrane, respectively. X-ray diffraction and differential scanning calorimetry (DSC) experiments showed that MVs produced structural and thermotropic perturbations in multilayers and vesicles of DMPC; however, these effects were not observed in DMPE. Fluorescence and electronic paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy revealed that MVs induced alterations in the dynamics and molecular order in DMPC vesicles and in isolated erythrocytes membranes (IUM). The presence of MVs also induced morphological alterations in RBC, from their normal discoid form to echinocytes. These outcomes indicate that the MVs molecules were located in the outer monolayer of the erythrocyte membrane. The assessment of the protective effect showed that with the exception of crocin, the MVs inhibited the morphological alterations and lysis induced by HClO to RBC. The results obtained from this study suggest that the insertion of some MVs into the outer monolayer of the RBC membrane might prevent the access and deleterious effects of oxidant molecules such as HClO into the red cells, protecting them from oxidative damage.

INTRODUCCIÓN

Estudios epidemiológicos han demostrado que las personas que incluyen una alta cantidad de frutas y vegetales en su dieta tienen una menor incidencia de sufrir patologías crónicas, como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y cáncer ^{1,2}. Frutas y vegetales contienen altas concentraciones de compuestos bioactivos, como polifenoles y carotenoides, los que han sido principalmente señalados por sus propiedades antioxidantes debido a su habilidad para quelar metales y eliminar radicales libres ³. Estos metabolitos también se encuentran en gran proporción en el café y el té verde, donde se han vinculado con los efectos terapéuticos de estas bebidas ^{4,5}. Actualmente, la participación de los metabolitos vegetales (MVs) obtenidos de la dieta humana va más allá de simples antioxidantes, reconociéndose su actuación en diversos procesos biológicos como moléculas de señalización y promotoras de actividad enzimática ^{6,7}. Además, su comportamiento como pro-oxidantes y citotóxicos también ha sido reportado en algunos contextos celulares ⁸. Sin embargo, el papel exacto de los MVs obtenidos de la dieta en la salud humana no está completamente entendido ¹.

Algunas investigaciones sugieren que la potente actividad biológica mostrada por algunos MVs y su correspondiente protección contra algunas enfermedades está relacionada con la acción de estos metabolitos en la membrana celular ⁹. En consecuencia, el efecto de los fitoquímicos estará condicionado por su modo de interactuar con los componentes de la membrana, lo que en general depende de las características estructurales del compuesto ^{10,11}. Dado que la bicapa lipídica es la estructura universal de todas las membranas biológicas ¹², el estudio de su comportamiento en presencia de sustancias bioactivas es de fundamental importancia y materia de numerosas investigaciones ¹³. La bicapa lipídica es un entorno sumamente complejo y cuidadosamente equilibrado; por lo tanto, cualquier alteración inducida en su estructura por un agente externo puede tener impacto en la integridad de la membrana plasmática, lo que en último término afectará la función celular ¹⁴.

Con el propósito de elucidar los mecanismos moleculares asociados con la actividad de los MVs en la membrana celular, la presente investigación abarcó el estudio de las interacciones de cuatro metabolitos de origen vegetal y dos extractos de planta con eritrocitos humanos (RBC) y modelos moleculares de su membrana. Los modelos moleculares consistieron de bicapas lipídicas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE), representantes de las clases de fosfolípidos ubicadas en la monocapa externa e interna de la membrana de los RBC, respectivamente. La membrana del eritrocito, aunque menos especializada que otras membranas celulares, conserva suficientes funciones en común para ser considerada representativa de la membrana plasmática en general ¹⁵. Por otro lado, los MVs elegidos representan a las principales familias de metabolitos presentes en la dieta humana: ácido gálico y cafeico (ácidos fenólicos), galato de epigallocatequina (flavonoide) y crocina (carotenoide). Los extractos vegetales se obtuvieron de las hojas y corteza de *Pilocarpus goudotianus*, una planta reconocida en su lugar de origen (Sierra de San Luis, Venezuela) por sus propiedades antioxidantes y plaguicidas. Esta tesis incluye los resultados del estudio estructural, dinámico y termotrópico de las interacciones de los MVs con la membrana de los RBC y su capacidad protectora contra los daños causado por el ácido hipocloroso (HClO). HClO es un poderoso oxidante natural y un potente agente antimicrobiano involucrado en una gran cantidad de afecciones humanas relacionadas con procesos inflamatorios, incluyendo aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas y cáncer ^{16,17}. Comprender los mecanismos moleculares asociados con el efecto protector de los MVs a nivel de la membrana celular podría ayudar a explicar sus potentes efectos biológicos observados tanto *in vitro* como *in vivo*.

HIPÓTESIS

Las interacciones de polifenoles y carotenoides con los fosfolípidos presentes en la membrana del eritrocito humano causarían alteraciones en el comportamiento estructural, dinámico y termotrópico de su bicapa lipídica, lo que podría estar relacionado con la capacidad de estos metabolitos vegetales para proteger a los eritrocitos de las alteraciones morfológicas y la lisis causada por la especie oxidante ácido hipocloroso.



OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar las interacciones y el posible efecto protector de metabolitos vegetales (MVs) de relevancia biológica en eritrocitos humanos y modelos moleculares de su membrana.

Objetivos específicos

- Determinar el efecto estructural de los MVs en multibicapas de los fosfolípidos dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE) utilizando difracción de rayos X.
- Evaluar el comportamiento termotrópico de vesículas multilamelares (MLV) de DMPC y DMPE en presencia de los MVs mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC).
- Determinar las alteraciones dinámicas causadas por los MVs en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC y membranas aisladas de eritrocitos humanos sin sellar (IUM), por medio de espectroscopía de fluorescencia y de resonancia paramagnética electrónica (EPR).
- Analizar los cambios morfológicos inducidos por los MVs en eritrocitos humanos a través de microscopía electrónica de barrido (SEM).
- Evaluar el efecto protector de los MVs en eritrocitos humanos ante los daños inducidos por ácido hipocloroso (HClO) mediante observaciones de SEM y ensayos de hemólisis.

CAPÍTULO 1

ASPECTOS GENERALES

1.1. METABOLITOS DE ORIGEN VEGETAL

Las plantas producen una amplia variedad de fitoquímicos necesarios para sus funciones metabólicas o para protegerse de patógenos invasores. Estos metabolitos son particularmente abundantes en los frutos y hojas de las plantas ¹⁸. Algunos estudios epidemiológicos han demostrado una clara asociación entre el consumo regular de productos alimenticios derivados de plantas y la incidencia de patologías crónicas, incluyendo enfermedades cardíacas, neurológicas y cáncer ¹⁹. Las razones biológicas de este efecto potencialmente protector, se basan en que muchos de los fitoquímicos actúan como antioxidantes, anticancerígenos o inmunomoduladores ². Entre las principales familias de metabolitos vegetales (MVs) señalados de estas propiedades terapéuticas se encuentran los carotenoides y los polifenoles.

Los carotenoides son un grupo de pigmentos naturales sintetizados exclusivamente por plantas y microorganismos. Los seres humanos no son capaces de sintetizar carotenoides y, por lo tanto, la presencia de este grupo de pigmentos en el organismo depende totalmente de su inclusión en la dieta ²⁰. Se conocen al menos 60 carotenoides presentes en frutas y verduras consumidas por humanos. Estos metabolitos se pueden separar en dos grandes grupos: los carotenoides hidrocarbonados, como el licopeno y el β -caroteno, y los carotenoides oxigenados o xantofilas, como la zeaxantina y la luteína ²¹. Estructuralmente, los carotenoides consisten de ocho unidades isoprenoides unidas cabeza-cola, excepto en el centro, donde un enlace cola-cola invierte el orden, produciendo una molécula simétrica ²². En las plantas, los carotenoides se pueden encontrar en forma libre o esterificados; esta última forma altera significativamente las propiedades químicas y biológicas de los pigmentos ²¹. Los carotenoides son relativamente poco reactivos; sin embargo, pueden descomponerse y formar compuestos no radicales ²³. La inclusión de carotenoides en la

dieta es importante no solo por su actividad como provitaminas, sino también por un espectro de otras acciones en los sistemas biológicos ²⁴. Se cree que los carotenoides tienen efectos protectores contra enfermedades crónicas y degenerativas, como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y las cataratas ²⁵.

Por otro lado, los polifenoles son un amplio grupo de metabolitos producidos en las plantas, conformados por uno o más anillos aromáticos que soportan uno o más grupos hidroxilos. Hasta ahora han sido identificados más de 8,000 compuestos fenólicos naturales. Los polifenoles se clasifican según la naturaleza de su estructura carbonada en flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos y lignanos. Las fuentes más comunes de polifenoles para los seres humanos son el té verde, el vino tinto, las frutas y los vegetales ^{26,27}. Estos compuestos han sido ampliamente estudiados por sus propiedades antioxidantes, las que dependen principalmente de la presencia, ubicación y número de grupos OH en los anillos aromáticos ²⁸. Además, se ha demostrado que algunos polifenoles pueden reducir la incidencia de patologías relacionadas con el estrés oxidativo como el cáncer, la aterosclerosis, el envejecimiento, y enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y el Alzheimer ^{15,29}.

Los MVs con actividad biológica muestran diferentes blancos a nivel celular, incluyendo la membrana plasmática, los compartimientos intracelulares y el ADN. La puerta por la que cualquier molécula entrará a la célula es la membrana celular; así, las interacciones de esta molécula con la membrana tendrán una gran influencia en su mecanismo de acción ^{30,31}. Estudios recientes sugirieron que carotenoides y polifenoles pueden interactuar con las membranas, y que esas interacciones podrían estar relacionadas con sus efectos benéficos ^{15,25}. Por lo tanto, la capacidad de estos metabolitos para modular las propiedades biofísicas de las membranas es un factor clave para comprender la naturaleza y magnitud de su actividad biológica ⁹.

1.2. LA MEMBRANA CELULAR

La membrana de las células es la estructura que define a la célula como una unidad viviente y la separa de su entorno ³². Esta barrera desempeña un papel vital no

solo en las interacciones entre células y su ambiente exterior sino también en procesos fisiológicos como la comunicación de señales, estimulación, transporte, conversión de energía, homeostasis e inmunidad. Estas funciones altamente complejas se logran gracias a patrones bien ordenados y cambios dinámicos en proteínas, lípidos, azúcares, y otras macromoléculas ³³. Aunque las membranas biológicas presentan diversas funciones y composiciones, en general contienen aproximadamente 50 % de lípidos, 40 % de proteínas, 2 a 10 % de azúcares, y pequeñas cantidades de sales inorgánicas e iones metálicos ³⁴. Básicamente, las membranas consisten en una bicapa de fosfolípidos en la que las proteínas están integradas; en esta arquitectura las proteínas realizan las principales funciones de la membrana, mientras que la bicapa lipídica sirve de matriz ³².

1.2.1. Estructura de la membrana celular

La estructura de la membrana celular actual se basa en el modelo del mosaico fluido propuesto en 1972 por J. Singer y G. L. Nicolson (Fig. 1) ³⁵. Ellos definen una membrana como "una solución viscosa bidimensional de proteínas anfipáticas (o lipoproteínas) y lípidos, en equilibrio termodinámico instantáneo". Las proteínas de membrana se distribuyen asimétricamente en una doble capa formada por lípidos que sirven de soporte a las proteínas. En este modelo los componentes de la membrana se distribuyeron en una "estructura de mosaico" en la que tanto las proteínas como los lípidos se dispersan de forma no homogénea ³⁶.

La principal característica del modelo del mosaico fluido es que lípidos y proteínas en la membrana están en constante movimiento, difundándose a lo largo del plano de la membrana, o girando en torno a un eje perpendicular a este. Sin embargo, aspectos con importantes implicaciones fisiológicas como la presencia de intermediarios lipídicos no lamelares, mayor densidad de proteínas en la bicapa, existencia de movimiento lipídico entre monocapas, curvatura de la membrana y su relación con la geometría lipídica, debieron ser considerados para obtener una versión mas realista y contemporánea del modelo (Fig. 2) ³⁷.

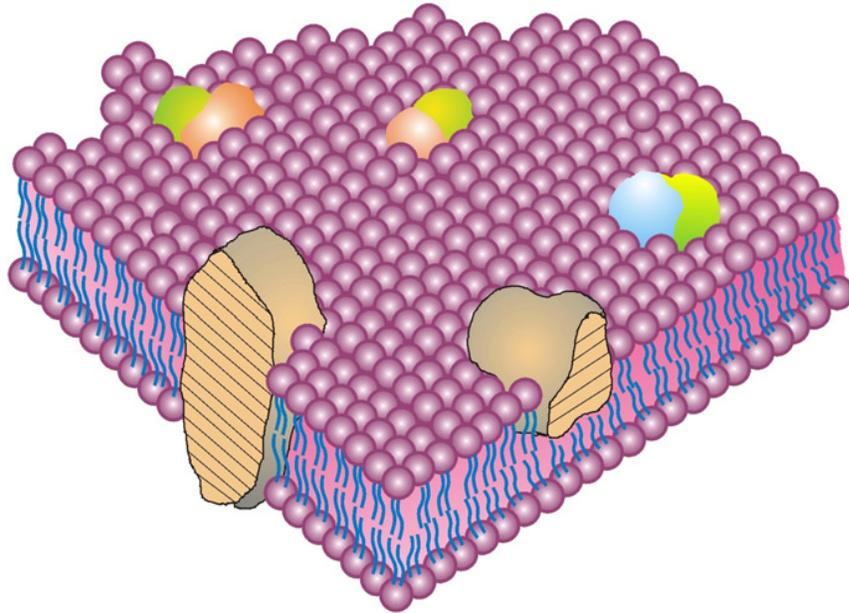


Fig. 1. Representación de la membrana celular tal como fue propuesta por Singer y Nicolson en su modelo del mosaico fluido ³⁸.

Otro aspecto que ha recibido considerable atención en los últimos años es el fenómeno de la formación de dominios en la membrana. Los dominios son regiones de la membrana donde ciertos componentes (lípidos y proteínas) están agrupados. Un ejemplo, son los dominios enriquecidos en colesterol y esfingomielina, que se han denominado "rafts" o balsas. Estos dominios presentan tamaño, tiempo de vida y composición lipídica variable, y su naturaleza es actualmente objeto de mucho estudio

³⁹.

Aunque la concepción moderna de las membranas biológicas dista en complejidad del modelo propuesto por Singer y Nicolson; la bicapa lipídica sigue siendo la arquitectura fundamental de las membranas. Las membranas biológicas están construidas de lípidos que forman una bicapa lipídica, incluidas todas las membranas celulares y todas las membranas virales ¹².

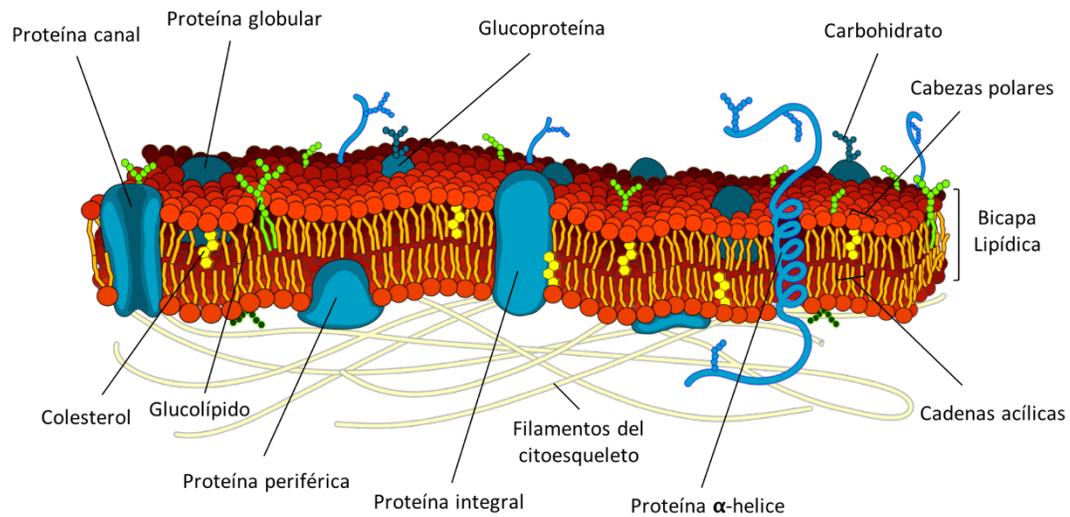


Fig. 2. Modelo estructural de membrana celular. Este modelo de la membrana plasmática de una célula eucariota es una actualización del modelo propuesto por Singer y Nicolson en 1972. Fuente: elaboración propia.



1.2.2. La bicapa lipídica

Los lípidos son moléculas anfipáticas esencialmente insolubles en agua, de modo que al superar una cierta concentración crítica, sus moléculas se asocian en estructuras que exponen sus grupos polares al medio acuoso y permiten la interacción de sus grupos no polares entre sí. El tipo de estructura que adopten las moléculas de lípidos en soluciones acuosas dependerá de la conformación geométrica de la molécula y de la temperatura del sistema. En las membranas biológicas, los lípidos se organizan en una arquitectura de bicapa; en este caso, fosfolípidos de diferente geometría y estructura se complementan para darle al sistema su estabilidad y funcionalidad ⁴⁰. Dentro de una bicapa, las moléculas de fosfolípido están dispuestas de tal manera que los grupos hidrofílicos o cabezas polares forman dos interfaces lípido-agua que delimitan la membrana, mientras que la parte hidrófoba, conformada por las cadenas de hidrocarburo, quedan confinadas dentro de la bicapa y no tienen contacto con el agua ¹².

La naturaleza y organización espacial de los lípidos define las propiedades biofísicas de la membrana y cumple un papel activo en la función celular. Así, la

longitud y el grado de saturación de las cadenas acílicas de los fosfolípidos determinan el grosor y el orden de la región hidrófoba de la membrana, mientras que la carga electrostática de sus cabezas polares define en gran medida las interacciones con los medios externos de la bicapa ⁴¹. Por otra parte, la distribución de los lípidos entre las dos monocapas de una membrana es asimétrica, es decir, algunas clases de lípidos se ubican preferencialmente en uno u otro lado de la bicapa (ver Tabla 1). En células eucariotas las fosfatidiletanolaminas, fosfatidilserinas y fosfoinosítidos se localizan principalmente en la monocapa interna de la membrana, en tanto, que las fosfatidilcolinas, esfingomielinas y glucolípidos se ubican esencialmente en la monocapa externa ³². Esta asimetría en la distribución de los fosfolípidos es esencial para mantener la estructura y función de la membrana celular.

Tabla 1. Composición lipídica de membranas naturales ¹².

Fuente	Composición lipídica (mol%)						
	Col	PC	SM	PE	PI	PS	PG
Eritrocitos humanos	45	17	17	16	-	6	-
Célula fotoreceptora bovina	10	36	-	40	2	12	-
<i>Escherichia coli</i>	0	-	-	80	-	-	15
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0	-	30	-	-	12
Retículo endoplasmático rugoso ^a	6	55	3	16	8	3	-
Mitocondria (monocapa externa) ^a	3	45	3	25	6	1	2
Mitocondria (monocapa interna) ^a	5	50	5	23	13	2	2.5

Col, colesterol; PC, fosfatidilcolina; SM, esfingomielina; PE, fosfatidiletanolamina; PI, fosfatidilinositol; PS, fosfatidilserina; PG, fosfatidilglicerol.

^a Hígado de rata.

1.2.3. Fosfolípidos

Miles de especies de lípidos son encontrados en las membranas biológicas y muchas de sus funciones aún no se han entendido completamente ¹². En las membranas celulares de los mamíferos se encuentran principalmente glicerofosfolípidos, esfingolípidos y colesterol ⁴². Sin embargo, los lípidos de mayor presencia en las

membranas plasmáticas son los fosfolípidos. Estos son un tipo de glicerofosfolípidos que derivan su nombre del grupo fosfato que se encuentra en su cabeza polar ¹².

Los fosfolípidos están compuestos por una fracción de glicerol con dos ácidos grasos esterificados en las posiciones sn-1 y sn-2 del alcohol formando un diacilglicerol, precursor del fosfolípido. Las especies más comunes de estos lípidos tienen una cadena de acilo saturada en la posición sn-1 y una cadena insaturada en la posición sn-2, aunque existen excepciones. La posición sn-3 del glicerol puede fosforilarse y formar ácido fosfatídico, estructuralmente el más simple entre los glicerofosfolípidos ⁴². El grupo fosfato del ácido fosfatídico también puede ser esterificado por un alcohol; el nombre del alcohol proporciona una distinción adicional a la nomenclatura del fosfolípido. Si el alcohol es colina, el fosfolípido será fosfatidilcolina (PC) o lecitina (Fig. 3). Las fosfatidilcolinas contienen una amina cuaternaria en su grupo de cabeza, la que introduce una carga positiva principalmente sobre el nitrógeno; esta carga junto con la negativa que reside en el grupo fosfato le da a este lípido carácter zwitteriónico. Las fosfatidilcolinas son una de las clases de fosfolípidos más comunes en la membrana celular. Por otro lado, si el alcohol esterificado es etanolamina, el fosfolípido resultante constituye una fosfatidiletanolamina (PE) o cefalina. Las fosfatidiletanolaminas poseen un grupo amino libre en su cabeza polar que en el rango fisiológico presenta carga positiva ¹². Estas dos clases de fosfolípidos tienen propiedades muy diferentes y desempeñan funciones específicas en las membranas.

Otras moléculas con la propiedad de esterificarse al ácido fosfatídico son el aminoácido serina, el glicerol y el inositol, los que producen los fosfolípidos, fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (PG) y fosfatidilinositol (PI), respectivamente. Además de estos, otras clases de fosfolípidos con abundante presencia en las membranas celulares son los lisofosfolípidos, los que poseen solo una cadena de hidrocarburo, y los difosfatidilgliceroles o cardiolipinas, que presentan dos grupos fosfato en su estructura ¹².

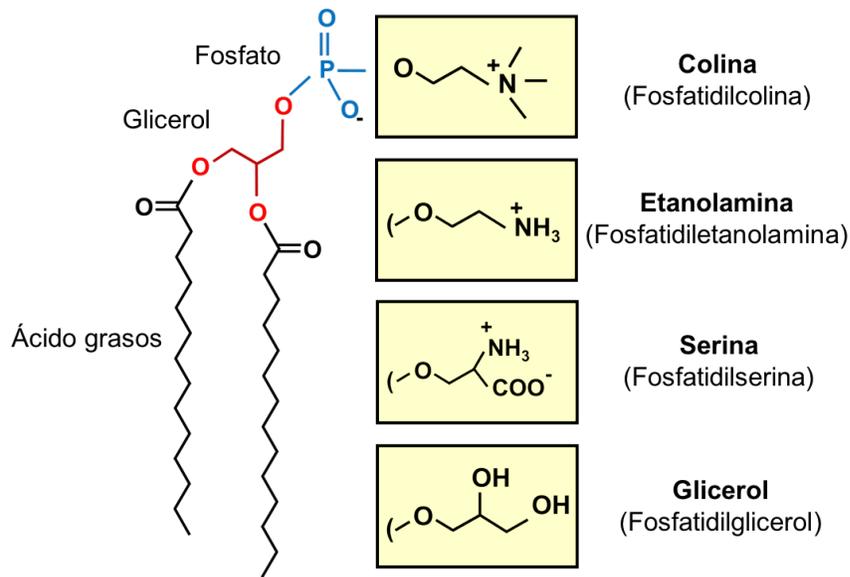


Fig. 3. Estructura de glicerofosfolípidos. La estructura lipídica mostrada corresponde a 1,2 dimiristoil-sn-glicerol-3-fosfocolina o dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC). La sustitución de la colina por los otros grupos de cabeza en las cajas forma las otras estructuras de fosfolípidos ⁴.

Cada clase de fosfolípido presenta una gran variedad de ácidos grasos esterificados al glicerol. La longitud de los ácidos grasos que se encuentran comúnmente en las membranas biológicas varía desde 12 hasta 26 átomos de carbono. Por otro lado, el número de dobles enlaces por ácido graso en los fosfolípidos generalmente varía de cero a seis, aunque se han encontrado especies con un número mayor. La distribución de los ácidos grasos en los fosfolípidos es un detalle particular de cada clase de fosfolípido, membrana, monocapa, tipo de célula, órgano, organismo y estado nutricional del individuo ¹².

1.2.4. Propiedades físicas de la bicapa lipídica

Los lípidos de las membranas biológicas son moléculas anfipáticas, con una parte hidrófoba (las cadenas de hidrocarburo) y una porción hidrófila (el grupo de cabeza polar). Esta particularidad química determina las reglas para el ensamblaje de las moléculas de fosfolípido en medio acuoso ¹². La naturaleza de los lípidos afecta por lo tanto, las propiedades físicas de la membrana, incluyendo su curvatura, fluidez y la

capacidad para formar dominios, propiedades que modularán el comportamiento general de la célula ⁴².

1.2.4.1. Fluidéz de la bicapa lipídica

A temperaturas fisiológicas, la bicapa lipídica se comporta como una estructura fluida. La fluidez es mayor a medida que aumenta la proporción de ácidos grasos insaturados. Las cadenas de ácidos grasos saturados adoptan preferiblemente conformaciones extendidas, formando agrupaciones compactas que confieren rigidez a la membrana. Por otro lado, a medida que aumenta la temperatura, un mayor número de enlaces C-C en las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos pierden su conformación todo *trans* o completamente extendida, y adoptan la conformación *gauche*. Ésta última conformación, altera el empaquetamiento de las cadenas e incrementa la fluidez de la membrana ⁴⁴.

La fluidez de la bicapa lipídica permite que sus componentes se desplacen lateralmente con cierta libertad y giren sobre su eje perpendicular a la membrana. Además de la capacidad de moverse dentro del plano de la membrana, los fosfolípidos también pueden pasar de una capa de la membrana a otra, en lo que se denomina movimiento de “flip-flop”. Este cambio de componentes entre las monocapas lipídicas de una membrana es más restringido que el desplazamiento dentro de cada monocapa ⁴⁴. Dada la gran heterogeneidad de las membranas biológicas, determinar su fluidez es mucho más complicado que en otras sustancias o materiales homogéneos. En general, la fluidez en las membranas se monitoriza con sondas paramagnéticas o fluorescentes, con las que se pueden determinar una variedad de parámetros relacionados con la dinámica y el orden de la membrana ³⁶.

1.2.4.2 Comportamiento termotrópico de la bicapa lipídica

En las membranas biológicas, la bicapa lipídica se encuentra fundamentalmente en fase lamelar. Sin embargo, ésta es un sistema altamente dinámico y puede presentar distintas estructuras, dependiendo del contenido de agua y la temperatura ³⁶. En exceso de agua, como ocurre en el ambiente celular, la bicapa lipídica puede sufrir múltiples transiciones de fase como función de la temperatura ⁴⁵. La temperatura a la que ocurre

la transición de fase principal (T_m), es aquella en la que el calor absorbido durante el proceso de fusión alcanza un máximo. El área bajo este máximo representa la entalpía (ΔH) asociada al proceso de fusión (Fig. 4) ⁴⁶.

Bajo la temperatura de transición principal, el lípido se encuentra en fase gel ($L\beta$). En esta fase, la velocidad de difusión lateral de los lípidos es relativamente baja, con poca libertad interna de movimiento. En el estado gel, los fosfolípidos adoptan conformaciones semejantes a varillas rígidas, con sus cadenas acílicas completamente extendidas y sus enlaces carbono-carbono en conformación todo *trans*. Sobre la T_m , la bicapa lipídica se encuentra en estado líquido cristalino ($L\alpha$). En este estado la bicapa se desordena debido a la difusión lateral de los fosfolípidos en el plano bidimensional. Sin embargo, el fosfolípido aún no es un líquido real, es decir, no tiene movimiento isotrópico ya que la estructura de bicapa impone ciertas restricciones al movimiento de sus componentes. En la fase $L\alpha$, las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos presentan deformaciones o dobleces debido a que algunos de sus enlaces C-C se encuentran en conformación *gauche* ¹².

Algunos fosfolípidos como las fosfatidilcolinas (Fig. 4) experimentan una transición previa a la transición de fase principal llamada pre-transición (T_p). La T_p surge como resultado de la conversión de la fase gel, denotada en este caso como $L\beta'$ (la tilde indica que las cadenas acílicas del fosfolípido presentan una ligera inclinación en torno al plano de la bicapa) a una fase ondulada ($P\beta'$), caracterizada por la coexistencia de dominios de fase gel y fase fluida. En la fase $P\beta'$ la estructura de membrana plana se pierde y la bicapa adopta una configuración periódicamente ondulada ³⁶. Por otra parte, las fosfatidiletanolaminas tienen la capacidad de formar una fase hexagonal (H_{II}) cuando son calentadas entre 10-20 °C sobre su temperatura de transición principal. Esta fase es producto del incremento en la movilidad, y el consecuente aumento del volumen de las cadenas acílicas. En consecuencia, las moléculas de esta clase de fosfolípido abandonan la estructura lamelar y adoptan un arreglo tubular hexagonal con sus grupos polares confinados en el interior de la estructura. Esta configuración podría tener un rol funcional en la curvatura de la bicapa

ya que las fosfatidiletanolaminas se localizan principalmente en la monocapa interna de las membranas biológicas ⁴⁰.

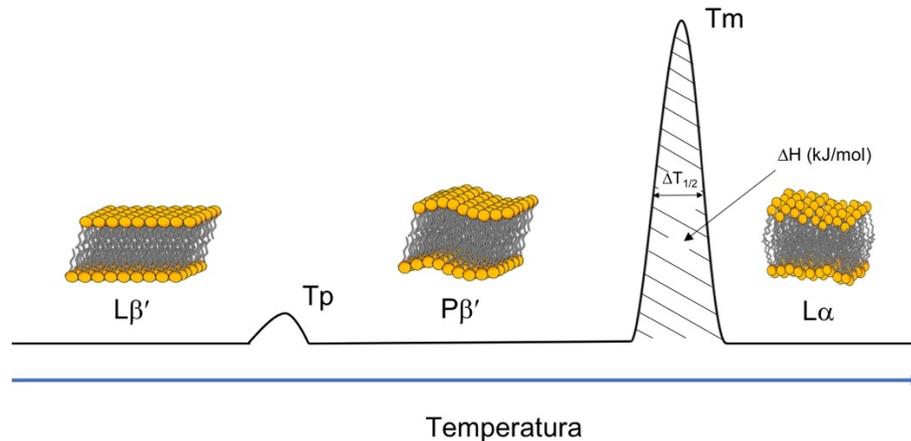


Fig. 4. Comportamiento termotrópico y diferentes estructuras adoptadas por las fosfatidilcolinas en medio acuoso. Las fases son denotadas como: gel inclinada ($L\beta'$), gel ondulada ($P\beta'$) y líquido cristalino ($L\alpha$). T_m y T_p representan la transición principal y pre-transición, respectivamente. Fuente: elaboración propia.

1.3. EFECTO DE ESPECIES OXIDANTES EN LA MEMBRANA CELULAR

El daño oxidativo a los componentes celulares puede desempeñar un importante papel fisiopatológico en muchos tipos de enfermedades humanas. La membrana plasmática es un sistema dinámico que controla estrechamente la estructura y función celular. Sin embargo, la membrana es muy susceptible a alteraciones como consecuencia de las interacciones con factores externos ¹⁵. Las especies oxidantes reaccionan principalmente con los lípidos no saturados de la bicapa, ocasionando peroxidación lipídica. Los peróxidos producen cambios conformacionales y disminuyen la hidrofobicidad de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos en la membrana celular, lo que eventualmente altera su estructura ⁴⁴. El proceso oxidativo produce diversos hidroperóxidos lipídicos y productos secundarios, que en última instancia resultan en la disrupción de la bicapa lipídica. En consecuencia, como resultado de esta oxidación se producen diversos eventos patológicos ⁴⁷.

Los eritrocitos humanos, son especialmente susceptibles al daño oxidativo debido a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados en sus membranas y a las altas concentraciones de oxígeno y hemoglobina intracelular. La peroxidación escinde las cadenas de ácidos grasos insaturados con tres o más dobles enlaces produciendo moléculas altamente reactivas y alteraciones en la membrana, eventos que finalmente conducen a la hemólisis o ruptura de la membrana eritrocitaria ⁴⁸.

1.3.1. Ácido hipocloroso

Las células fagocíticas como los neutrófilos y monocitos son células especialmente diseñadas para ingerir y destruir patógenos invasores. Estas células se encuentran predominantemente en los estados iniciales de procesos inflamatorios agudos, y son consideradas la mayor fuente de oxidación en mamíferos ⁴⁹. La actividad de neutrófilos y monocitos genera mieloperoxidasa, una hemoproteína que cataliza la reacción entre H_2O_2 y Cl^- produciendo ácido hipocloroso (HClO). HClO es un potente oxidante, altamente reactivo que funciona como un poderoso agente antimicrobiano. La producción de HClO por neutrófilos y monocitos es una parte integral de la capacidad del sistema inmune para combatir una amplia gama de patógenos. Sin embargo, las propiedades de HClO que lo convierten en un eficaz agente antimicrobiano también pueden afectar los tejidos del huésped mediante los mismos mecanismos utilizados para destruir los patógenos invasores ¹⁷.

El ácido hipocloroso puede causar daño a las moléculas por oxidación directa ($E^\circ = 1.08$ V a pH 7) y por descomposición formando clorinas y otros cloro derivados ^{50,51}. HClO reacciona con una amplia gama de biomoléculas incluyendo lípidos, proteínas y nucleótidos. En los lípidos, los principales sitios de ataque de HClO son los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados y el colesterol, produciendo clorhidrinas y peroxidación. Estos eventos son potencialmente desestabilizadores para la membrana celular y pueden causar cambios en su permeabilidad ⁵². Debido a la alta reactividad con las moléculas biológicas, HClO es considerado el mayor causante de daño tisular durante la inflamación ⁵³. En condiciones patológicas HClO puede ser encontrado en los fluidos corporales en concentraciones de hasta $200 \mu M$ ⁵⁴; aunque en pacientes con enfermedades respiratorias agudas se han detectado concentraciones de HClO incluso

en milimoles ⁵⁵. La sobreproducción de HClO ha sido relacionada con una serie de condiciones patológicas, las que incluyen enfermedades inflamatorias, aterosclerosis, afecciones respiratorias, vasculitis aguda, artritis reumatoide y cáncer ⁵⁶⁻⁵⁸.



CAPÍTULO 2

MODELOS DE MEMBRANA Y TÉCNICAS UTILIZADOS PARA ESTUDIAR LAS INTERACCIONES DE METABOLITOS VEGETALES CON LA MEMBRANA CELULAR

2.1. MODELOS DE MEMBRANA CELULAR

Los modelos de membrana celular han sido desarrollados para comprender mejor las propiedades y comportamiento de las membranas biológicas. Hoy en día se utilizan ampliamente para estudiar las interacciones proteína-lípido y lípido-lípido, así como analizar la interacción de moléculas exógenas o nanopartículas con membranas ⁹⁹. El estudio del comportamiento biofísico y bioquímico de la membrana plasmática de una célula viva es extremadamente complejo. Los modelos de membrana tienen la ventaja de ser lo suficientemente simples para simular mecanismos específicos de la membrana, y aun ser representativos de la membrana o célula en general ⁶⁰. Entre los modelos de membrana celular, se encuentran los modelos compuestos únicamente de lípidos, y las biomembranas que involucran una mayor parte de los componentes de una membrana real. Estos modelos constituyen herramientas poderosas para estudiar los mecanismos moleculares de procesos fundamentales que ocurren a nivel celular ⁹⁹.

2.1.1. Multibicapas lipídicas

Las multibicapas lipídicas son estructuras bidimensionales formadas por una serie de bicapas apiladas unas sobre las otras. En agua o soluciones amortiguadoras, los lípidos forman espontáneamente estructuras de bicapas con espesores del orden de 4-5 nm. En este caso, la atracción de van der Waals hace que las membranas formen apilamientos regulares de muchas capas superpuestas, con espaciados periódicamente repetidos entre estas que van de las decenas a cientos de nanómetros. Las dimensiones de estos espacios dependen del tipo de lípido y de la composición de la solución en la

que se forman las membranas ⁶¹. En multibicapas compuestas de fosfolípidos, la estructura es estabilizada por interacciones hidrofóbicas entre las cadenas hidrocarbonadas e interacciones electrostáticas entre los grupos cargados de las cabezas polares. Los modelos de multibicapas lipídicas son especialmente útiles para estudiar las propiedades estructurales de las membranas por medio de difracción de rayos X ⁶².

2.1.2. Liposomas

Los liposomas son vesículas lipídicas esféricas con un compartimiento acuoso en el centro, y representan los modelos artificiales más comunes de membrana celular ⁶³. Los liposomas proporcionan una estructura muy versátil para analizar la fluidez, el comportamiento termotrópico y las interacciones de fármacos u otras moléculas con la membrana ⁵⁹. Estructuralmente, los liposomas constan de una o varias bicapas lipídicas dispuestas de manera similar a las de las membranas biológicas y pueden tener diámetros de hasta 1000 nm. Los liposomas son fáciles de producir en grandes cantidades con propiedades reproducibles y son adecuados para una amplia variedad de estudios biofísicos ¹².

Diferentes tipos de liposomas pueden ser confeccionados dependiendo del método utilizado en su preparación. Cuando una película lipídica seca se hidrata vigorosamente a temperaturas superiores a la transición de fase del lípido se forman vesículas multilamelares (MLV, por sus siglas en inglés). Este tipo de vesícula presenta tamaños en el rango de 0.5 a 10 μm y se caracteriza por varias bicapas lipídicas concéntricas separadas por moléculas de agua (Fig. 5). La extrusión de MLV a través de una membrana porosa da lugar a la formación de vesículas unilamelares grandes (LUV), mientras que vesículas unilamelares pequeñas (SUV) son obtenidas por sonicación de las MLV. LUV y SUV se caracterizan por poseer una sola bicapa lipídica. Las SUV generalmente exhiben un diámetro medio inferior a 50 nm, mientras que el de las LUV varía de 100 a 500 nm. Por otro lado, las vesículas unilamelares gigantes (GUV) son liposomas que tienen un rango de tamaño de 5-100 μm y pueden obtenerse hidratando una película lipídica seca a temperaturas superiores a la transición de fase del lípido durante un largo período ⁶⁴.

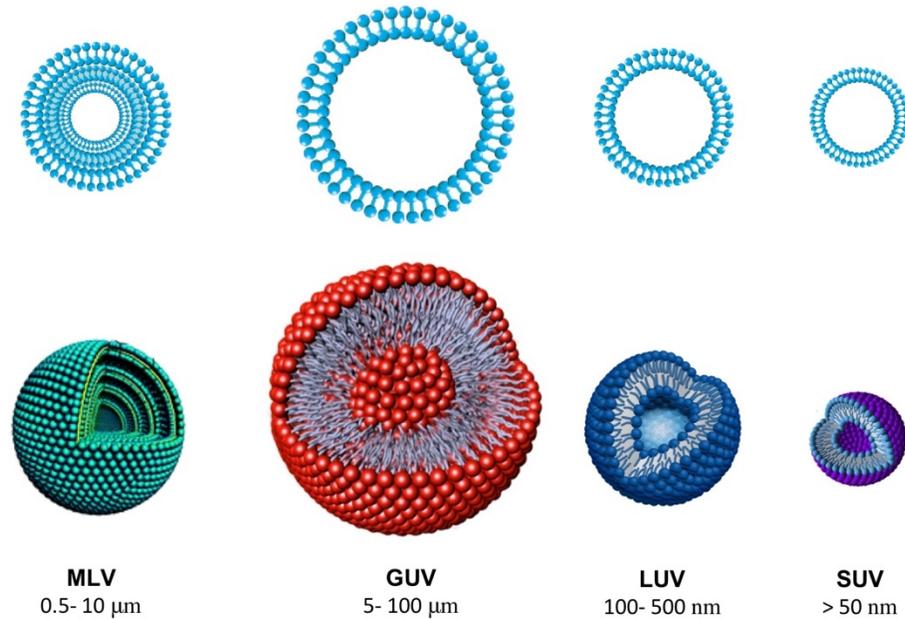


Fig. 5. Representación esquemática de diferentes tipos de liposomas utilizados en los estudios de membrana. Parte superior e inferior de la figura muestra detalles en 2D y 3D, respectivamente de vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares gigantes (GUV), vesículas unilamelares grandes (LUV) y vesículas unilamelares pequeñas (SUV). Fuente: elaboración propia.

2.1.3. Eritrocitos humanos

Los eritrocitos o glóbulos rojos son las principales células del sistema circulatorio humano y actúan como transportadores de oxígeno. En los mamíferos, los eritrocitos están desprovistos de núcleo y otros orgánulos. Sin embargo, su membrana plasmática presenta una composición y estructura compleja, que está altamente correlacionada con sus funciones biológicas ⁶⁵. En condiciones fisiológicas los eritrocitos humanos asumen naturalmente la forma de un disco bicóncavo aplanado, llamada discocito. En estas condiciones la célula presenta aproximadamente un diámetro de 8 μm , un grosor de 1.7 μm , 90–110 μm^3 de volumen y un área superficial de 130–140 μm^2 ⁶⁶.

Además de la morfología normal de discocito, los glóbulos rojos pueden adoptar una amplia variedad de formas distintas, causadas principalmente por condiciones patológicas o la interacción con agentes externos (Fig. 6) ⁶⁶. Entre estas

formas, los equinocitos, caracterizados por una o más proyecciones exteriores o espículas y los estomatocitos, definidos por una prominente invaginación en el centro, son las más representativas ⁶⁷. Las alteraciones morfológicas en los glóbulos rojos pueden ocurrir de manera reversible o irreversible, condición que dependerá de la magnitud del cambio que sufra la membrana ⁶⁶.

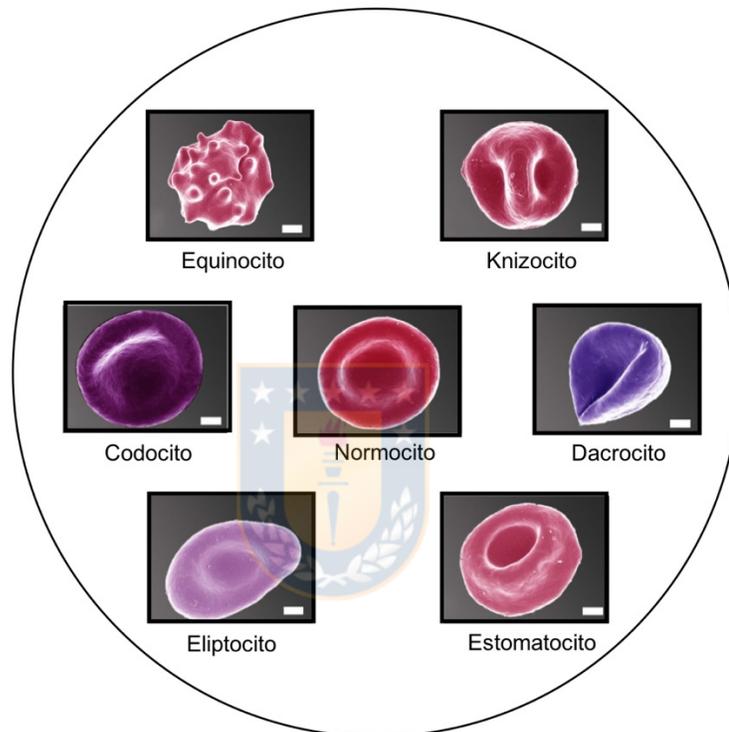


Fig. 6. Diferentes morfologías observadas en eritrocitos humanos después de la incubación con moléculas que interactúan con la membrana ⁶⁸.

La membrana de los eritrocitos humanos es una bicapa compuesta predominantemente por lípidos anfipáticos en fase fluida, con un grosor de aproximadamente 4 nm ⁶⁶. La composición de los lípidos en la membrana eritrocitaria es muy diversa, las especies predominantes son colesterol (Col, 23 %), fosfatidiletanolamina (PE, 18 %), esfingomiélin (SM, 18 %), fosfatidilcolina (PC, 17 %), fosfatidilserina (PS, 7 %), glucolípidos (3 %) y otros (13 %). Este material se distribuye de manera asimétrica entre las dos mitades de la bicapa (Fig. 7). La mayoría

de las PC, SM y glucolípidos se encuentran en la monocapa externa mientras que las PE y PS se encuentran mayoritariamente en la monocapa interna ⁶⁵. En condiciones normales, el colesterol se distribuye con una ligera preferencia por la monocapa externa

⁶⁸.

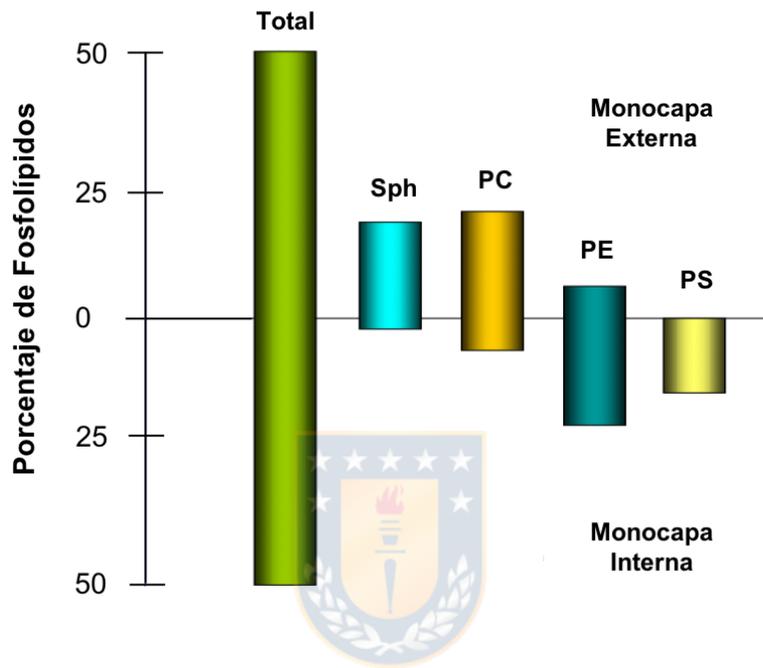


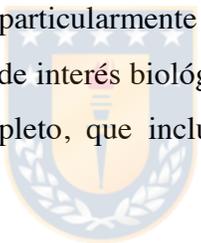
Fig. 7. Distribución de las principales clases de fosfolípidos entre las dos monocapas de la membrana del eritrocito humano. Sph, esfingomielinas; PC, fosfatidilcolina; PE, etanolaminas, y PS, fosfatidilserinas. Fuente: elaboración propia.

La fácil accesibilidad y manipulación, abundancia de ácidos grasos poliinsaturados y proteínas de membrana, así como la gran cantidad de información disponible, convierten a la membrana del eritrocito en un excelente modelo para estudiar las interacciones de compuestos químicos con biomembranas ^{53,69}. La membrana de los eritrocitos, aunque menos especializada que muchas otras membranas celulares, tiene suficientes funciones en común, como el transporte activo y pasivo y la producción de gradientes iónicos y eléctricos, para ser considerada representativa de la membrana plasmática en general ¹⁵. Los estudios biofísicos en eritrocitos se enfocan principalmente en determinar alteraciones morfológicas, liberación de hemoglobina y

contenido de trifosfato de adenosina (ATP) extracelular, factores que son indicadores de la integridad de la membrana de los eritrocitos ⁷⁰.

2.1.4. Membranas aisladas de eritrocitos humanos sin sellar (IUM)

Los eritrocitos humanos son usados ampliamente tanto como modelo para el estudio de membranas celulares, como para evaluar los efectos de compuestos biológicos y farmacéuticos en células humanas ⁷¹. Sin embargo, para estudios más detallados del comportamiento biofísico de la membrana eritrocitaria es necesario aislar la membrana del contenido intracelular. Las membranas aisladas de eritrocitos humanos sin sellar (IUM) o membranas fantasmas, es el termino usado para describir los delicados cuerpos discoides obtenidos después de la eliminación de la hemoglobina de los eritrocitos. El método más común para la preparación de las IUM consiste en la eliminación de la hemoglobina por hemólisis, colocando las células en una solución hipotónica ⁷². Las IUM son particularmente adecuadas para el estudio de las interacciones entre compuestos de interés biológico y membranas, ya que representan un sistema de membrana completo, que incluye proteínas, colesterol y una gran variedad de lípidos ⁶⁰.



2.2. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA ESTUDIAR LAS INTERACCIONES DE METABOLITOS VEGETALES CON LA MEMBRANA CELULAR

Las técnicas biofísicas disponibles actualmente permiten analizar en profundidad las interacciones de moléculas bioactivas con las membranas biológicas. Cada técnica proporciona información sobre un aspecto particular de las interacciones; por lo tanto, es necesario combinar los resultados obtenidos de cada técnica para comprender los mecanismos exactos involucrados con la actividad de los metabolitos vegetales (MVs) en la membrana plasmática ⁹.

2.2.1. Difracción de rayos X

Los estudios de difracción de rayos X en modelos de membranas biológicas se basan en el empaquetamiento parcialmente ordenado de las moléculas de lípido que conforman la bicapa. Este arreglo representa la base estructural de las unidades de

repetición del sistema ⁷³. Bajo condiciones de hidratación, las bicapas se “apilan” unas sobre las otras formando multibicapas; en este caso la estructura de bicapa básica se convierte en una función periódica unidimensional que produce una dispersión coherente (constructiva) de los rayos X incidentes ⁷⁴. Esta dispersión resultante producida por los átomos que componen la membrana consiste de un patrón discreto de reflexiones, llamado reflexiones de Bragg.

En un experimento de difracción, un haz colimado de rayos X con una longitud de onda comparable a las distancias atómicas irradia una muestra y se dispersa en todas las direcciones desde los electrones que conforman la muestra. Cuando el rayo incide sobre un conjunto de puntos periódicos en la red, los máximos de difracción se producen en ciertas direcciones donde los rayos X dispersados están en fase ⁷³. De acuerdo con la ley de Bragg, el tamaño de la estructura está inversamente relacionado con el ángulo de dispersión de la radiación incidente ⁷⁵. Por lo tanto, reflexiones provenientes de puntos separados por dimensiones del orden de las bicapas lipídicas, aparecerán en la región de ángulo bajo (SA, $\theta < 5^\circ$) del patrón de difracción. El análisis de estas reflexiones ofrece información acerca del espaciado entre las bicapas, es decir, la distancia repetitiva de la red ⁷³.

Por otro lado, en la región de ángulo amplio (WA, $\theta > 5^\circ$), se explora el orden de corto alcance del sistema, es decir, el empaquetamiento de las cadenas acílicas de los lípidos. La simetría de este empaquetamiento es esencialmente independiente del contenido de agua en la bicapa (i.e, de la distancia de repetición lamelar), y solo depende de la fase específica que adopte el lípido ⁷⁶. En la fase gel lamelar ($L\beta$), las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos están completamente extendidas y adoptan un empaquetamiento hexagonal, dando lugar a un pico relativamente agudo y simétrico alrededor de 4.2 Å; mientras, que la fase lamelar fluida o líquido cristalino ($L\alpha$) muestra un pico amplio centrado en 4.6 Å, debido al empaquetamiento desordenado de las cadenas acílicas ⁷³. La difracción de ángulo bajo y amplio (Fig. 8), conforman el más importante y no destructivo método experimental para la investigación estructural de biomembranas ⁷⁷.

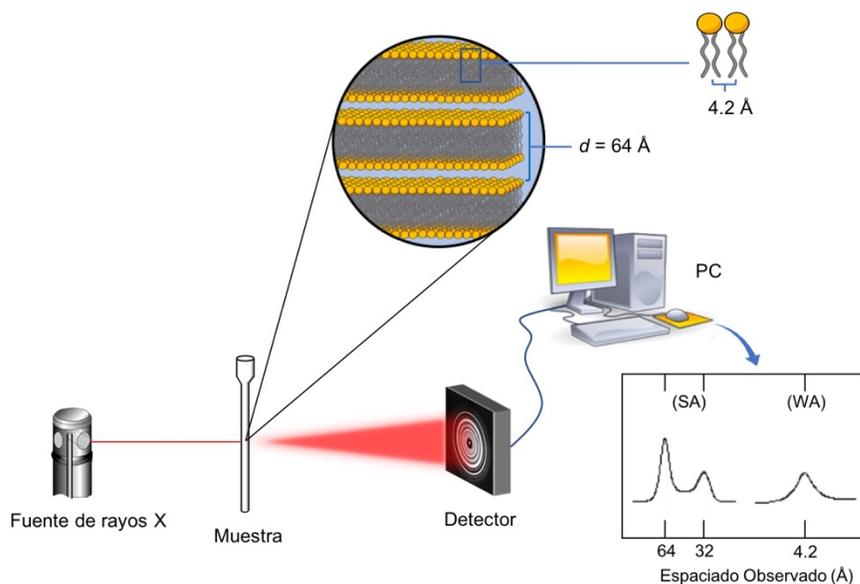


Fig. 8. Diagrama de un experimento de difracción de rayos X en multibcapas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) en fase gel. Fuente: elaboración propia.

2.2.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es el método más directo para monitorear el proceso de fusión en bicapas lipídicas ³⁶. Esta técnica permite la detección y caracterización termodinámica de las transiciones de fase termotrópica de membranas biológicas o sus modelos lipídicos. La DSC implica el calentamiento (o enfriamiento) simultáneo de una muestra y una referencia, esta última constituida por un material inerte, de masa y capacidad calorífica comparable. El monitoreo termodinámico se realiza a una velocidad constante, predeterminada en un calorímetro diseñado para medir la tasa diferencial de flujo de calor de la muestra en relación con la referencia ⁷⁸.

Inicialmente, las temperaturas de la muestra y la referencia cambian linealmente con el tiempo y la diferencia de temperatura entre ellas permanece constante. En estas condiciones, existe una diferencia constante entre las tasas de flujo de calor de la muestra y la referencia, lo que se observa en el termograma como una línea horizontal. Cuando ocurre un evento termotrópico en la muestra se produce una diferencia de temperatura entre la muestra y la referencia. En este caso, el instrumento cambia la

entrada de energía en la celda de la muestra para anular el diferencial de temperatura. Esto produce una diferencia en el flujo de calor entre la muestra y la referencia, y una desviación exotérmica o endotérmica de la línea base (Fig. 9). Una vez finalizado el evento térmico, el instrumento restablece su línea base original o establece una nueva si se produce un cambio en el calor específico de la muestra, generando así una gráfica del flujo de calor diferencial en función de la temperatura ⁷⁸.

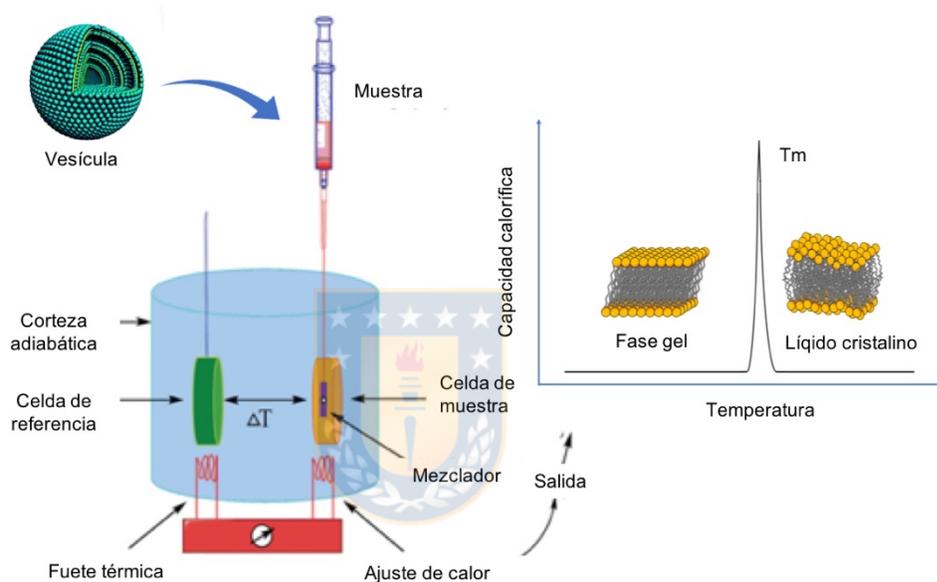


Fig. 9. Diagrama de un experimento de calorimetría diferencial de barrido (DSC) para determinar el comportamiento termotrópico de una muestra de fosfolípido. Fuente: elaboración propia.

2.2.3. Espectroscopía de fluorescencia

La espectroscopía de fluorescencia es la técnica más potente y versátil para los estudios modernos de membranas celulares y sus modelos ³⁶. La fluorescencia es la luz emitida espontáneamente por una molécula (fluoróforo) debido a transiciones electrónicas entre sus estados excitados. Las mediciones de fluorescencia se basan en el principio de excitación foto-selectiva de los fluoróforos por la luz polarizada ⁷⁹, es decir, los fluoróforos absorben fotones cuyos vectores eléctricos están alineados

paralelos a su momento de transición dipolar. Sin embargo, las características de la luz emitida dependen directamente del entorno y la movilidad del fluoróforo ⁸⁰.

Las membranas naturalmente no presentan fluorescencia intrínseca; por lo tanto, se deben usar sondas fluorescentes que se inserten en esta. Las sondas utilizadas en los estudios de membrana son moléculas fluorescentes cuyas emisiones características varían en función de su libertad de movimiento dentro de la bicapa ⁷⁹. Estas moléculas penetran selectivamente en la membrana, proporcionando información sobre las propiedades físicas de un entorno lipídico específico. Con esta técnica es posible determinar las interacciones de compuestos bioactivos con la membrana, ya que el cambio en la intensidad de fluorescencia de la sonda se correlaciona directamente con alteraciones en la integridad de la bicapa ¹³.

En membranas biológicas la mayoría de los estudios de fluorescencia se realizan determinando los parámetros de anisotropía (r) y polarización generalizada (PG), los que están definidos por:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad \text{Ec. 1}$$

$$PG = \frac{I_b - I_r}{I_b + I_r} \quad \text{Ec. 2}$$

donde I_{\parallel} e I_{\perp} (Ec. 1) son las intensidades de emisión de fluorescencia en ángulo vertical (I_{\parallel}) y horizontal (I_{\perp}) cuando la muestra es excitada con luz polarizada verticalmente ⁷⁹, mientras que I_b e I_r (Ec. 2) corresponden a las intensidades de los máximos de emisión del fluoróforo cuando este se reparte en dos entornos diferentes de la membrana ⁸¹.

Las mediciones de anisotropía se realizan comúnmente utilizando la sonda 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) o alguno de sus derivados. DPH es una molécula hidrófoba que se localiza principalmente a nivel de las cadenas acílicas de los fosfolípidos en la bicapa (Fig. 10); por lo tanto, su movimiento de rotación estará influenciado por la dinámica de esta región de la membrana [42]. Si una molécula exógena causa restricciones en el movimiento de las cadenas acílicas, se producirá una

mayor rigidez de la membrana. Este efecto reducirá la anisotropía del entorno debido a una mayor restricción en el movimiento del fluoróforo. Por el contrario, si las interacciones moleculares resultan en una mayor fluidez de la membrana, se observará un aumento de la anisotropía⁸⁰.

La dinámica del entorno hidrofílico de las membranas biológicas es determinada frecuentemente mediante la función de polarización generalizada (PG). La PG es esencialmente una medida normalizada obtenida al medir la emisión de un fluoróforo a dos longitudes de onda diferentes⁸². En las membranas, los cambios de fluidez involucran alteraciones en su contenido de agua, lo que produce cambios en la polaridad de la bicapa lipídica que pueden detectarse mediante sondas fluorescentes sensibles al ambiente polar como el 6-dodecanoil-2-dimetilaminonaftaleno, conocido como laurdan. El fluoróforo de laurdan se ubica preferentemente a nivel de la fracción de glicerol en las moléculas de fosfolípido (Fig. 10), y su espectro de emisión cambia según la polaridad de este entorno de la membrana⁸¹.

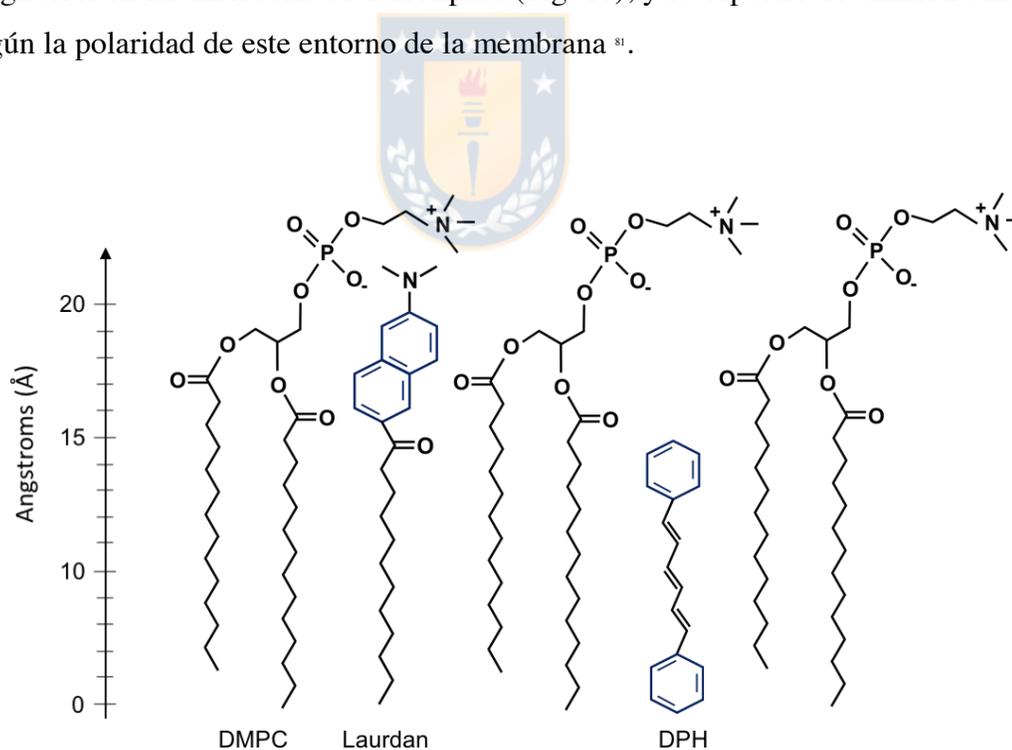


Fig. 10. Localización de las sondas fluorescentes laurdan y DPH entre las moléculas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) en una membrana. Fuente: elaboración propia.

2.2.4. Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica

La espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR) es una técnica que detecta la absorción resonante de microondas de una sustancia con electrones desapareados colocada en un campo magnético estático. EPR representa una herramienta valiosa para caracterizar complejos de metales de transición, sitios activos de metaloproteínas y radicales formados en diversas condiciones ⁸³. Aunque actualmente su campo de aplicación se ha extendido a biosistemas diamagnéticos, como las membranas lipídicas, las proteínas y los ácidos nucleicos, mediante el uso de sondas paramagnéticas ⁸⁴.

Una sonda paramagnética es un radical libre estable con al menos un electrón desapareado en un orbital molecular. Esta sonda se inserta en la muestra y actúa como un grupo informador. La mayoría de las sondas utilizadas en EPR están basadas en el radical nitroxilo (NO[•]), el que tiene un electrón desapareado en el orbital $2p\pi$ del átomo de nitrógeno. El grupo NO[•] en estas moléculas está rodeado por átomos de carbono cuaternarios, los que protegen al radical y le dan estabilidad a la sonda ⁸⁴.

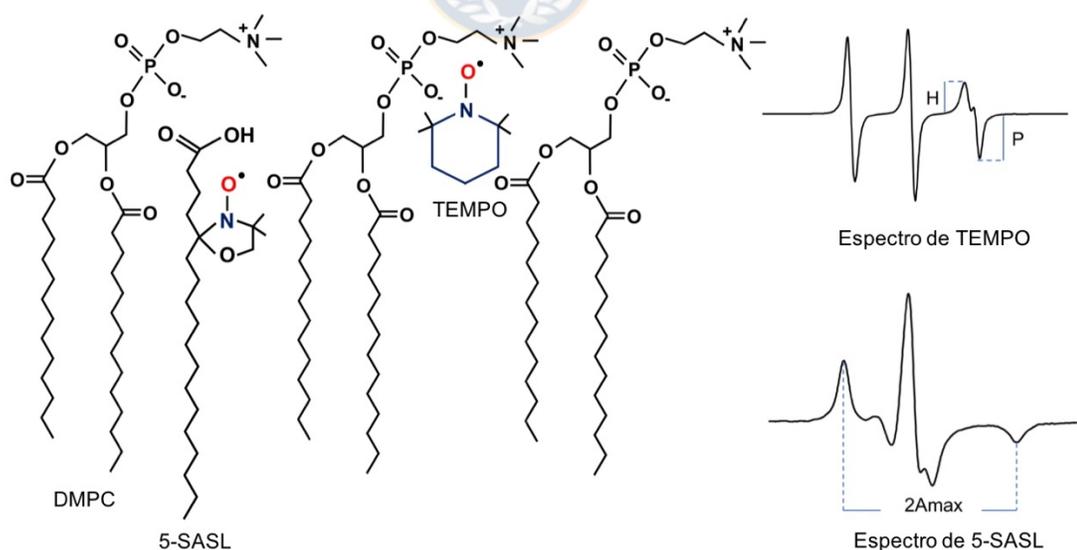


Fig. 11. Localización en la membrana de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y espectros característicos de las sondas paramagnéticas 5-SASL y TEMPO. Fuente: elaboración propia.

En las membranas biológicas, los espectros de EPR obtenidos de las sondas paramagnéticas se utilizan para identificar alteraciones en el movimiento de los lípidos en la bicapa y evaluar la fluidez de la membrana ⁸⁵. Las sondas más usadas en los estudios de membrana mediante EPR son las derivadas del ácido esteárico, al que se le inserta un radical nitroxilo en una posición específica de su cadena carbonada. Un ejemplo es la sonda paramagnética ácido 5-doxilestérico (5-SASL), que posee el grupo (NO•) en el quinto carbono de su cadena acílica (Fig. 11). De los espectros de 5-SASL se obtiene información dinámica de la región hidrófoba próxima a los grupos polares de la membrana. Otra sonda comúnmente utilizada es la 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi o TEMPO, que se reparte entre la interface lípido-agua, y su espectro permite determinar la fluidez del entorno polar de la bicapa ⁸⁶. Con el uso de estas sondas también se puede obtener información sobre la profundidad de inserción y la orientación de una molécula exógena dentro de la membrana ¹³.

2.2.5. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido (SEM) es una técnica utilizada para examinar y registrar la topografía de la superficie de una muestra con una resolución significativamente mayor que la obtenida usando microscopía óptica. SEM es versátil y puede proporcionar información estructural de la superficie de muchos tipos de materiales, incluidos aquellos de interés biológico ⁸⁷. Los microscopios usados para SEM (Fig.12) generan haces de electrones altamente enfocados que impactan la muestra dentro de una cámara de vacío. El haz de electrones se enfoca en un punto y luego se desplaza escaneando secuencialmente la muestra. En cada ubicación, las señales emitidas desde la muestra son recolectadas por los detectores, los que finalmente crean la imagen ⁸⁸. La profundidad del análisis de SEM depende de la velocidad de los electrones en el haz y la naturaleza del material en la muestra, pero generalmente es de alrededor de 1 μm ⁸⁹.

La observación de muestras biológicas por SEM requiere que el material esté adecuadamente deshidratado, ya que el agua interfiere con la resolución de la imagen. Sin embargo, la remoción del agua implica en la mayoría de los casos el deterioro estructural de la muestra. Este efecto puede evitarse tratando la muestra con tetraóxido

de osmio o glutaraldehído. Ambas sustancias crean enlaces covalentes entre diferentes moléculas, especialmente lípidos o proteínas, preservando la estructura y la forma del material. Finalmente, la muestra es recubierta con una delgada capa de un metal pesado para producir un mejor contraste en la imagen debido a que los elementos ligeros como carbono, nitrógeno, oxígeno e hidrógeno, presentes en las muestras biológicas ofrecen muy poca señal ⁹⁰.

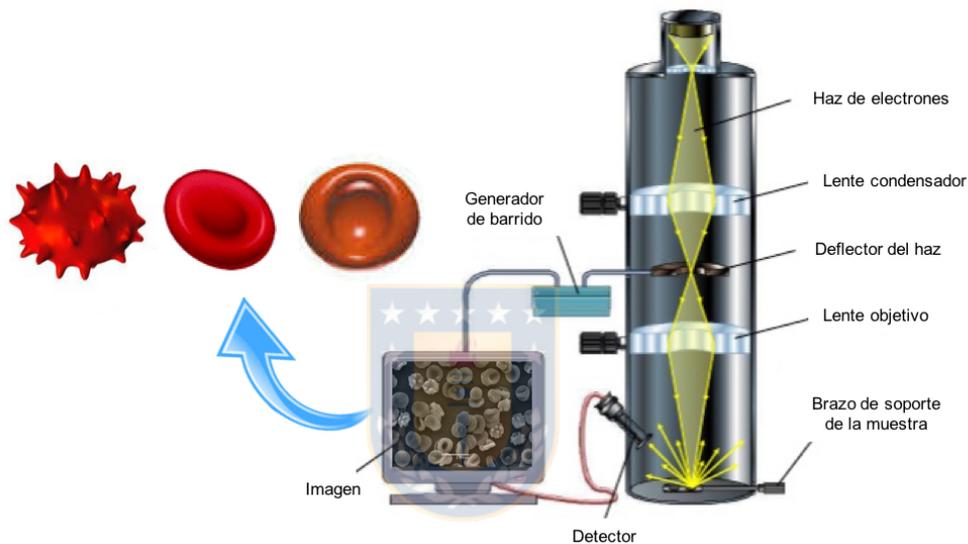


Fig. 12. Diagrama de la observación de una muestra de eritrocitos humanos utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM). Fuente: elaboración propia.

2.2.6. Ensayos de hemólisis

El test de hemólisis es un método rápido, reproducible y de bajo costo, usado ampliamente para detectar la citotoxicidad de compuestos de interés farmacológico ⁹¹. Durante la hemólisis, los glóbulos rojos experimentan un proceso de disrupción de su membrana plasmática liberando hemoglobina y otros componentes de su interior. La hemólisis involucra la alteración de la organización lipídica, disposición de las proteínas integrales y pérdida del equilibrio celular, procesos que puede ser causados

por la interacción de compuestos químicos con la membrana, fragilidad osmótica o alteraciones en el pH del medio ⁹².

Cuando la membrana plasmática del eritrocito es lisada, su contenido, principalmente hemoglobina, es liberado al exterior, por lo que es posible estimar la cantidad de eritrocitos destruidos en una prueba midiendo la cantidad de hemoglobina en la muestra ⁹³. En el ensayo de hemólisis, la hemoglobina liberada se determina fotométricamente a 540 nm y se correlaciona con el porcentaje de células lisadas. La cantidad de hemólisis para cada concentración del agente de prueba se grafica y se compara con un control, el que generalmente es constituido por una suspensión de glóbulos rojos a pH fisiológico ⁷⁰. Con este método también se puede determinar la propiedad de algunos compuestos de prevenir la hemólisis. En este caso, se realiza una pre-incubación de los glóbulos rojos con el agente que se espera proteja las células, y luego con la sustancia que induce la lisis. Este ensayo permite calcular la concentración del agente protector que induce la inhibición del 50 % de la hemólisis (CI 50), causada por el reactivo hemolítico ¹⁵.

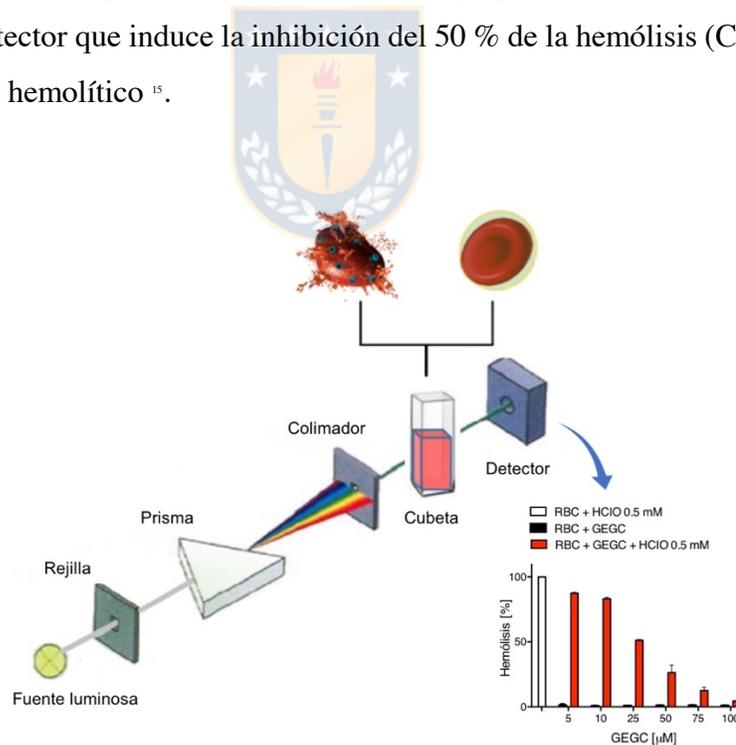


Fig. 13. Diagrama de un ensayo de hemólisis. Fuente: elaboración propia.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Metabolitos vegetales

Ácido gálico

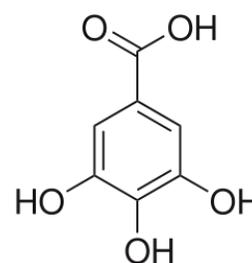
Formula: $C_7H_6O_5$

Mm: 170.12 g/mol

Lote: 098K0245; Sigma-Aldrich

Log P: 0.7

Clasificación: Ácido hidróxibenzoico



Ácido cafeico

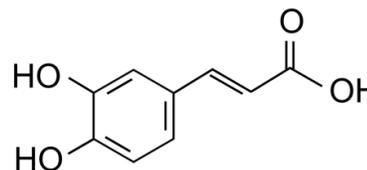
Formula: $C_9H_8O_4$

Mm: 180.16 g/mol

Lote: SLBL7069V; Sigma-Aldrich

Log P: 1.2

Clasificación: Ácido hidróxicinámico



Galato de epigallocatequina (GEGC)

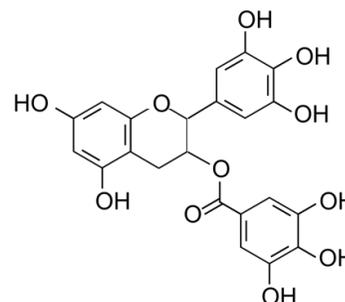
Formula: $C_{22}H_{18}O_{11}$

Mm: 458.37 g/mol

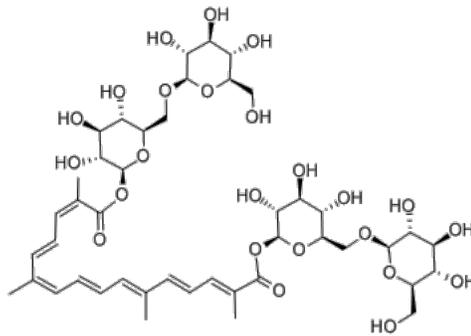
Lote: SLBL3516V; Sigma-Aldrich

Log P: 1.2

Clasificación: Flavonoide



Crocina

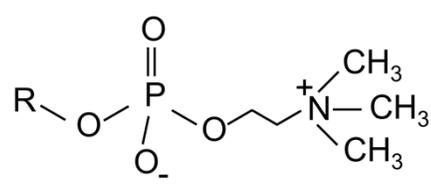
<p>Formula: $C_{44}H_{64}O_{24}$</p> <p>Mm: 976.96 g/mol</p> <p>Lote: BCBN1921V; Sigma-Aldrich</p> <p>Log P: -2.5</p> <p>Clasificación: Carotenoide</p>	
--	--

Pilocarpus goudotianus

<p>Genero: <i>Pilocarpus</i></p> <p>Familia: Rutaceae</p> <p>Reino: Plantae</p> <p>Parte de la planta: Hoja y corteza</p> <p>Origen de la muestra: 11°03' 53" N, 69° 39' 07" O; Sierra de San Luis, Venezuela</p>	
---	---

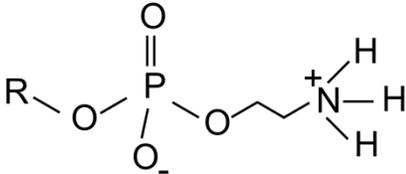
3.1.2. Fosfolípidos

Dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC)

<p>Formula: $C_{76}H_{172}NO_8P$</p> <p>Mm: 677.93 g/mol</p> <p>Lote: 850345-02-270; Avanti Polar Lipid</p> <p>Tm: 24.3 °C</p> <p>Clasificación: Glicerofosfolípido</p>	
--	--

R= 1,2-dimiristoil-sn-glicerol ($C_{44}H_{88}O_2$)

Dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE)

Formula: $C_{33}H_{76}NO_8P$ Mm: 635.35 g/mol Lote: 850745-01-069; Avanti Polar Lipid Tm: 50.2 °C Clasificación: Glicerofosfolípido	
R= 1,2-dimiristoil-sn-glicerol ($C_{41}H_{86}O_2$)	

3.1.3. Otros materiales

Ácido hipocloroso (HClO) se preparó diluyendo una solución de hipoclorito de sodio 4-5 % (Sigma-Aldrich, USA) en buffer fosfato PBS ($NaCl$ 150 mM, NaH_2PO_4 1.9 mM, Na_2HPO_4 8.1 mM, pH 7.4). La concentración de hipoclorito se determinó espectrofotométricamente a 292 nm utilizando $\epsilon = 350 M^{-1}.cm^{-1}$; en estas condiciones HClO y su base conjugada ClO^- están presentes en una relación aproximadamente equimolar ⁹⁴. Las sondas fluorescentes 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) y 6-dodecanoil-2-dimetilaminonaftaleno (laurdan) fueron adquiridas de Molecular Probe (Eugene, USA). Las sondas paramagnéticas ácido-5-doxilesteárico (5-SASL) y 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO), así como el resto de los reactivos en grado analítico se compraron a Sigma-Aldrich.

3.2. MÉTODOS**3.2.1. Estudios de difracción de rayos X en multibicapas de DMPC y DMPE**

La capacidad de los metabolitos vegetales (MVs) para perturbar la estructura de multibicapas compuestas de los fosfolípidos DMPC y DMPE se determinó mediante difracción de rayos X. 2 mg de cada fosfolípido fueron colocados en tubos Eppendorf y luego se les agregó 150 μL de (a) agua destilada (control) y (b) disoluciones acuosas de los MVs en el rango de concentraciones de 0.01-2.0 mM. Para evaluar el efecto

protector de los MVs, los fosfolípidos se pre-incubaron con los metabolitos durante 10 min y luego con una disolución de HClO 10 mM⁹⁵. Todas las muestras fueron incubadas durante 30 min en un baño de agua con agitación a 30 °C y 60 °C para DMPC y DMPE, respectivamente. Luego, fueron transferidas a capilares de vidrio de 1.5 mm de diámetro (WJM-Glas, Alemania) y centrifugadas a 2500 rpm por 15 min. A continuación, las muestras fueron difractadas en un generador de rayos X Bruker Kristalloflex 760 con radiación K α de cobre ($\lambda=1.52$ Å) durante 30 min. Se usaron 2 detectores lineales Hecus M. Braun PSD 50M colocados a 8 y 14 cm de la muestra para la recolección de las difracciones. El tratamiento y análisis de los datos se realizó en Origin 7.0 (Origin Lab Corporation, USA) a partir de las intensidades relativas obtenidas del software ASA, acoplado al equipo. Los experimentos se realizaron a una temperatura controlada de 18 °C \pm 1 °C, la que esta por debajo de la temperatura de transición principal de DMPC (24.3 °C) y DMPE (50.2 °C)⁹⁶. Temperaturas más altas habrían inducido transiciones a fases más fluidas, las que dificultan la detección de los cambios estructurales. Cada experimento fue repetido al menos dos veces.

3.2.2. Estudios de calorimetría diferencial de barrido (DSC) en vesículas de DMPC y DMPE

El comportamiento termotrópico de vesículas de DMPC y DMPE en presencia de los MVs fue determinado usando DSC. 80 μ L de solución clorofórmica de DMPC o DMPE de un stock 10 mM fueron evaporados en las paredes de un tubo de vidrio aplicando una suave corriente de nitrógeno hasta formar una delgada película de lípido. A continuación, los tubos se colocaron al vacío durante 1 h para eliminar posibles trazas del solvente. Las películas secas fueron entonces hidratadas con una disolución acuosa de los MVs en concentraciones entre 0.01-1.0 mM. Vesículas multilamelares (MLV) con una concentración de 1.0 mM de los lípidos fueron formadas calentando la mezcla hidratada sobre la temperatura de transición principal de cada fosfolípido (30 °C, DMPC y 60 °C, DMPE), y agitando en vortex durante 3 min. Los controles consistieron de MLV formadas a partir de películas de lípido hidratadas con agua. Para llevar a cabo los experimentos de DSC, las muestras fueron previamente desgasificadas entre 30.4–50.7 kPa a 25 °C por 10 min para evitar la formación de burbujas durante el

calentamiento. Aproximadamente 400 μL de la suspensión de MLV e igual volumen de agua como referencia se colocó en las celdas de un calorímetro NANO DSC Serie III (TA Instruments, USA). Las celdas cargadas se equilibraron térmicamente durante 10 min a la temperatura inicial del experimento. Todas las mediciones se realizaron a una presión de 0.3 MPa. Los datos se recolectaron en el rango de 5–40 $^{\circ}\text{C}$ (DMPC) y 30–70 $^{\circ}\text{C}$ (DMPE) con una velocidad de barrido de 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Similares condiciones se aplicaron para obtener una línea base del solvente. Los experimentos fueron realizados por duplicado y cada muestra fue registrada dos veces para comprobar la reproducibilidad. Los termogramas y datos termodinámicos se obtuvieron mediante el software Nano Analysis suministrado por TA Instruments.

3.2.3. Estudios de espectroscopía de fluorescencia en vesículas de DMPC y membranas aisladas de eritrocitos humanos

La influencia de los MVs sobre las propiedades físicas de vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC y membranas aisladas de eritrocitos humanos sin sellar (IUM) se determinó mediante espectroscopía de fluorescencia utilizando las sondas DPH y laurdan. DPH es una sonda fluorescente ampliamente usada para evaluar el comportamiento dinámico de las regiones hidrófobas de las membranas. Sus mediciones de anisotropía en estado estacionario se correlacionan con la difusión rotacional del fluoróforo y el empaquetamiento de las cadenas acílicas de los fosfolípidos ⁷⁹. Por otro lado, la sonda anfifílica laurdan muestra un espectro de emisión dependiente de la polaridad del medio en que se encuentra. Su segmento fluorescente se ubica en una posición poco profunda de la bicapa, a nivel del esqueleto de glicerol de los fosfolípidos ⁸¹. LUV de DMPC se prepararon a partir de la extrusión de una suspensión de liposomas multilamelares (MLV) 0.4 mM a través de dos filtros de policarbonato con poros de 400 nm, a una temperatura sobre la transición de fase principal del lípido. Por otro lado, las IUM fueron preparadas por lisis de un paquete de sangre venosa heparinizada siguiendo el método propuesto por Dodge et. al ⁷². DPH y laurdan fueron incorporados a las LUV e IUM por adición de 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de disoluciones 0.5 mM de las sondas disueltas en dimetilsulfóxido y etanol, respectivamente; a continuación, las muestras se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 h. Los

MVs fueron incorporados en las suspensiones de LUV e IUM mediante la adición de una adecuada alícuota de disolución isotónica de los metabolitos para obtener las diferentes concentraciones utilizadas en los ensayos.

Las mediciones de anisotropía y polarización generalizada se realizaron en un espectrofluorómetro K-2 (ISS Inc., USA), utilizando el software ISS para recolectar y analizar los datos. Para DPH y laurdan, la luz de excitación provino de un láser modulable ISS de 375 nm. La anisotropía (r) se calculó de acuerdo con la definición: $r = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2I_{\perp})$, donde I_{\parallel} e I_{\perp} son las intensidades de emisión fluorescente paralela y perpendicular, respectivamente respecto a la luz de excitación verticalmente polarizada⁷⁹. Los cambios espectrales de fluorescencia de laurdan se evaluaron cuantitativamente utilizando el concepto de polarización generalizada (PG), definido por la expresión $PG = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp})$, donde I_{\parallel} e I_{\perp} corresponden a los máximos de emisión de laurdan en la fase gel (440 nm) y líquido cristalino (490 nm), respectivamente⁸¹. Las mediciones se realizaron a 18 °C y 37 °C en las LUV de DMPC y 37 °C en las IUM. La temperatura se mantuvo controlada mediante un baño de circulación externo (Cole-Parmer, USA) acoplado a un termómetro digital (Omega Engineering Inc., USA). Para cada concentración ensayada se tomaron 15 mediciones en tres experimentos independientes.

3.2.4. Estudios de espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR) en vesículas de DMPC y membranas aisladas de eritrocitos humanos

La resonancia paramagnética electrónica (EPR) proporciona información importante sobre el efecto de moléculas exógenas en las propiedades estructurales y dinámicas de las membranas lipídicas. LUV de DMPC e IUM fueron preparadas siguiendo los mismos métodos descritos en la sección 3.2.3. Se utilizaron las sondas paramagnéticas 5-SASL y TEMPO, las que se ubican a diferentes profundidades de la membrana e informan sobre la fluidez y el grado de orden del empaquetamiento lipídico. 5-SASL posee un grupo NO^{\bullet} localizado cerca de la región de los grupos polares de la membrana⁸²; de su espectro se determina el parámetro empírico $2A_{\text{max}}$, el que es una medida de la velocidad de movimiento de la cadena alquílica de la sonda introducida en el entorno lipídico⁸³. Por otro lado, la sonda TEMPO se reparte en la

interfase lípido-agua; su espectro permite determinar el contenido de la sonda en la fracción hidrófoba (H) e hidrofílica (P) de la membrana. A partir de esta información se obtiene el coeficiente de distribución $F = (H/H+P)$, que está relacionado con la fluidez de membrana ⁸⁶.

Las LUV de DMPC y las IUM fueron etiquetadas con 5-SALS y TEMPO en una relación molar lípido-sonda de 100:1 en LUV y 50 μg de sonda/mg de proteína en IUM. Las muestras se incubaron durante 1 h a 37 °C para permitir la incorporación de las sondas a los modelos de membrana. Posteriormente, 30 μL de LUV 50 mM e IUM 2.5 mg de proteína/mL fueron colocados en tubos Eppendorf, y a estos se les agregó 10 μL y 170 μL , respectivamente de la adecuada concentración del metabolito vegetal disuelto en buffer fosfato isotónico. Las muestras se incubaron durante 1 h a 37 °C y luego se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 min. A continuación, 25 μL del sedimentado se colocó dentro de capilares de vidrio ($\phi = 1$ mm) y estos fueron flameados y sellados. Las mediciones de EPR se realizaron en un espectrómetro Bruker EMX-micro operando en la banda X (9 GHz), a una temperatura controlada de 18 °C y 37 °C para LUV y 37 °C para IUM. Los espectros se obtuvieron a una potencia de microondas de 2 mW y una amplitud de modulación de 1.0 G. Se realizaron diez barridos por muestra de 30 s cada uno. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

3.2.5. Estudios de microscopía electrónica de barrido (SEM) en eritrocitos humanos

Las alteraciones morfológicas inducidas por los MVs y su capacidad protectora frente a HClO en eritrocitos humanos (RBC) fueron analizadas mediante SEM. 100 μL de sangre del dedo de un donante sano se recibieron en un tubo Eppendorf que contenía 900 μL de solución buffer fosfato (PBS) pH 7.4. La suspensión de glóbulos rojos se homogeneizó y luego se centrifugó a 1000 rpm por 10 min. A continuación, el sobrenadante fue retirado mediante aspiración y se reemplazó con PBS fresco; este procedimiento fue repetido tres veces. Posteriormente, 50 μL de la suspensión de RBC fue colocada en tubos Eppendorf y a estos se les agregó 150 μL de (a) PBS (control), (b) MVs (0.001–1.0 mM) y (c) HClO 0.05 mM disueltos en PBS. La capacidad

protectora de los MVs se evaluó incubando previamente los RBC con los metabolitos (0.001–0.1 mM) durante 20 minutos y luego con 0.05 mM de HClO. Todas las muestras se incubaron en un baño térmico con agitación durante 1 h a 37 °C. Luego de esto, las muestras fueron centrifugadas (1000 rpm por 10 min) y el sobrenadante descartado. Las RBC fueron entonces resuspendidas con 500 µL de solución de glutaraldehído 2.5 % en PBS y colocadas en refrigeración a 4 °C por 24 h. A continuación, los eritrocitos fueron lavados tres veces con 500 µL de agua destilada, y una gota de la suspensión final se colocó sobre un portaobjetos de vidrio de 20x20 mm. Los portaobjetos fueron secados al aire por 12 h y finalmente recubiertos con una delgada capa de oro. Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico de barrido modelo JSM-6308LV (JEOL, Japón). De cada muestra se tomaron al menos cuatro micrográficas con una resolución de 2500X.

3.2.6. Ensayos de hemólisis en eritrocitos humanos

La capacidad de los MVs para prevenir la ruptura de la membrana de los glóbulos rojos humanos se determinó mediante ensayos de hemólisis. 10 mL de sangre fueron obtenidos directamente por punción en la vena de donantes sanos que no hubieran recibido tratamiento farmacológico. La sangre se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min a 4 °C. A continuación, el sobrenadante y la capa leucocitaria fueron descartados y reemplazados por PBS fresco a 4 °C; este procedimiento fue repetido tres veces. Posteriormente, 150 µL de la suspensión de RBC fueron incubados con las diferentes concentraciones de los MVs (0.001–1.0 mM). Ácido hipocloroso (HClO) fue añadido a las muestras en una alícuota de 150 µL de un stock 5 mM en PBS. Las muestras se incubaron en un baño de agitación durante 15 minutos a 37 °C, y a continuación fueron centrifugadas durante 5 min a 2500 rpm. La hemólisis se determinó espectrofotométricamente a 540 nm (Shimadzu UV-mini, Japón) a partir de la hemoglobina liberada en el sobrenadante de la muestra. El efecto protector se evidenció por la disminución en el porcentaje de hemólisis en relación con un control de RBC incubadas con 0.5 mM de HClO. La concentración inhibitoria media de la hemólisis (CI 50) se obtuvo usando el método de la curva de regresión con mejor ajuste a partir de los datos obtenidos en los experimentos ¹⁰⁰.

3.2.7. Tratamiento de los extractos acuosos de hojas y corteza de la planta *Pilocarpus goudotianus*

3.2.7.1. Preparación del material vegetal

Aproximadamente 1 Kg de las hojas y la corteza de la planta *Pilocarpus goudotianus* fue recolectado durante las primeras horas de la mañana en la zona norte de la Sierra de San Luis (Venezuela); coordenadas 11°03' 53" N, 69° 39' 07" O. La planta fue identificada por el Dr. Luis Lemus (Universidad Nacional Francisco de Miranda, Venezuela). Las hojas y corteza de la planta fueron secadas a temperatura ambiente y luego el material seco fue molido y tamizado. 100 g del pulverizado de cada parte de la planta fue macerado con 250 mL de agua destilada por 48 h. El extracto acuso se filtró y almacenó a -20 °C, para posteriormente ser liofilizado a -15 °C durante 72 h.

3.2.7.2. Determinación de polifenoles totales

El contenido total de polifenoles (CTP) presente en los extractos acuosos de las hojas y corteza de *P. goudotianus* se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu¹⁰¹. El ensayo se realizó mezclando 50 mg de los extractos liofilizados con 2.5 mL de agua destilada, 250 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 1 mL de disolución de Na₂CO₃ 20 %, el volumen fue completado con agua destilada en un balón de 5 mL; la mezcla se agitó y se dejó reposar por 30 min. El CTP se determinó espectrofotométricamente a 760 nm usando una curva estándar de ácido gálico como referencia¹⁰². Todas las dosificaciones de los extractos mostradas en este trabajo están expresadas en unidades milimolares equivalentes de ácido gálico (mM EAG).

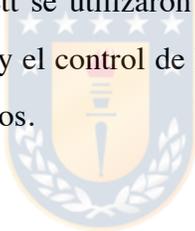
3.2.7.3. Análisis de HPLC-MS

Extractos liofilizados de las hojas y corteza de *P. goudotianus* (10 mg) fueron preparados a una concentración de 9.5 mg/mL en metanol-agua 1:1 v/v. 20 µL de la solución se analizó en un sistema LC-ESI-MS/MS que consistía en un HPLC HP 1100 (Agilent Technologies Inc., USA) conectado a un espectrómetro de masas Esquire 4000 Ion Trap LC/MS (n) (Bruker Daltonik GmbH, Alemania). Se utilizó una columna Supelcosil LC-18 300 × 4.0 mm, 5 µm y 120 Å (Sigma-Aldrich, USA); a la salida de

la columna, una bifurcación dividió el eluyente para la detección simultánea de espectrometría UV y de masas. La fase móvil utilizada fue ácido fórmico en agua (10 % v/v, solvente A) y ácido fórmico en acetonitrilo (10 % v/v, solvente B) a una velocidad de flujo de 1 mL/min, de acuerdo con el siguiente gradiente de elución: 0-25 min, 5-15 % B; 25-53 min, 15-27 % B; 53-57 min, 27-5 % B; y 57-60 min, 5 % de B. Los compuestos se detectaron a 280 nm, y los datos espectrales de masas fueron adquiridos en modo positivo y negativo. La ionización se realizó a 3000 V asistida por nitrógeno como gas nebulizador a 24 psi y como gas de secado a 365 °C con un caudal de 6 L/min. Todas las exploraciones se realizaron en el rango de 20-2200 m/z.

3.2.8. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos experimentales se realizó mediante el software Prism 6 (GraphPad Software Inc.). Análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba post hoc de Dunnett se utilizaron para estimar las diferencias entre las muestras tratadas con los MVs y el control de los experimentos. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.



CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1. Estudios de difracción de rayos X en multibicapas de DMPC y DMPE

La Fig. 14 muestra los patrones de difracción de rayos X de multibicapas de DMPC en fase gel, incubadas con agua y concentraciones crecientes de los metabolitos vegetales ácido gálico, ácido cafeico, galato de epigallocatequina (GEGC), crocina y los extractos de corteza y hojas de *P. goudotianus*.

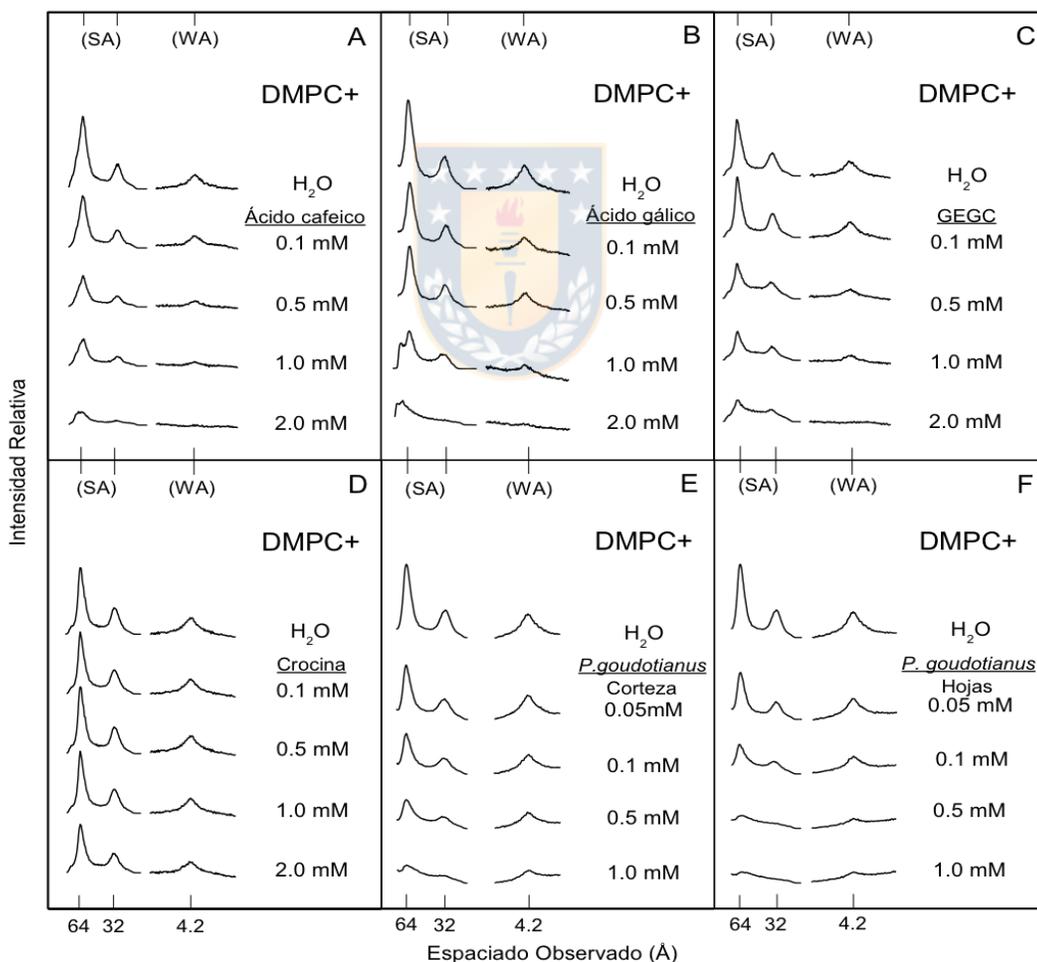


Fig. 14. Patrón de difracción de rayos X de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) en agua (H₂O), y disoluciones de (A) ácido cafeico, (B) ácido gálico, (C) galato de epigallocatequina (GEGC), (D) crocina, (E) corteza y (F) hojas de *P. goudotianus*. (SA) y (WA) representan reflexiones de ángulo bajo y amplio, respectivamente. Fuente: elaboración propia.

La estructura tridimensional de las multibicapas de DMPC en su forma cristalina seca está principalmente estabilizada por interacciones electroestáticas entre los grupos fosfato cargados negativamente y los grupos amino de carga positiva. En esta estructura, las multibicapas de DMPC presentan un espaciado (ancho de la bicapa más el espacio entre bicapas) de 54 Å. Sin embargo, en medio acuoso las moléculas de agua ocupan los espacios interbicapa de DMPC y producen la expansión del espaciado a 64 Å, observado en las reflexiones de ángulo bajo (SA en Fig. 14) ⁶². La hidratación también disminuyó las reflexiones de SA a solo los primeros dos ordenes de magnitud (64 Å y 32 Å). Por otro lado, solo una reflexión a 4.2 Å se observó en la región de ángulo amplio (WA en la Fig. 14), la que corresponde a la distancia promedio entre las cadenas acílicas totalmente extendidas del fosfolípido empaquetadas en un arreglo hexagonal ¹⁰³.

En la Fig. 14 también se aprecia que los metabolitos vegetales (MVs) causaron significantes perturbaciones estructurales en las multibicapas de DMPC. Esto está evidenciado por el debilitamiento de las reflexiones en las regiones de SA y WA, en una forma dependiente de la concentración ensayada de los metabolitos (0.05–2.0 mM). Los extractos de hojas y corteza de *P. goudotianus* mostraron los mayores efectos estructurales en las multibicapas de DMPC. De hecho, como puede observarse en las Figs. 14E y 14F, el incremento en la concentración de los extractos disminuye progresivamente la intensidad de las reflexiones tanto en SA como en WA, las que prácticamente desaparecieron a la concentración de 1.0 mM. Por otro lado, crocina causó las menores perturbaciones en DMPC. La Fig. 14D muestra que solo a la concentración más alta ensayada (2.0 mM), crocina indujo una ligera disminución en la intensidad de las reflexiones, particularmente en la región de ángulo bajo (SA en la figura).

La Fig. 15 muestra los resultados obtenidos de los experimentos de rayos X en multicapas de DMPE incubadas con agua y los MVs.

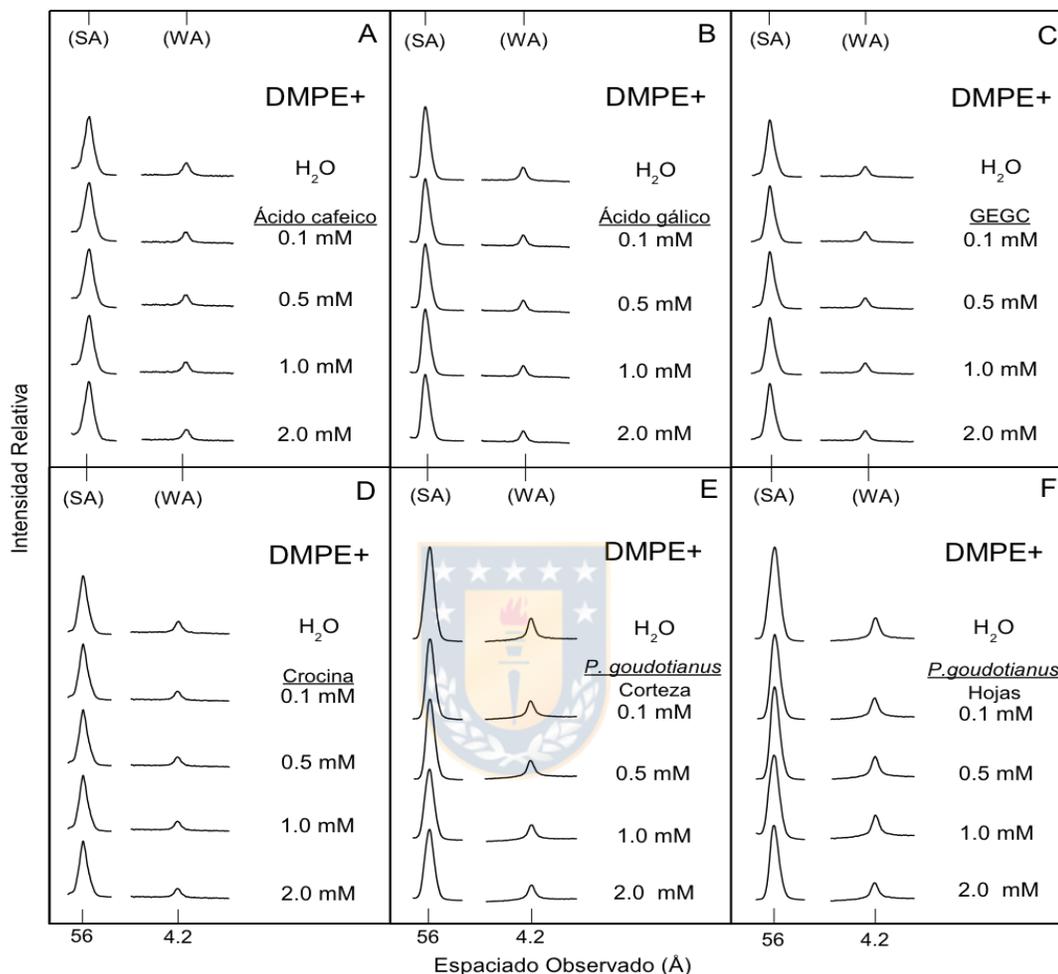


Fig. 15. Patrón de difracción de rayos X de dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE) en agua (H₂O), y disoluciones de (A) ácido cafeico, (B) ácido gálico, (C) galato de epigalocatequina (GEGC), (D) crocina, (E) corteza y (F) hojas de *P. goudotianus*. (SA) y (WA) representan reflexiones de ángulo bajo y amplio, respectivamente. Fuente: elaboración propia.

Se ha reportado que el agua no afecta la estructura de las multicapas construidas de DMPE⁶². Su patrón de difracción muestra una intensa reflexión en la región de ángulo bajo (SA) centrada en 56 Å, indicando un espaciado mucho menor respecto al de DMPC (64 Å). Aunque, al igual que en DMPC, una única reflexión situada a 4.2 Å fue encontrada en la región de ángulo amplio (WA), corroborando el empaquetamiento hexagonal de las cadenas carbonadas de DMPE en fase gel. En la

Fig. 15 también se observa que la presencia de los MVs no causó efectos significativos sobre la estructura de las multibicapas de DMPE, ya que la intensidad de sus reflexiones permaneció prácticamente inalterada en todas las concentraciones ensayadas de los metabolitos.

La Fig. 16 muestra la interacción de ácido hipocloroso (HClO) con las multibicapas de DMPC y DMPE. Como puede apreciarse en la Fig. 16A, HClO no produce efectos significativos en DMPC, incluso a una concentración de 10 mM. Sin embargo, en la Fig. 16B se observa que 2.5 mM de HClO indujo una profunda perturbación estructural en las multibicapas de DMPE, disminuyendo considerablemente la intensidad de las reflexiones, particularmente la observada en la región de ángulo bajo (SA). Este debilitamiento en la intensidad de las reflexiones de DMPE ocurrió de manera dependiente de la concentración de HClO. De hecho, la concentración de 10 mM prácticamente causó la completa abolición de la señal.

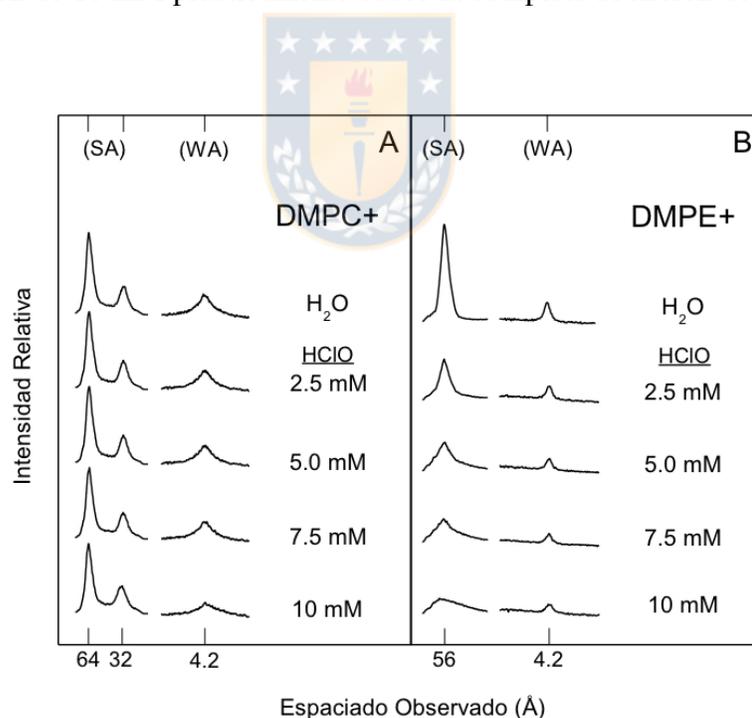


Fig. 16. Patrón de difracción de rayos X de (A) dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y (B) dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE) en agua (H₂O) y diferentes concentraciones de ácido hipocloroso (HClO). (SA) y (WA) representan difracción de ángulo bajo y amplio, respectivamente. Fuente: elaboración propia.

La Fig. 17 presenta los resultados de la capacidad protectora de los MVs ante los daños estructurales causados por HClO en DMPE.

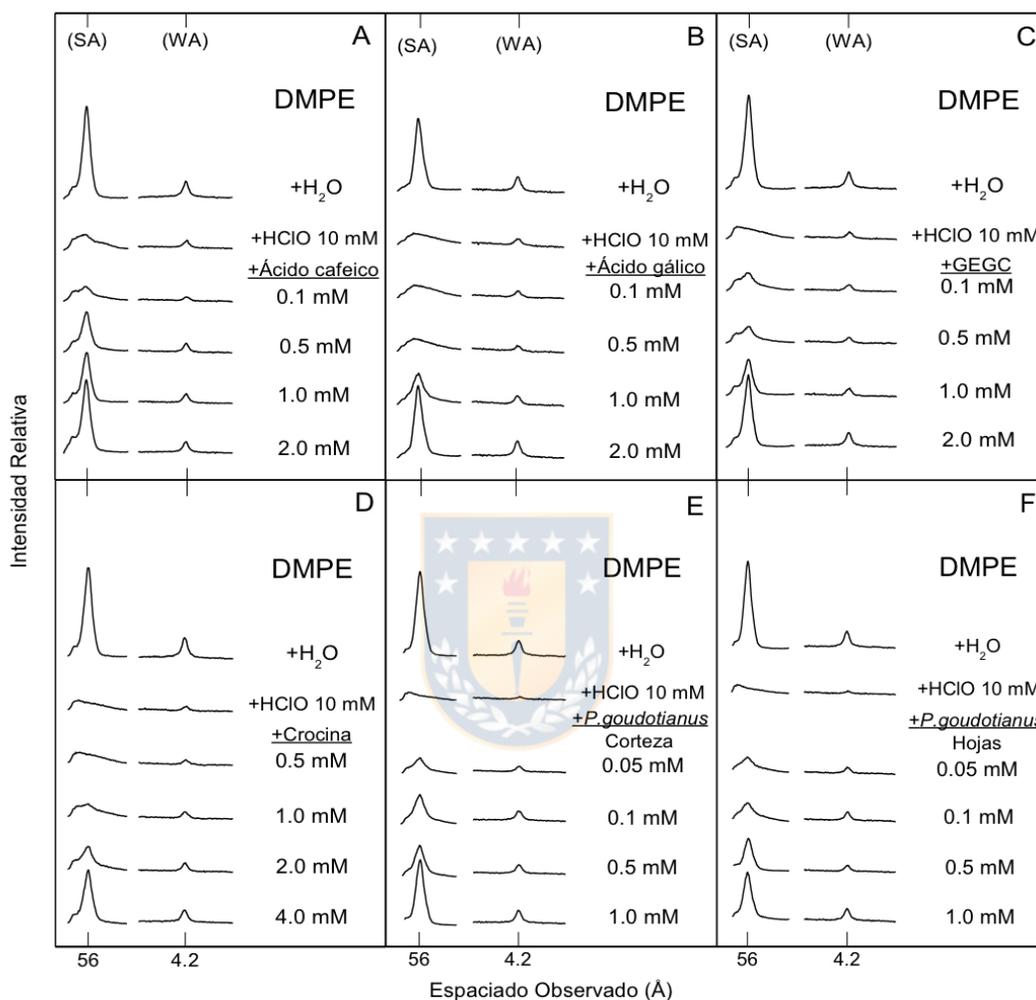


Fig. 17. Patrón de difracción de rayos X de DMPE en agua (H_2O), ácido hipocloroso (HClO), y disoluciones de (A) ácido cafeico, (B) ácido gálico, (C) galato de epigalocatequina (GEGC), (D) crocina, (E) corteza y (F) hojas de *P. goudotianus*. (SA) y (WA) representan difracción de ángulo bajo y amplio, respectivamente. Fuente: elaboración propia.

La incubación de las multicapas de DMPE con HClO 10 mM causó daños estructurales significativos, desapareciendo prácticamente las reflexiones. Sin embargo, la pre-incubación de DMPE con concentraciones crecientes de los metabolitos produjo un continuo fortalecimiento en la intensidad de las reflexiones

tanto en la región de SA como en WA, indicando la neutralización de los efectos estructurales causados por HClO. Las Figs. 17E y 17F muestran que los extractos de hojas y corteza de *P. goudotianus* mostraron la mayor protección contra HClO, inhibiendo completamente sus efectos estructurales a una concentración de 1.0 mM. GEGC, ácido gálico y ácido cafeico mostraron una protección similar a 2.0 mM, mientras que crocina mostró revertir los daños estructurales de HClO a 4.0 mM.

4.2. Estudios de calorimetría diferencial de barrido (DSC) en vesículas de DMPC y DMPE

En la Fig. 18 se presentan los termogramas obtenidos por DSC de vesículas multilamelares grandes de DMPC y de mezclas binarias DMPC/MVs.

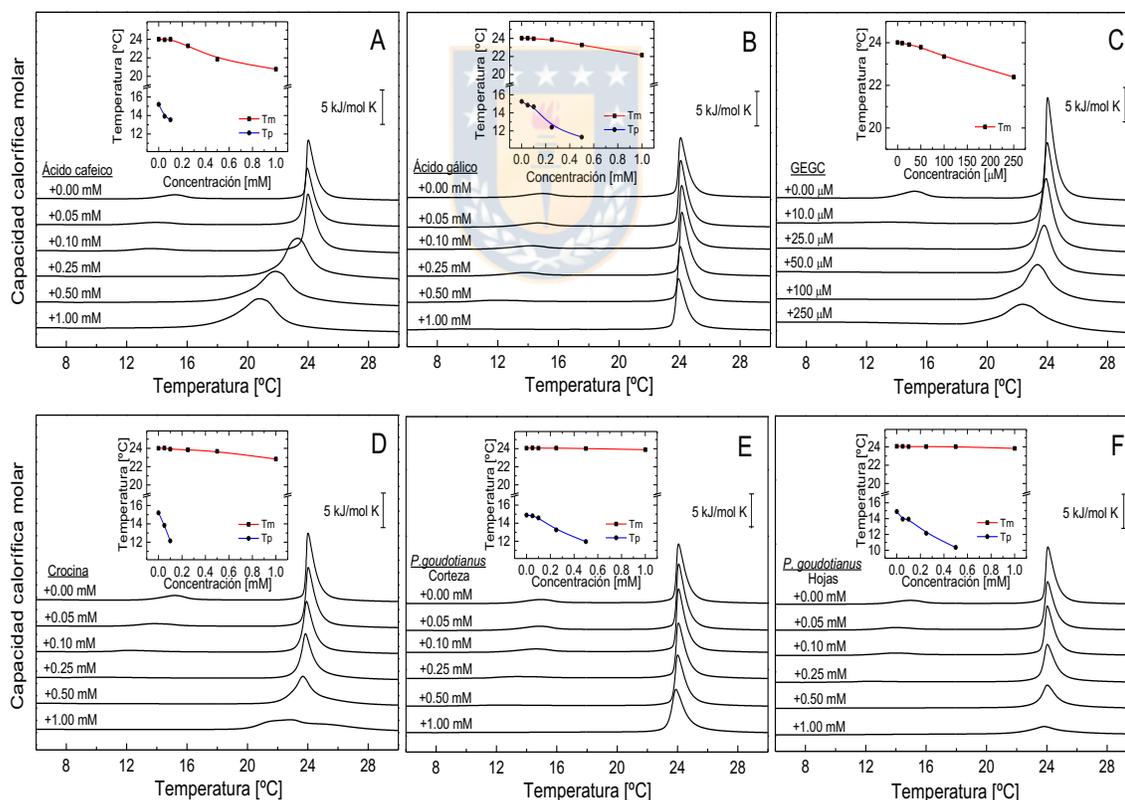


Fig. 18. Termogramas de DSC de vesículas multilamelares (MLV) de DMPC en presencia de (A) ácido cafeico, (B) ácido gálico, (C) galato de epigallocatequina (GEGC), (D) crocina, (E) corteza (F) y hojas de *P. goudotianus*. Fuente: elaboración propia.

Las transiciones de fase en los lípidos están caracterizadas por picos en el perfil calorimétrico observado por DSC debido al cambio en la capacidad calorífica del lípido en función de la temperatura ¹⁰⁴. La temperatura de transición principal (T_m) corresponde al pico máximo en el termograma y su entalpía está dada por el área integrada bajo el pico, dividida por la concentración del lípido ⁴⁶. Los perfiles calorimétricos de vesículas de DMPC puro en la Fig. 18, muestran un agudo y bien definido pico con una T_m cercana a 24 °C, que surge de la transición de la fase gel inclinada ($P\beta'$) a la fase líquido cristalino ($L\alpha$). Esta transición presentó un cambio de entalpía (ΔH) medio de 17.8 kJ/mol (ver apéndice 1) y un ancho de pico a la mitad de su altura ($\Delta T_{1/2}$) de 0.61 °C. Por otro lado, un pico suave y ligeramente ancho fue detectado alrededor de 15 °C, indicando la temperatura de pre-transición (T_p) del lípido. La pre-transición es un evento típico en el comportamiento termotrópico de las fosfatidilcolinas, y corresponde al cambio de la fase gel lamelar ($L\beta'$) a la fase gel inclinada. Esta transición está asociada principalmente con cambios en las interacciones de los grupos polares de DMPC.

Los termogramas de mezclas DMPC/MVs muestran que ácido cafeico, galato de epigallocatequina (GEGC), crocina y el extracto de hojas de *P. goudotianus*, causaron profundas alteraciones en el comportamiento termotrópico de DMPC. Esto está evidenciado por una dosis-dependiente disminución y ampliación del pico de transición principal del lípido junto con su continuo desplazamiento hacia temperaturas más bajas (Tabla 2). Sin embargo, como puede observarse en los incisos de la Fig. 18, el efecto de la concentración de los metabolitos sobre la T_m del lípido no fue lineal. Por otro lado, el significativo aumento en los valores de $\Delta T_{1/2}$ (Tabla 3) demuestra que estos metabolitos provocaron una transición de fase menos cooperativa de las moléculas de DMPC. El incremento en los valores de $\Delta T_{1/2}$ está relacionado con la desestabilización del conjunto de fosfolípidos y la disminución del tamaño de la unidad cooperativa ¹⁰⁵. En la Fig. 18 también puede observarse que todos los metabolitos provocaron notables efectos sobre la pre-transición de fase de DMPC. De hecho, la T_p disminuyó abruptamente como respuesta al aumento de la concentración de los MVs,

hasta desaparecer completamente a concentraciones relativamente bajas (línea azul en los incisos de la Fig. 18).

GEGC (Fig. 18C) indujo las mayores alteraciones termotrópicas en las vesículas de DMPC, ya que sus efectos fueron evidentes en un rango de concentraciones mucho menor (10-250 μM) al del resto de los metabolitos ensayados (0.05-1.0 mM). En las Tablas 2 y 3 se aprecia que GEGC a 250 μM causó una variación en la temperatura principal de transición (ΔT_m) de 1.62 $^\circ\text{C}$ e incrementó el valor de $\Delta T_{1/2}$ a 3.03 $^\circ\text{C}$. El efecto del resto de los MVs a la concentración de 1.0 mM, sobre el comportamiento termotrópico de DMPC siguió el orden: ácido cafeico ($\Delta T_m = 3.24$ $^\circ\text{C}$; $\Delta T_{1/2} = 2.77$ $^\circ\text{C}$), crocina ($\Delta T_m = 1.18$ $^\circ\text{C}$; $\Delta T_{1/2} = 4.81$ $^\circ\text{C}$) y extracto de hojas de *P. goudotianus* ($\Delta T_m = 0.23$ $^\circ\text{C}$; $\Delta T_{1/2} = 2.13$ $^\circ\text{C}$); mientras que el extracto de la corteza de *P. goudotianus* y ácido gálico mostraron escasa influencia sobre la transición principal de DMPC, afectando mayormente la pre-transición del lípido.

Tabla 2. Temperatura principal de transición (T_m) de DMPC puro y mezclas binarias DMPC/metabolitos vegetales obtenida a partir de los termogramas de DSC. Fuente: elaboración propia.

Conc. [mM]	Ácido cafeico	Ácido gálico	Crocina	<i>P. goudotianus</i> Corteza	<i>P. goudotianus</i> Hojas	GEGC	
	T _m [$^\circ\text{C}$]					Conc. [μM]	T _m [$^\circ\text{C}$]
0.00	24.01	24.03	24.01	24.06	24.06	0.00	24.01
0.05	23.95	24.01	24.03	24.08	24.05	10.0	23.98
0.10	24.00	23.03	23.91	24.06	24.03	25.0	23.91
0.25	23.29	23.97	23.84	24.07	24.03	50.0	23.79
0.50	21.85	23.86	23.67	24.02	24.02	100	23.35
1.00	20.77	23.57	22.83	23.89	23.83	250	22.39

Concentración 0.00 mM corresponde a la T_m de vesículas de DMPC puro.

Tabla 3. Ancho a media altura del pico principal de transición ($\Delta T_{1/2}$) de DMPC puro y mezclas binarias DMPC/metabolitos vegetales obtenido a partir de los termogramas de DSC. Fuente: elaboración propia.

Conc. [mM]	Ácido cafeico	Ácido gálico	Crocina	<i>P. goudotianus</i> Corteza	<i>P. goudotianus</i> Hojas	GEGC	
	$\Delta T_{1/2}$ [°C]					Conc. [μM]	$\Delta T_{1/2}$ [°C]
0.00	0.59	0.61	0.59	0.64	0.64	0.00	0.61
0.05	0.72	0.61	0.66	0.62	0.69	10.0	0.73
0.10	0.76	0.60	0.71	0.64	0.67	25.0	0.84
0.25	1.85	0.62	0.83	0.68	0.84	50.0	1.23
0.50	2.47	0.68	1.30	0.71	1.05	100	1.79
1.00	2.77	0.76	4.81	0.90	2.13	250	3.64

Concentración 0.00 mM corresponde a la T_m de vesículas de DMPC puro.

La Fig. 19 exhibe los termogramas de DSC obtenidos de vesículas multilamellares de DMPE en presencia de los MVs.

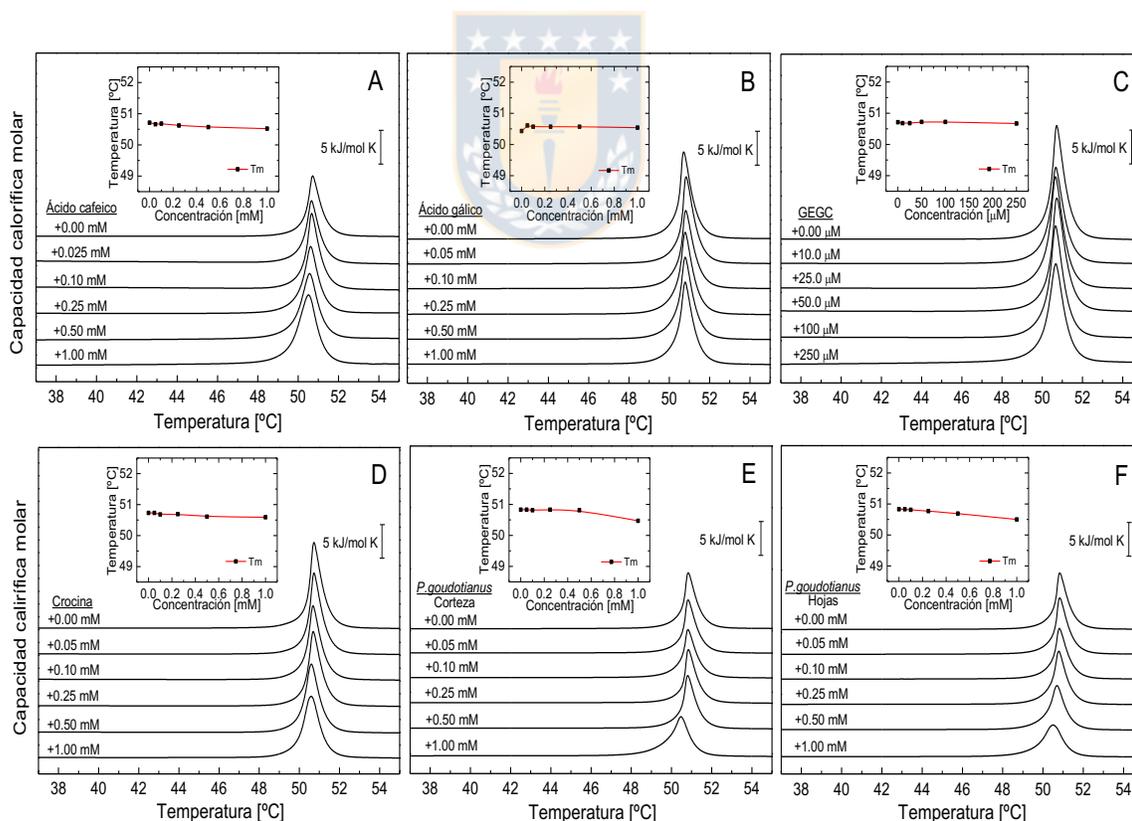


Fig. 19. Termogramas de DSC de vesículas multilamellares (MLV) de DMPE en presencia de (A) ácido cafeico, (B) ácido gálico, (C) galato de epigalocatequina (GEGC), (D) crocina, (E) corteza y (F) hojas de *P. goudotianus*. Fuente: elaboración propia.

DMPE puro (0.00 mM) en el rango de 38-54 °C mostró un único y agudo pico de transición con una T_m próxima a 50 °C y un valor de $\Delta T_{1/2}$ de 0.70 °C correspondiente a la transición de la fase gel ($L\beta$) a líquido cristalino ($L\alpha$). El análisis de los termogramas de DMPE en presencia de los MVs reveló que los extractos de hojas y corteza de *P. goudotianus* causaron ligeros cambios en el comportamiento termotrópico de DMPE, alterando la forma y posición del pico de transición principal del lípido (Figs. 19E y 19F). De hecho, a la concentración de 1.0 mM el extracto de corteza mostró una variación de temperatura ΔT_m de 0.51 °C y un $\Delta T_{1/2}$ de 0.07 °C, mientras que para el extracto de hojas se obtuvieron valores de $\Delta T_m = 0.32$ °C y $\Delta T_{1/2} = 0.48$ °C (Tablas 4 y 5). Por otro lado, GEGC, ácido cafeico, ácido gálico y crocina no mostraron influencia en el comportamiento termotrópico de DMPE. En efecto, como puede observarse en los incisos de las Figs. 19A-19D, la temperatura principal de transición de DMPE permaneció prácticamente inalterada con el aumento de la concentración de estos cuatro metabolitos.

Las tablas 4 y 5 presentan los valores de la temperatura principal de transición (T_m) y el ancho a media altura del pico de transición principal ($\Delta T_{1/2}$), respectivamente obtenidos del proceso de calentamiento de liposomas de DMPE.

Tabla 4. Temperatura principal de transición (T_m) de DMPE puro y mezclas binarias DMPE/metabolitos vegetales obtenida a partir de los termogramas de DSC. Fuente: elaboración propia.

Conc. [mM]	Ácido cafeico	Ácido gálico	Crocina	<i>P. goudotianus</i> Corteza	<i>P. goudotianus</i> Hojas	GEGC	
	T _m [°C]					Conc. [μM]	T _m [°C]
0.00	50.71	48.37	50.73	49.40	49.40	0.00	50.71
0.05	50.66	49.19	50.73	49.41	49.40	10.0	50.68
0.10	50.68	49.12	50.67	49.39	49.38	25.0	50.68
0.25	50.52	49.12	50.69	49.46	49.35	50.0	50.72
0.50	50.57	49.09	50.60	49.39	49.25	100	50.67
1.00	50.52	49.17	50.60	49.91	49.08	250	50.67

Concentración 0.00 mM corresponde a la T_m de vesículas de DMPE puro.

Tabla 5. Ancho a media altura del pico principal de transición ($\Delta T_{1/2}$) de DMPE puro y mezclas binarias DMPE/metabolitos vegetales obtenido a partir de los termogramas de DSC. Fuente: elaboración propia.

Conc. [mM]	Ácido cafeico	Ácido gálico	Crocina	<i>P. goudotianus</i> Corteza	<i>P. goudotianus</i> Hojas	GEGC	
	$\Delta T_{1/2}$ [°C]					Conc. [μ M]	$\Delta T_{1/2}$ [°C]
0.00	0.70	0.74	0.68	0.68	0.68	0.00	0.76
0.05	0.71	0.76	0.68	0.72	0.68	10.0	0.75
0.10	0.69	0.74	0.71	0.68	0.84	25.0	0.76
0.25	0.82	0.74	0.69	0.64	0.78	50.0	0.76
0.50	0.95	0.75	0.79	0.66	0.83	100	0.74
1.00	1.06	0.78	0.89	0.74	1.11	250	0.86

Concentración 0.00 mM corresponde a la T_m de vesículas de DMPE puro.

4.3. Estudios de espectroscopía de fluorescencia en vesículas de DMPC y membranas aisladas de eritrocitos humanos

Los experimentos de espectroscopía de fluorescencia con las sondas laurdan y DPH permitieron evaluar la influencia de los MVs sobre el comportamiento dinámico de vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC y membranas aisladas de eritrocitos humanos sin sellar (IUM). La Fig. 20 muestra el efecto de los MVs en las mediciones de polarización generalizada (PG) de laurdan en LUV de DMPC a 18 °C y 37 °C.

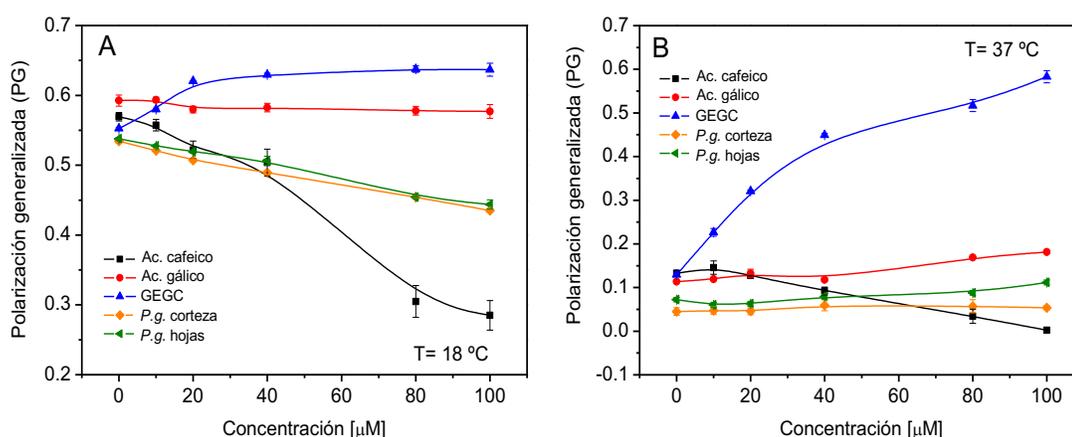


Fig. 20. Medidas de polarización generalizada (PG) de laurdan en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC a 18 °C y 37 °C tratadas con diferentes concentraciones de ácido cafeico, ácido gálico, galato de epigalocatequina (GEGC), corteza y hojas de *P. goudotianus*. ANOVA de una vía y prueba de Dunnett fueron usadas para el análisis estadístico (apéndice 2). Fuente: elaboración propia.

La cuantificación del cambio espectral de fluorescencia de laurdan a través de la polarización generalizada proporciona información sobre la dinámica molecular a nivel del esqueleto de glicerol del fosfolípido⁸¹. La Fig. 20A muestra que a 18 °C, con excepción de ácido gálico (curva roja), todos los MVs causaron evidentes alteraciones en los valores de PG de laurdan. Los cambios en la PG están relacionados con el grado de penetración de agua en la parte hidrofílica de la membrana, lo que produce variaciones en la relajación dipolar de laurdan y el consecuente cambio en su espectro de emisión¹⁰⁶. Los extractos de *P. goudotianus* (hojas y corteza) y particularmente ácido cafeico mostraron una marcada disminución en los valores de PG, alcanzando a 100 μM una variación (ΔPG) respecto al control (0 μM) de 0.09, 0.09 y 0.28 respectivamente. Este resultado indica un aumento en la fluidez del entorno hidrofílico de la membrana. Por otro lado, GEGC (curva azul) provocó un ligero aumento en la PG hasta una concentración de 20 μM ($\Delta\text{PG}= 0.07$), sin cambios significativos en el resto de las concentraciones. La Fig. 20B muestra la influencia de los MVs en el cambio espectral de laurdan a 37 °C. GEGC causó un sostenido aumento en la rigidez de DMPC evidenciado por el incremento en los valores de la PG, los que a 100 μM mostraron una variación $\Delta\text{PG}= 0.45$. En la Fig. 20B también se puede observar que a 37 °C, ácido cafeico indujo una menor disminución en los valores de PG ($\Delta\text{PG}= 0.13$ a 100 μM) respecto a los registrados a 18 °C. Por otro lado, ácido gálico mostró un suave aumento en la rigidez de las LUV de DMPC a partir de 80 μM .

La Fig. 21 exhibe los resultados de las mediciones de anisotropía (r) de DPH en LUV de DMPC a 18 °C y 37 °C en presencia de los MVs. DPH es una molécula hidrófoba que penetra profundamente en el interior de la membrana, orientándose paralela al eje de las cadenas acílicas de los fosfolípidos en la bicapa. En esta ubicación, el movimiento de rotación del fluoróforo queda influenciado por la dinámica de las cadenas acílicas del lípido¹⁰⁷. Cualquier molécula que restrinja los movimientos de las cadenas hidrocarbonadas producirá una mayor rigidez de la parte hidrófoba de la membrana aumentando la anisotropía de DPH. Por otro lado, las interacciones que resulten en una mayor fluidez de la membrana producirán una disminución en los valores de anisotropía del fluoróforo⁷⁹.

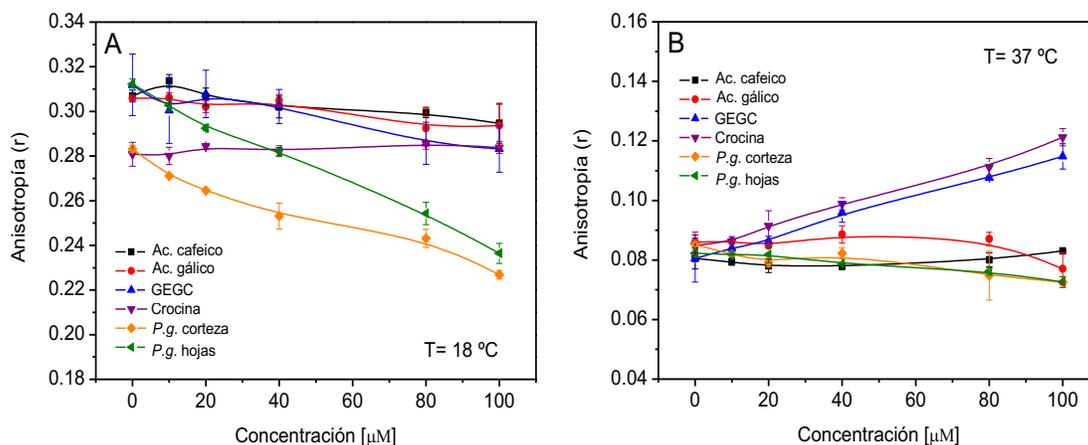


Fig. 21. Medidas de anisotropía (r) de DPH en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC a 18 °C y 37 °C tratadas con diferentes concentraciones de ácido cafeico, ácido gálico, galato de epigallocatequina (GEGC), crocina, corteza y hojas de *P. goudotianus*. ANOVA de una vía y prueba de Dunnett fueron usadas para el análisis estadístico (apéndice 2). Fuente: elaboración propia.

Como puede observarse en la Fig. 21A, los extractos de *P. goudotianus* indujeron los más importantes cambios en las mediciones de anisotropía de DPH a 18 °C. El aumento de la concentración del extracto de corteza y particularmente del de hojas causó una disminución linealmente dependiente en los valores de anisotropía, alcanzado a 100 μM una variación (Δr) de 0.06 y 0.08, respectivamente; resultado que indica un significativo aumento en la fluidez de la zona hidrófoba de las LUV de DMPC. A 37 °C (Fig. 21B) los extractos de *P. goudotianus* causaron un efecto más moderado en la fluidez de la membrana, disminuyendo el valor de anisotropía de DPH en 0.01 unidades a 100 μM . En la Fig. 21B también se evidencia que GEGC y crocina indujeron un significativo incremento en los valores de DPH, registrando variaciones del parámetro Δr de 0.03 y 0.04, respectivamente a 100 μM . Este hecho implica que la presencia de estos metabolitos produjo una mayor restricción en el movimiento de las cadenas acílicas de DMPC y una menor fluidez de la membrana.

La Fig. 22 presenta los resultados de las mediciones de PG de lauridan y anisotropía de DPH en membranas aisladas de eritrocitos humanos sin sellar (IUM) a 37 °C en presencia de los MVs. La membrana del eritrocito humano representa un modelo ideal para el estudio de las interacciones de compuestos de interés biológico con células humanas y es ampliamente usada para determinar la dinámica de la membrana plasmática ⁷¹.

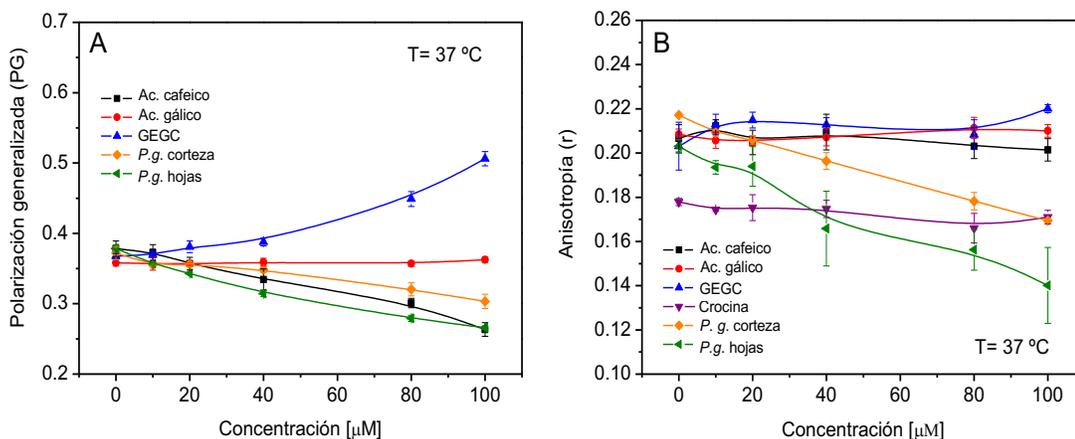


Fig. 22. Medidas de polarización generalizada (PG) de lauridan y anisotropía (r) de DPH en membranas de eritrocitos sin sellar (IUM) a 37 °C, tratadas con diferentes concentraciones de ácido cafeico, ácido gálico, galato de epigalocatequina (GEGC), crocina, corteza y hojas de *P. goudotianus*. ANOVA de una vía y prueba de Dunnett fueron usadas para el análisis estadístico (apéndice 2). Fuente: elaboración propia.

Como puede observarse en la Fig. 22A, GEGC provocó un marcado aumento en los valores de PG de lauridan, mostrando una variación en el parámetro ΔPG de 0.14 a 100 μM . Por el contrario, ácido cafeico y los extractos de hojas y corteza de *P. goudotianus* provocaron una disminución lineal de la PG, alcanzando a 100 μM valores de ΔPG de 0.12, 0.11 y 0.07, respectivamente. La disminución en los valores de PG indica que estos metabolitos causaron un aumento en la cantidad de moléculas de agua en el segmento hidrofílico de la membrana de las RBC y un consecuente aumento en su fluidez. Por otro lado, en la Fig. 22B se aprecia que los extractos de hojas y corteza de *P. goudotianus* produjeron una considerable disminución en los valores de DPH ($\Delta r = 0.05$ y 0.06 , respectivamente a 100 μM) en las IUM. Esto demuestra que los componentes presentes en ambos extractos penetran profundamente en el entorno hidrofóbico de la bicapa, alterando la dinámica de las cadenas acílicas de los fosfolípidos presentes en la membrana del eritrocito humano.

4.4. Estudios de espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR) en vesículas de DMPC y membranas de eritrocitos humanos

La Fig. 23 muestra las mediciones de EPR en LUV de DMPC e IUM en presencia de crocina a 18 °C y 37 °C utilizando las sondas paramagnéticas TEMPO y 5-SASL.

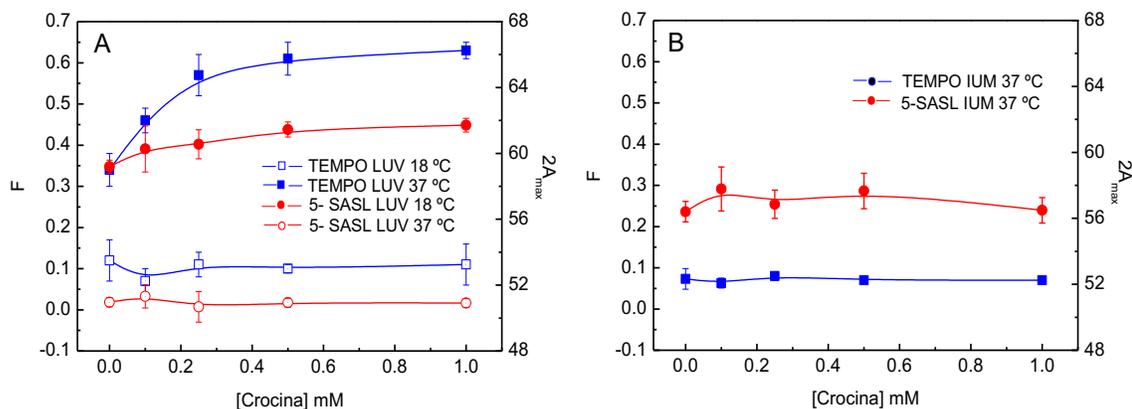


Fig. 23. Medidas de los parámetros espectroscópicos F y 2A_{max} obtenidos por EPR usando las sondas TEMPO y 5-SASL en LUV de DMPC e IUM tratadas con diferentes concentraciones de crocina. ANOVA de una vía y prueba de Dunnett fueron usadas para el análisis estadístico (apéndice 2). Fuente: elaboración propia.

La sonda TEMPO se reparte entre la parte hidrofóbica de la membrana y el ambiente acuoso, mientras que 5-SASL localiza su grupo nitroxilo (NO^{*}) en el entorno hidrófobo cercano a la región polar de la membrana^{86,98}. De los espectros EPR de TEMPO se obtiene el parámetro de partición espectroscópico F, que refleja la partición de la sonda entre la membrana y el medio acuoso⁸⁶. Por otro lado, el parámetro 2A_{max} obtenido de 5-SASL, está relacionado con el orden y velocidad de movimiento de las cadenas acílicas de los fosfolípidos⁹⁹. En la Fig. 23A se observa que crocina causó un marcado aumento en el parámetro F de TEMPO en las LUV de DMPC a 37 °C, sin mostrar cambios a 18 °C. A 37 °C DMPC se encuentra en estado líquido cristalino, lo que corresponde a una fase mucho más desordenada respecto a la fase gel, en la que se encuentra el lípido a 18 °C. Este resultado indica que crocina indujo un significativo aumento en la cantidad de agua que ingresó al entorno polar de la membrana. Por otra parte, los resultados de las mediciones obtenidas con la sonda 5-SASL, muestran un ligero aumento del parámetro espectroscópico 2A_{max} ($\Delta 2A_{max} = 2.52$) en las LUV de DMPC a 18 °C. Un hallazgo que sugiere que la presencia de crocina causó una mayor restricción en el movimiento de las cadenas acílicas en la región de la membrana adyacente a los grupos polares de DMPC. Como puede observarse en la Fig. 23B, no se evidenciaron efectos de crocina sobre los valores de F y 2A_{max} en las IUM a 37 °C, indicando escasa interacción de este carotenoide con la membrana de las RBC.

4.5. Observaciones de microscopía electrónica de barrido (SEM) en eritrocitos humanos

Las Figs. 24-29 presentan la interacción y efecto protector contra HClO de los MVs en eritrocitos humanos.

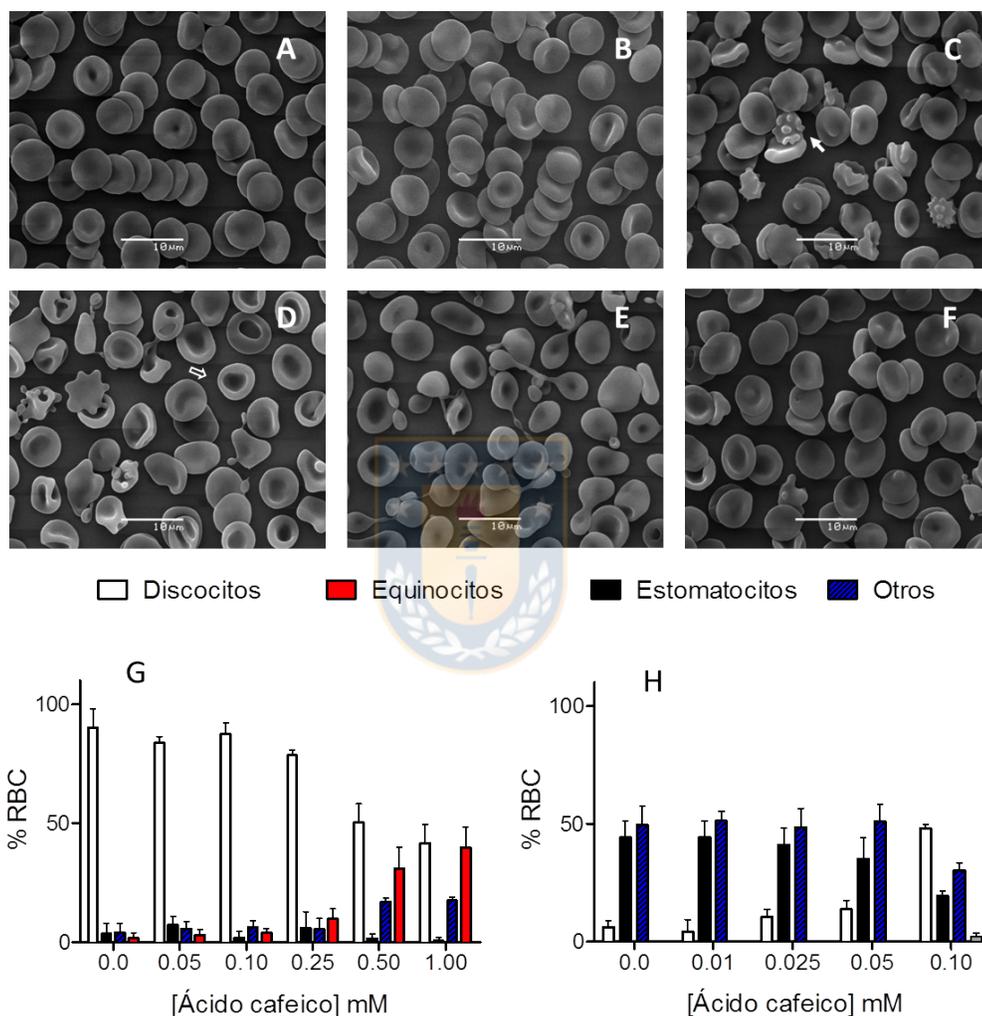


Fig. 24. Interacción y efecto protector de ácido cafeico (AC) sobre la morfología de eritrocitos humanos. Imágenes de SEM de eritrocitos (A) sin tratamiento (control); incubados con (B) 0.1 mM AC; (C) 1.0 mM AC; (D) 0.05 mM HClO; (E) 0.05 mM AC y 0.05 mM HClO y (F) 0.1 mM AC y 0.05 mM HClO. Porcentaje de diferentes morfologías de eritrocitos (RBC); (G) interacción y (H) efecto protector de AC. Las flechas apuntan a un equinocito (sólida) y a un estomatocito (vacía) seleccionado. Las barras representan la media \pm desviación estándar. Fuente: elaboración propia.

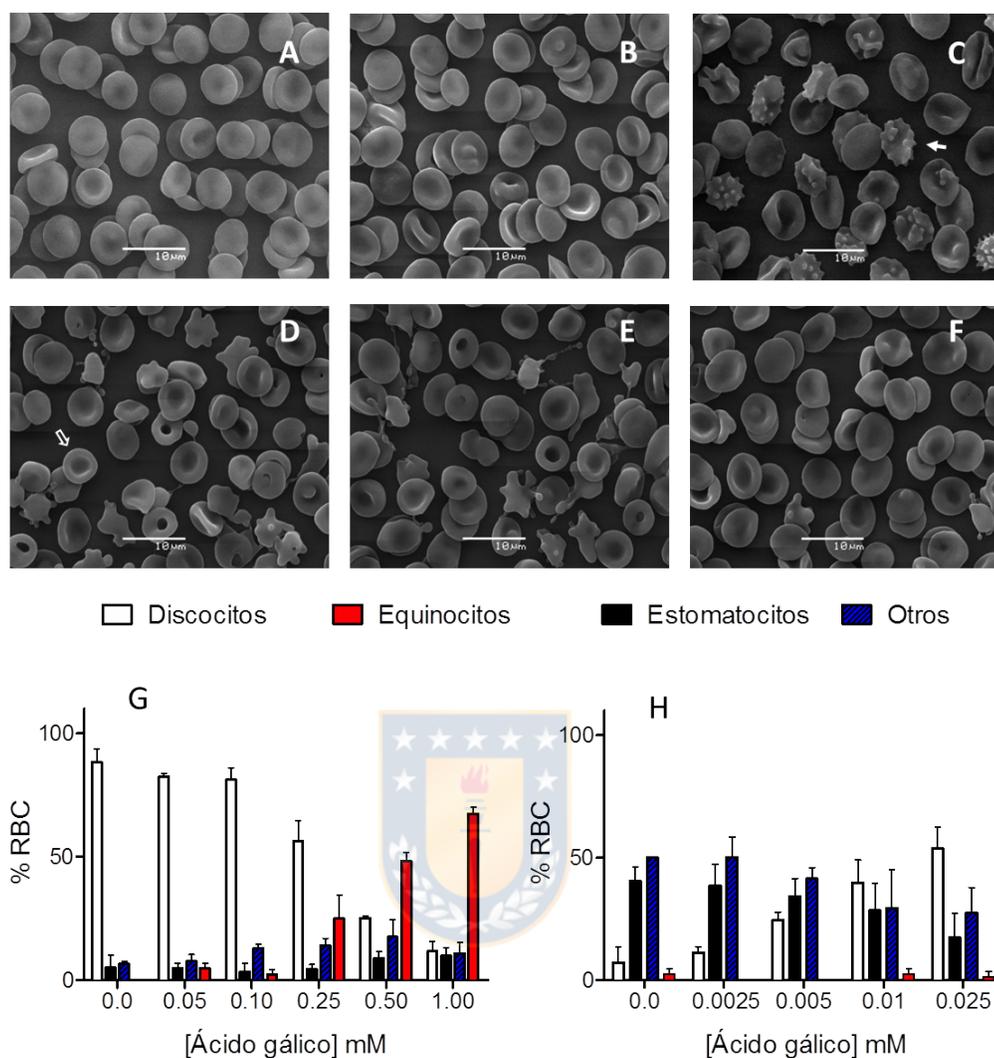


Fig. 25. Interacción y efecto protector de ácido gálico (AG) sobre la morfología de eritrocitos humanos. Imágenes de SEM de eritrocitos (A) sin tratamiento (control); incubados con (B) 0.05 mM AG; (C) 1.0 mM AG; (D) 0.05 mM HClO; (E) 0.01 mM AG y 0.05 mM HClO y (F) 0.025 mM AG y 0.05 mM HClO. Porcentaje de diferentes morfologías de eritrocitos humanos (RBC); (G) interacción y (H) efecto protector de AG. Las flechas apuntan a un equinocito (sólida) y a un estomatocito (vacía) seleccionado. Las barras representan la media \pm desviación estándar. Fuente: elaboración propia.

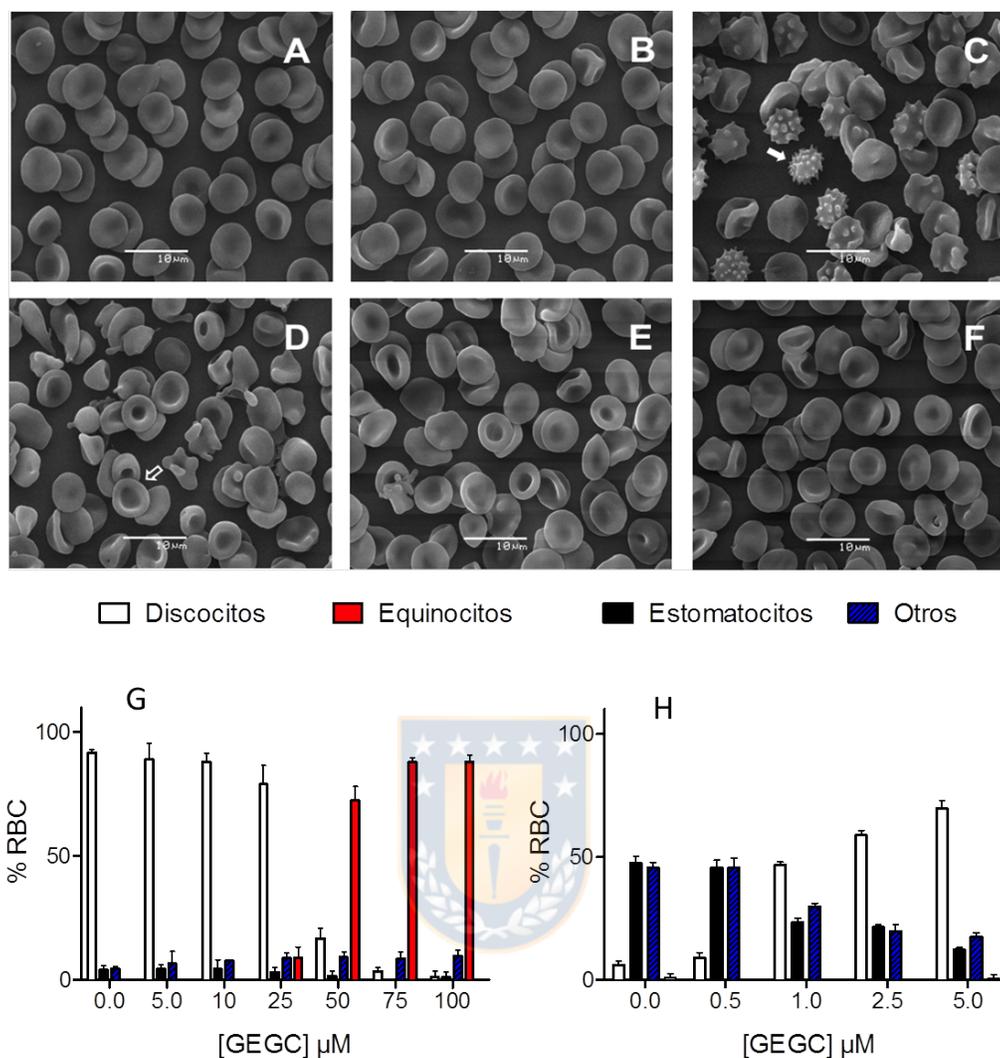


Fig. 26. Interacción y efecto protector de galato de epigallocatequina (GEGC) sobre la morfología de eritrocitos humanos. Imágenes de SEM de eritrocitos (A) sin tratamiento (control); incubados con (B) 10 μM GEGC; (C) 50 μM GEGC; (D) 50 μM HClO; (E) 2.5 μM GEGC y 50 μM HClO y (F) 5.0 μM GEGC y 50 μM HClO. Porcentaje de diferentes morfologías de eritrocitos humanos (RBC); (G) interacción y (H) efecto protector de GEGC. Las flechas apuntan a un equinocito (sólida) y a un estomatocito (vacía) seleccionado. Las barras representan la media \pm desviación estándar. Fuente: elaboración propia.

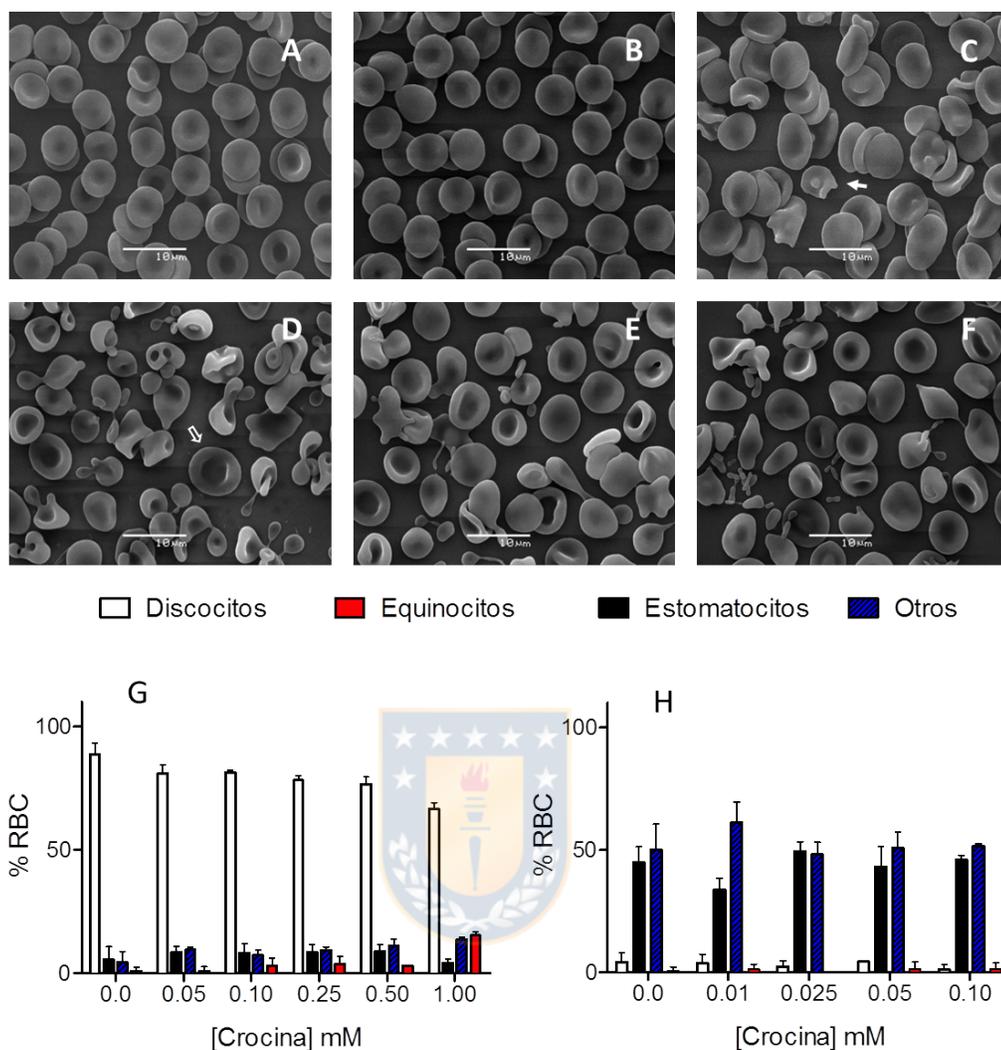


Fig. 27. Interacción y efecto protector de crocina (CRO) sobre la morfología de eritrocitos humanos. Imágenes de SEM de eritrocitos (A) sin tratamiento (control); incubados con (B) 0.1 mM CRO; (C) 1.0 mM CRO; (D) 0.05 mM HClO; (E) 0.05 mM CRO y 0.05 mM HClO y (F) 0.1 mM CRO y 0.05 mM HClO. Porcentaje de diferentes morfologías de eritrocitos humanos (RBC); (G) interacción y (H) efecto protector de CRO. Las flechas apuntan a un equinocito (sólida) y a un estomatocito (vacía) seleccionado. Las barras representan la media \pm desviación estándar. Fuente: elaboración propia.

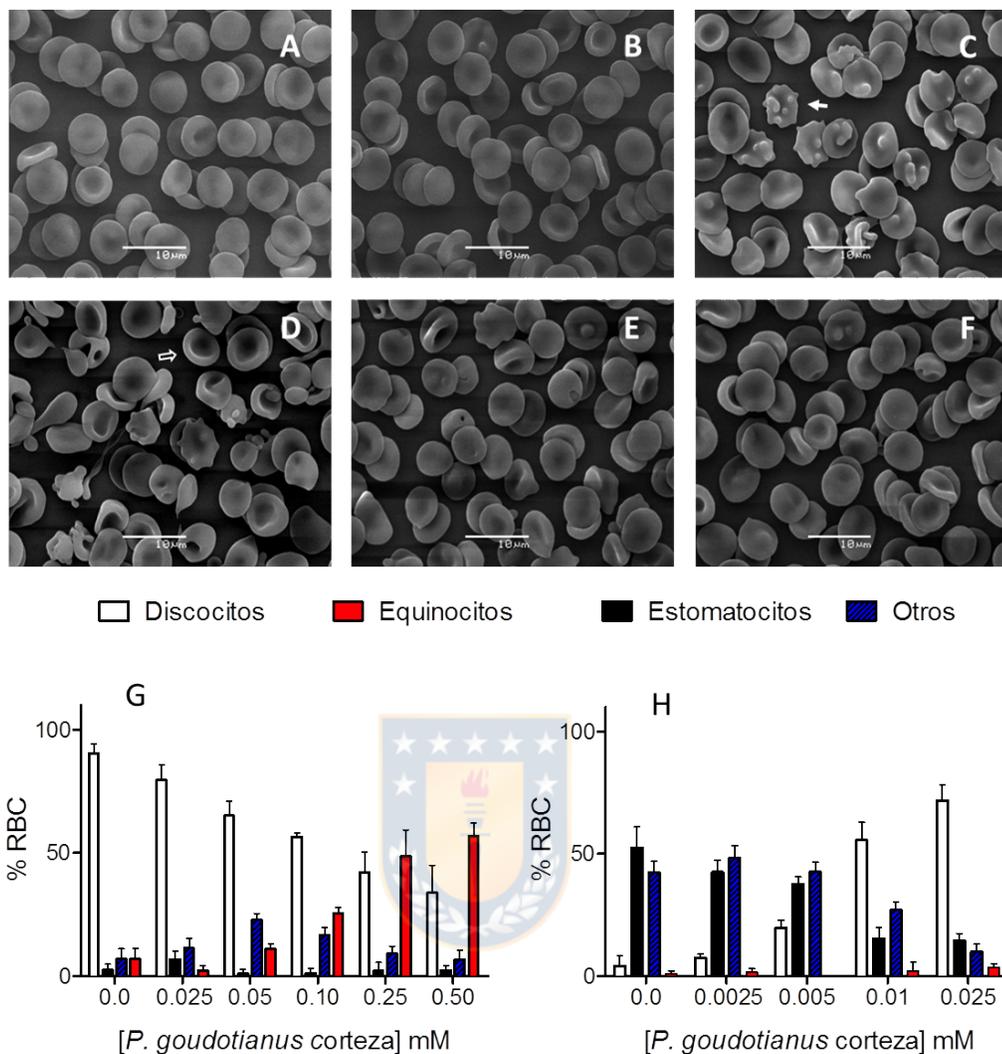


Fig. 28. Interacción y efecto protector del extracto de la corteza de *Pilocarpus goudotianus* (*P. corteza*) sobre la morfología de eritrocitos humanos. Imágenes de SEM de eritrocitos (A) sin tratamiento (control); incubados con (B) 0.025 mM *P. corteza*; (C) 0.5 mM *P. corteza*; (D) 0.05 mM HClO; (E) 0.01 mM *P. corteza* y 0.05 mM HClO y (F) 0.025 mM *P. corteza* y 0.05 mM HClO. Porcentaje de diferentes morfologías de eritrocitos humanos (RBC); (G) interacción y (H) efecto protector de *P. corteza*. Las flechas apuntan a un equinocito (sólida) y a un estomatocito (vacía) seleccionado. Las barras representan la media \pm desviación estándar. Fuente: elaboración propia.

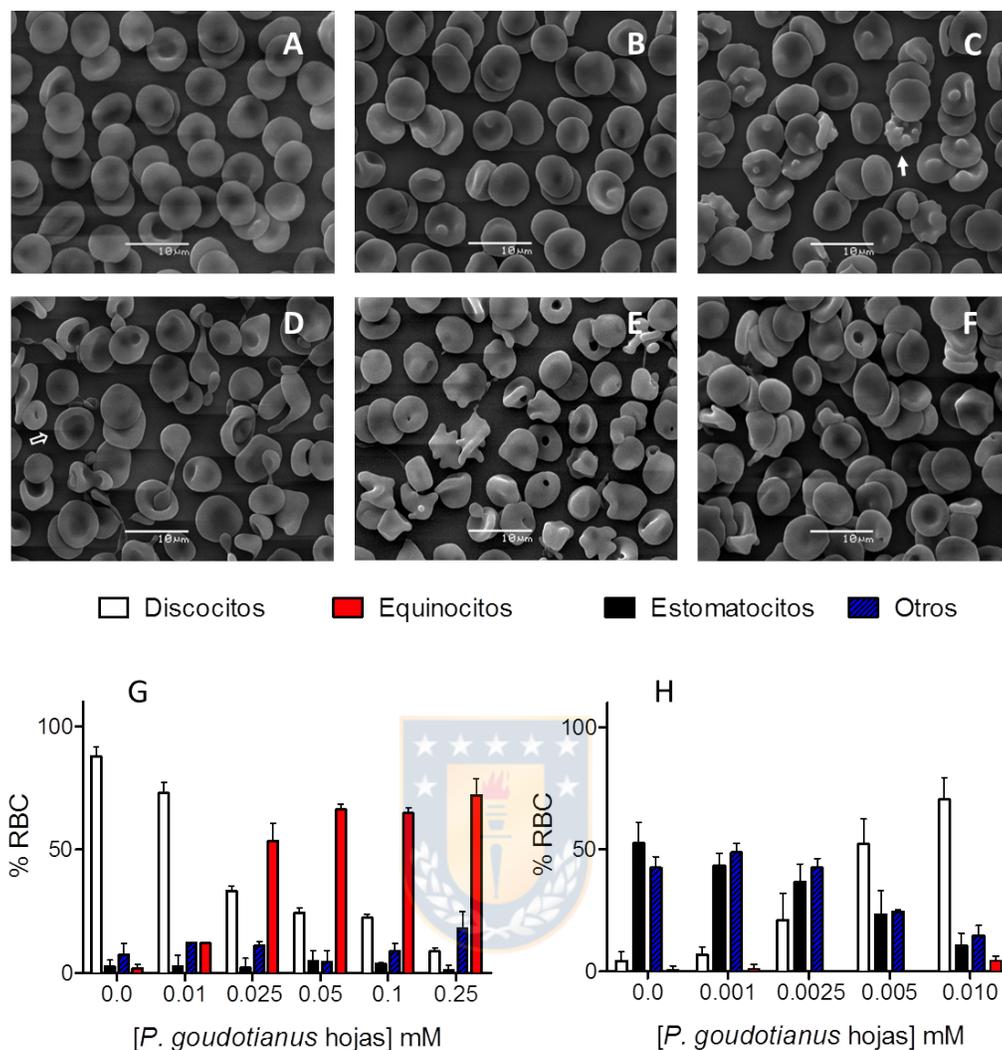


Fig. 29. Interacción y efecto protector del extracto de las hojas de *Pilocarpus goudotianus* (*P. hojas*) sobre la morfología de eritrocitos humanos. Imágenes de SEM de eritrocitos (A) sin tratamiento (control); incubados con (B) 0.01 mM *P. hojas*; (C) 0.25 mM *P. hojas*; (D) 0.05 mM HClO; (E) 0.005 mM *P. hojas* y 0.05 mM HClO y (F) 0.01 mM *P. hojas* y 0.05 mM HClO. Porcentaje de diferentes morfologías de eritrocitos humanos (RBC); (G) interacción y (H) efecto protector de *P. hojas*. Las flechas apuntan a un equinocito (sólida) y a un estomatocito (vacía) seleccionado. Las barras representan la media \pm desviación estándar. Fuente: elaboración propia.

Como se muestra en las Figs. 24A-29A, eritrocitos humanos incubados con PBS pH 7.4 (control) muestran una morfología discoidea-bicóncava característica de eritrocitos normales o discocitos¹⁰⁸. En las Figs. 24C-29C se puede observar que todos los MVs indujeron alteraciones en la forma de los eritrocitos, cambiando su morfología

normal a equinocitos (células caracterizadas por la presencia de espículas), efecto que fue marcadamente dependiente de la concentración del metabolito. De hecho, GEGC a 100 μM y el extracto de las hojas de *P. goudotianus* a 0.250 mM mostraron los efectos morfológicos más agudos en los RBC, causando la transformación del 87 % y 72 %, respectivamente de los glóbulos rojos a equinocitos. El resto de los MVs siguió el orden: extracto de corteza de *P. goudotianus* (0.50 mM, 57 %), ácido gálico (1.0 mM, 68 %), ácido cafeico (1.0 mM, 40 %) y crocina (1.0 mM, 16 %). Por otro lado, las Figs. 24D-29D muestran que la incubación de los RBC con 0.05 mM de HClO causó severos cambios morfológicos, transformando cerca del 95 % de las células, principalmente a la forma de estomatocito (células caracterizadas por presentar profundas invaginaciones en su interior). Sin embargo, con excepción de crocina, la pre-incubación de los eritrocitos con los MVs produjo una evidente disminución de las alteraciones morfológicas causadas por 0.05 mM de HClO, en una manera dependiente de la concentración de los metabolitos. GEGC (Figs. 26F y 26H) y el extracto de hojas de *P. goudotianus* (Figs. 29F y 29H) mostraron la más resaltante capacidad protectora, disminuyendo las alteraciones morfológicas causadas por HClO a 25 % y 28 % a las concentraciones de 5 μM y 10 μM respectivamente. Además, las alteraciones inducidas por HClO en los RBC fueron también significativamente reducidas por el extracto de la corteza de *P. goudotianus* (29 %, Fig. 28H) y ácido gálico (46 %, Fig. 25H) a la concentración de 0.025 mM. Ácido cafeico (Fig. 24H) presentó el menor efecto protector, disminuyendo las alteraciones morfológicas en las RBC a 49 % a 0.1 mM, mientras que crocina no mostró protección de los RBC en las concentraciones ensayadas. Las Figs. 24G-29G muestran el porcentaje de diferentes morfologías de una población de eritrocitos humanos incubadas con los MVs, y las Fig. 24H-29H exhiben la capacidad protectora de los MVs contra las alteraciones morfológicas causadas por HClO.

4.6. Ensayos de hemólisis en eritrocitos humanos

La Fig. 30 exhibe la capacidad protectora de los MVs ante la lisis inducida por 0.5 mM de HClO en eritrocitos humanos.

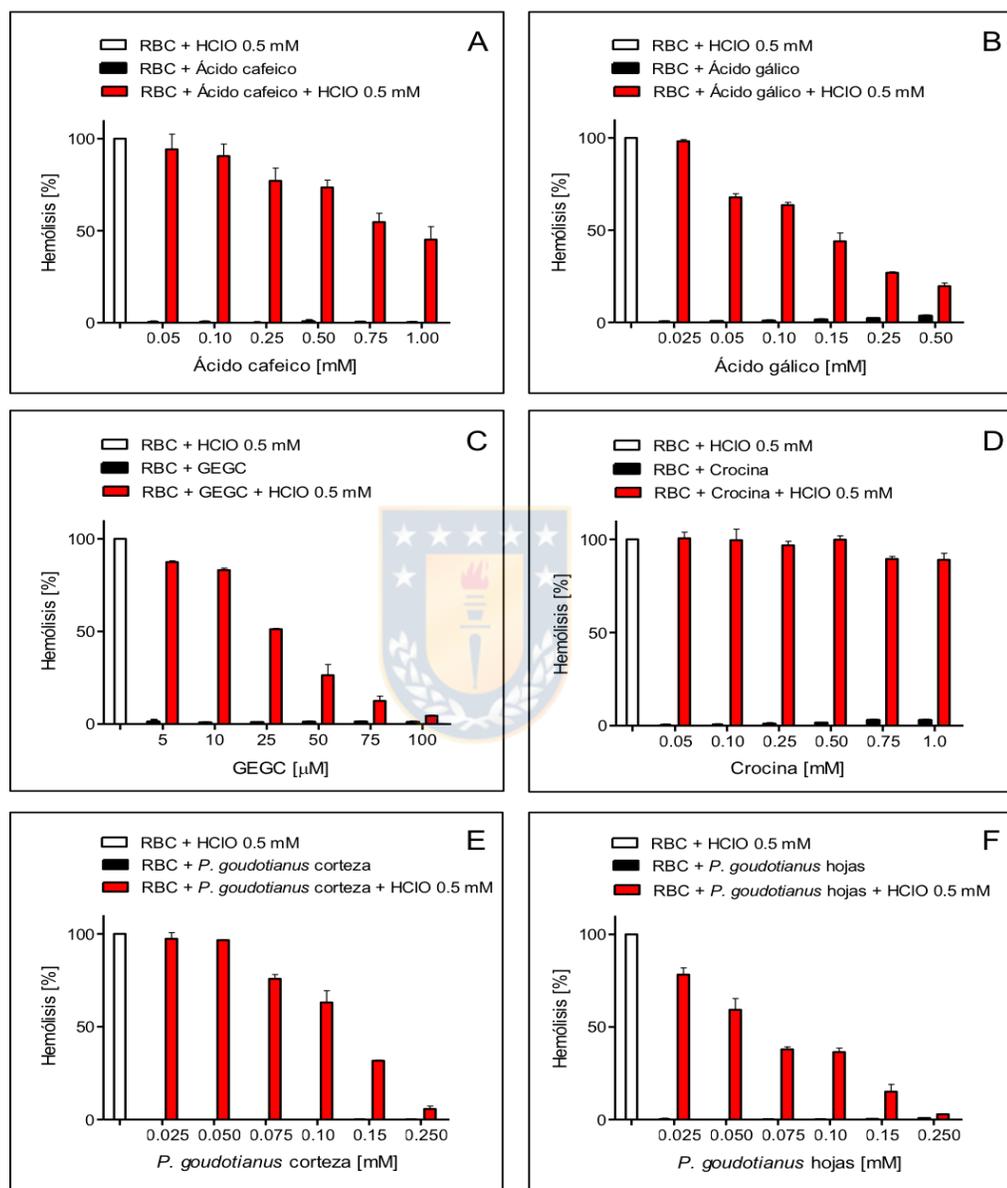


Fig. 30. Porcentaje de hemólisis de eritrocitos humanos (RBC) incubados con 0.5 mM de HClO y diferentes concentraciones de (A) ácido cafeico, (B) ácido gálico, (C) galato de epigalocatequina (GEGC), (D) crocina, extractos de (E) corteza y (F) hojas de *Pilocarpus goudotianus*. Fuente: elaboración propia.

En la Fig. 30 puede observarse que los MVs dentro del rango de concentraciones ensayadas no inducen hemólisis en los eritrocitos humanos (barras negras). Sin embargo, con excepción de crocina que no evidenció efectos antihemolíticos significativos, los MVs mostraron una progresiva disminución de la lisis inducida por HClO 0.5 mM en los RBC (barras rojas). Estos resultados demuestran la capacidad de los compuestos vegetales de proteger los eritrocitos humanos de la lisis causada por HClO. La concentración inhibitoria media de la hemólisis (CI 50) presentada en la Tabla 6, muestra que GEGC y el extracto de las hojas de *P. goudotianus* presentaron la mayor protección contra HClO, con una CI 50 de 0.03 mM y 0.07 mM, respectivamente. La CI 50 indica la concentración del metabolito que logra reducir al 50 % la lisis de HClO en las células rojas¹⁰⁹. El extracto de la corteza de *P. goudotianus* (CI 50 = 0.12) y ácido gálico (CI 50 = 0.13) mostraron un similar comportamiento inhibitorio; mientras que el ácido cafeico a la concentración más alta ensayada (1.0 mM) logró disminuir la hemólisis de HClO a 42 % con una CI 50 de 0.87 mM.

Tabla 6. Concentración inhibitoria media de la hemólisis causada por HClO en eritrocitos humanos (CI 50) para cada uno de los metabolitos vegetales. Fuente: elaboración propia.

Metabolito vegetal	CI 50 [mM]
Ácido cafeico	0.87
Ácido gálico	0.13
GEGC	0.03
Crocina	-
Corteza de <i>P. goudotianus</i>	0.12
Hojas de <i>P. goudotianus</i>	0.07

GEGC, galato de epigalocatequina

4.7. Contenido e identificación de compuestos fenólicos en el extracto de hojas y corteza de *Pilocarpus goudotianus*

El contenido total de compuestos fenólicos en los extractos acuosos de hojas y corteza de la planta *Pilocarpus goudotianus* es mostrado en la Tabla 7.

Tabla 7. Contenido total de polifenoles expresado como equivalentes de ácido gálico (EAG) en los extractos de *P. goudotianus*. Fuente: elaboración propia.

Extracto	mg EAG/g de extracto seco
Hojas	101.4
Corteza	129.6

La Tabla 8 contiene las señales m/z precursoras y las fragmentaciones obtenidas en polaridad positiva y negativa para los 29 picos cromatográficos detectados en el extracto acuoso de la corteza de *P. goudotianus*. Las identificaciones tentativas se basaron en: (1) correlación entre ambas polaridades (aunque, hubo compuestos observados solo en un modo de ionización) y presencia de aductos, y (2) comparación de la fragmentación experimental con la bibliografía disponible y bases de datos de fragmentación. Los compuestos observados en ambas polaridades se marcaron como M+H o M-H. Se detectaron aductos de sodio, formas diméricas u otros aductos que en algunos casos fueron útiles para confirmar una identificación (datos no incluidos en la tabla). Basado en la identificación, los compuestos detectados en el extracto de la corteza de *P. goudotianus* son principalmente flavonoides y ácido fenólicos; de este último grupo se puede distinguir la presencia de los ácidos galoilquínico (pico 1), digaloilquínico (picos 3 y 5) y cafeoilquínico (pico 6). Entre los flavonoides se destaca la presencia de las catequinas, epicatequina (Pico 8) y galato de epicatequina (pico 12), así como los glucósidos, apigenina-di-C-hexósido (pico 10), patuletina-O-hexósido (pico 21) y floretina-C-dihexósido (pico 22). El pico 2 mostró en polaridad negativa la señal m/z 655, que aunque no se identificó en la literatura su fragmentación en m/z 493 y m/z 331 indicaría la pérdida sucesiva de dos unidades de 162 Da. Además, la observación de los fragmentos de baja intensidad m/z 271 y m/z 313 sugieren que el compuesto podría corresponder a galoil-O-triglicosido. El pico 15 se asignó como dimetoxiquercetina-O-pentósido, aunque no hubo bibliografía para su comparación; los fragmentos de baja intensidad m/z 331, m/z 315, m/z 275 y m/z 284 sugirieron la presencia de dimetoxiquercetina. El pico 24 fue asignado como (iso)pentil-O-trihexósido basado en los fragmentos m/z 411 y m/z 249, y en la fragmentación de m/z

411, identificado como (iso)pentil-O-dihexósido¹¹⁰, así como por la pérdida de 162 Da característica de los hexósidos. Sin embargo, no se encontró literatura para su comparación. Algunos picos no fueron identificados.

Tabla 8. Compuestos identificados en el extracto acuoso de la corteza de *P. goudotianus*. Fuente: elaboración propia.

Polaridad positiva										
Pico	tr [min]	M+H [m/z]	Fragmentos MS ^e [m/z]					Identificación	Ref.	
9	12.0	372	210	192					Ácido cafeoil hidroxicitrico	111
10	14.7	595	577	457	559	529	475	541	Apigenina-di-C-hexósido	112
15	18.0	463	331	335	275	445	315		Dimetoxiquercetina-O-pentosido	
Polaridad negativa										
Pico	tr [min]	M+H [m/z]	Fragmentos MS ^e [m/z]					Identificación	Ref.	
1	2.4	343	191	168	173	124	155		Ácido galoilquínico	113
2	2.8	655	493	331	595	433	271	373	Galoil-O-triglucosido	
3	3.3	495	343	325	168	477	192	475	Ácido digaloilquínico	113,114
5	5.3	495	343	325	169	193			Ácido digaloilquínico (II)	113,114
		305	221	179	219	261	165	125	Epigalocatequina	115,116
6	6.4	354	192						Ácido cafeoilquínico	117,118
8	10.8	289	245	205	178	271	203	124	Epicatequina	119,120
10	14.7	594	473	503	353	383	575		Apigenina-di-C-hexósido	121,122
12	15.7	475	313						Platifilosido	123
		448	289	168	331	271	193	397	Epicatequina-O-galato	120,124
17	19.2	596	287	441					Eriodictiol-O-rutinosido	110,125
20	21.8	552	389	536	374				Dihidroxil-cafeoil matairesinol	126
21	25.1	639	331	475	316				Patuletina-O-hexósido	127
		583	421						Lamiridosina-di-O-hexósido	128
22	26.7	598	477	357	3871	460	579		Floretina-C-dihexósido	110,117
24	28.5	574	411	249					Isopentil-O-trihexósido	
28	32.0	610	301						Hesperetina-O-rutinósido	110,129

La tabla 9 exhibe las señales m/z y fragmentaciones de los 38 picos detectados en el extracto acuoso de las hojas de *P. goudotianus*. Se identificaron los ácidos

fenólicos, galoilquínico (pico 1), digaloilquínico (pico 4), cumaroilquínico (pico 6), cumaroilhexarico (pico 7) y cafeico (pico 12). Por otro lado, se detectó una abundante presencia de flavonoides-O-glucósidos, entre los que se distinguen miricetina-O-galoilhexósido (pico 13), apigenina-di-C-hexósido (pico 14), quercetina-O-galoilhexósido (pico 19), siringetina-O-hexósido, pseudobaptigenina-O-hexósido (pico 23), espinacetina-O-gentiobiosido y patuletina-O-rutinosido (pico 25), kaemferol-O-rutinosido (pico 26) y tricina-O-hexósido (pico 34). Algunas identificaciones se repiten, lo que se explica debido a la aparición de isómeros como el ácido cafeoil hidroxycítrico (picos 5 y 14), miricetina-O-ramnosil hexósido (picos 13, 18 y 19), isoramnetina-O-rutinosido (picos 25, 27 y 30), ácido hexárico (picos 5 y 9), digaloilpentosa (picos 9 y 12) y patuletina-O-gentiobiósido (picos 22 y 23). Los picos 29, 32 y 36 mostraron la presencia de biflavonas de tipo biapigenina. El pico 37 se identificó como una pentahidroxi-metoxi flavona que probablemente correspondería a patuletina¹³⁰. Se observó coelución para algunos picos, lo que se debería a la complejidad del extracto. Otros picos no fueron identificados.

Tabla 9. Compuestos identificados en el extracto acuoso de las hojas de *P. goudotianus*. Fuente: elaboración propia.

Polaridad positiva									
Pico	tr [min]	M+H [m/z]		Fragmentos MS ² [m/z]				Identificación	Ref.
5	5.4	371	209					Ácido cafeoil hidroxycitrico	111
12	12.0	181	163	135	97	95	121	Ácido cafeico	117
14	14.7	596	577	457	559	529	475	Apigenina-di-C-hexósido	112,131
		372	210	192				Ácido cafeoilhidroxycitrico	111
19	18.6	687	525					Nuzhenida	132
		627	319	481	465	581		Miricetina-O-ramnosil hexósido	133
23	21.4	448	285	309	329			Dihidroxi-methoxi isoflavona-O-hexósido	134,135
		446	283	327	185			Pseudobaptigenina-O-hexósido	134,136
25	26.4	672	509	347				Espinacetina-O-gentiobiosido	137
25	26.4	641	333	495	479	605	318	Patuletina-O-rutinósido	133

Tabla 9. (continuación)

Pico	tr [min]	M+H [m/z]	Fragmentos MS ² [m/z]				Identificación	Ref.		
27	30.8	626	479	317	462		Isoramnetina-O-rutinósido	133,138		
34	37.7	493	331				Tricina-O-hexósido	139,140		
35	38.5	509	347				Dimetoximiricetina-O-hexósido	141		
Polaridad negativa										
Pico	tr [min]	M-H [m/z]	Fragmentos MS ² [m/z]				Identificación	Ref.		
1	2.4	343	168	191	172	124	Ácido galoilquínico	114,124		
4	4.9	552	515	353	483	533	537	191	Ácido clorogénico	118
		495	343	325	457	459	439	193	Ácido digaloilquínico	113,114
5	5.5	483	271	313	331	211	169		Digaloilglucosa	142,143
		305	179	221	219	261	247	125	Epigallocatequina	115,116
		209	190	84	146	162			Ácido hexárico	110
6	5.9	337	162	172	190				Ácido cumaroilquínico	144,145
7	6.4	355	190	208	337				Ácido cumaroilhexárico	110,133
9	7.7	454	313	327	168	285	225	182	Digaloilpentosa	114
		209	190	84					Ácido hexárico	110
11	9.3	374	168	313	124	150	329	209	Acetil-galoil glucosa	120
12	11.8	452	313	169					Digaloilpentosa	114
		401	269	160	233	305	124		alcohol benzil hexosa	146
13	14.0	631	479	317					Miricetina-O-galoil hexósido	118,147
		623	597	317	427	289			Miricetina-O-ramnosil hexósido	148,149
14	14.5	594	473	353	503	383	515		Apigenina-di-C-hexósido	121,122
15	15.6	808	645						Epimedina B	150
		475	313						Platifilosido	123
17	16.9	480	317	271					Miricetina-O-hexósido	124,147
18	17.9	626	316	271	607	287	359	179	Miricetina-O-ramnosil hexósido	148
		477	313	433	459	168	162		Ácido hidroxicinámico-galoil hexósido	120
19	18.7	686	523						Nuzhenida	132
		616	463	301					Quercetina-O-galoil hexósido	118,147
21	20.0	646	479	316	493	299	610		Miricetina-galoilmetil hexósido	114

Tabla 9. (Continuación)

Pico	tr [min]	M-H [m/z]	Fragmentos MS ^e [m/z]						Identificación	Ref.
22	20.0	510	346	494	491	331			Siringetina-O-hexósido	151
	20.4	786	330	621	315	519	639	770	Digaloil-HHDP-hexósido	152,153
		656	347	331	640	303			Patuletina-O-gentiobiosido	153
23	20.9	656	346	331	640	637	303		Patuletina-O-gentiobiosido (II)	153
24	24.3	770	315	605	623	300	271	423	Isoramnetina glucosil-di-ramnosido	154
25	25.9	640	331	316	624	373			Patuletina-O-rutinosido	127
		624	315	459	300	271			Isoramnetina-O-rutinosido	110,155
26	26.9	594	285	255	327				Kaempferol-O-rutinosido	156
		493	331						Patuletina-O-hexósido	127
27	30.3	624	315	608	300	271	357	255	Isoramnetina-O-rutinosido	110,155
28	30.9	478	315	462	300	357	271		Isoramnetina-O-hexósido	128,157
29	31.9	610	301						Hesperetina-O-rutinosido	110,120
		537	375	520					Biapigenina	158,159
30	33.1	624	315	300	271	255			Isoramnetina-O-rutinosido	110,155
32	34.9	654	345	330	287	638	302		Dimetoxiquercetina-O-coumaroil hexósido	110,160
		644	493	331	481	316	345	507	Patuletina-O-galoil hexósido	127
		538	375						Biapigenina (II)	158,159
		504	371	160	464				Metoxiluteolina-C-acetil hexósido	118
		507	492	345	330				Dimetoximiricetina-O-hexósido	114,160
36	40.7	626	579	301					Quercetina-O-dihexósido	156
		538	375	493					Biapigenina (III)	158,159
37	43.1	331	316	209	272	181	165		Pentahidroxi-metoxi flavona	

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

Muchos metabolitos vegetales (MVs) obtenidos de la dieta son asociados con una amplia gama de resultados benéficos para la salud humana ¹⁶¹. Sin embargo, escasos estudios han sido dirigidos a evaluar el efecto de estos compuestos sobre las propiedades biofísicas de la membrana plasmática y su relación con el papel protector de estos metabolitos a nivel celular ^{7,15}. En el presente estudio se investigó las interacciones de cuatro metabolitos comerciales de origen vegetal y dos extractos de planta con eritrocitos humanos (RBC) y modelos moleculares de su membrana celular. La membrana del eritrocito aunque menos especializada que otras membranas celulares, mantiene suficientes funciones en común con aquellas, para ser considerada representativa de la membrana plasmática en general ¹⁵. Los MVs en estudio se eligieron por ser representativos de las principales familias de metabolitos vegetales: ácidos fenólicos (ácido gálico y cafeico), flavonoides (galato de epigallocatequina, GEGC) y carotenoides (crocina). La planta *Pilocarpus goudotianus* ^{162,163} se seleccionó basado en informes de los pobladores de la zona sur de la Sierra de San Luis (Falcón, Venezuela), que utilizan tradicionalmente la hoja y corteza de la planta por sus propiedades antioxidantes y plaguicidas.

Los estudios de difracción de rayos X realizados en multibicapas de los fosfolípidos DMPC y DMPE en fase gel demostraron que los MVs inducen profundas perturbaciones estructurales en DMPC, tanto a nivel de las cadenas acílicas como en la región de las cabezas polares. Sin embargo, no se observaron efectos en las multibicapas de DMPE. Ambos fosfolípidos difieren solo en el grupo amino terminal de su cabeza polar, que es $\cdot\text{NH}_3$ en DMPE y $\cdot\text{N}(\text{CH}_3)_3$ en DMPC. El menor tamaño y mayor carga efectiva del grupo amino de DMPE permite a sus moléculas formar una fuerte red de interacciones electrostáticas y enlaces de hidrogeno, lo que produce un arreglo mucho más compacto respecto al formado por DMPC ⁶². Este estrecho empaquetamiento de las moléculas de DMPE deja muy poco espacio entre sus bicapas;

por lo tanto, moléculas como el agua o los MVs prácticamente no afectan su estructura. Por otro lado, DMPC presenta grandes espacios entre sus bicapas debido al voluminoso grupo $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ y su imposibilidad de formar puentes de hidrogeno entre sus moléculas. En un ambiente acuoso estos espacios son ocupados por moléculas de agua, ensanchando aún más los espacios interbicapa. Este mecanismo también podría permitir a moléculas como las de los MVs ingresar en los espacios interlamelares de DMPC causando las perturbaciones estructurales observadas. De hecho, con excepción de crocina, los MVs causaron un dosis-dependiente debilitamiento en la intensidad de las reflexiones de DMPC, hasta prácticamente su completa desaparición a la concentración más alta ensayada. Esto indica que la estructura periódica del arreglo multilamellar de DMPC fue completamente perturbada. Resultados similares han sido reportados para otros compuestos de origen vegetal y extractos de plantas ^{164,165}. La débil interacción mostrada por crocina puede estar relacionada con el tamaño de esta molécula, lo que le dificultaría su ingreso en los espacios interbicapa de DPMC.

Los datos obtenidos por calorimetría diferencial de barrido (DSC) muestran que los MVs causaron un pronunciado efecto en el comportamiento termotrópico de DMPC sin causar cambios significativos en la transición de fase de DMPE. Un resultado que también puede ser explicado basado en el empaquetamiento más compacto de las moléculas de DMPE. Los perfiles calorimétricos de las mezclas DMPC/MVs muestran que la progresiva incorporación de los metabolitos causó una marcada alteración en la temperatura de pre-transición (T_p) del lípido, cambios que son asociados con distorsiones en el ordenamiento conformacional de las cabezas polares de las moléculas de lípido ^{166,167}. Esto indica que todos los MVs disminuyeron la estabilidad térmica del estado gel de DMPC ¹⁶⁸, probablemente debido a una fuerte interacción electrostática entre los metabolitos y los grupos polares del lípido. De hecho, solo fue posible registrar la T_p hasta 0.5 mM en la mayoría de los compuestos, mientras que GEGC causó su completa desaparición a la concentración más baja ensayada (10 μM), mostrando esta catequina los mayores efectos termotrópicos. Por otro lado, la disminución y ampliación del pico principal, junto con el descenso en la temperatura de transición, indican que GEGC, ácido cafeico, crocina y el extracto de hojas de *P.*

goudotianus causaron una significativa perturbación del proceso de fusión de DMPC. Las transiciones de fase en bicapas de fosfolípidos desde el estado gel al líquido cristalino están relacionadas con una disminución de las interacciones hidrófobas de van der Waals entre las cadenas acílicas de los lípidos^{169,170}. Un hecho que disminuye significativamente la cooperatividad de las moléculas del lípido durante el cambio de fase¹⁷¹. Por lo tanto, es posible suponer que las moléculas de estos metabolitos penetran en alguna medida en la región hidrófoba de la bicapa de DMPC, comportamiento que ya ha sido reportado de GEGC y ácido cafeico^{11,172}. La conclusión de que GEGC, ácido cafeico, crocina y el extracto de hojas de *P. goudotianus* perturban el ordenamiento molecular de DMPC, tanto en los grupos polares como en la región de las cadenas acílicas, es también respaldada por los resultados de difracción de rayos X.

La estructura de un compuesto determina en gran medida su modo de interacción con las membranas biológicas¹⁷³. Factores como polaridad, número y distribución de grupos hidroxilo y capacidad para formar puentes de hidrogeno pueden influir significativamente en los tipos de interacciones que se producen entre un metabolito y la bicapa lipídica¹⁷⁴. Muchos polifenoles muestran afinidad por la bicapa uniéndose a los grupos de cabeza polar de los lípidos cerca de la superficie (adsorción), o penetrando en la interfaz de la bicapa (absorción)^{28,175}. La capacidad de GEGC para afectar la estructura de los sistemas compuestos por DMPC, se debe principalmente a su habilidad para formar enlaces de hidrógeno con los grupos polares de este fosfolípido. La molécula de GEGC puede formar hasta 19 enlaces de hidrogeno (11 como aceptor y 8 como donante), el número más alto entre las catequinas presentes en el té verde¹⁰. Estudios comparativos muestran que la afinidad de GEGC por DMPC es 1000 veces mayor que la de epicatequina (EC) o epigallocatequina (EGC) (ambas sin el grupo galato), lo que demuestra que la presencia del grupo galato y el número de grupos OH, desempeñan un papel clave en las interacciones de GEGC con DMPC¹⁷⁶. Tomando en cuenta el coeficiente de partición octanol-agua de GEGC ($\log P_3 = 1.2$, PubChem, 2011), no se espera una marcada lipofilidad de esta catequina. Sin embargo, el carácter anfifílico de GEGC le podría permitir insertar la parte hidrófoba de su molécula entre las cadenas acílicas de DMPC, mientras que su grupo galato

interactuaría de manera preferencial con las cabezas polares del lípido ¹⁷⁷. Esta conclusión también es apoyada por los estudios de fluorescencia, los que muestran que GEGC redujo marcadamente la fluidez de la zona hidrofílica de vesículas de DMPC y membranas de eritrocitos, con moderados efectos en el núcleo hidrófobo de estos modelos de membrana.

Por otro lado, ácido cafeico (log P3 = 1.2, PubChem, 2010) con un coeficiente de partición semejante al de GEGC, posee un grupo carboxílico polar (pKa = 4.4, ¹⁷⁸) que le permitiría interactuar fuertemente con los grupos polares de DMPC vía enlaces de hidrógeno. Los datos obtenidos del cambio espectral de lauridan mostraron que ácido cafeico causó un marcado aumento de la fluidez en la zona polar de DMPC, principalmente en fase gel (18 °C). Este resultado implica que ácido cafeico provocó una desestabilización significativa de los grupos polares del fosfolípido, permitiendo un mayor ingreso de agua a la membrana ⁸¹. Este hecho disminuiría las fuerzas hidrófobas entre las cadenas acílicas de DMPC, facilitando las transiciones conformacionales *trans* a *gauche* características de la fase cristalina (L α) ^{179,180}, lo que explicaría el dramático cambio en el comportamiento termotrópico del lípido observado por DSC. Un efecto similar podría ser esperado de ácido gálico (pKa = 4.41 ¹⁸¹); sin embargo, los termogramas de DSC muestran escasa influencia de este metabolito en la transición de fase principal de DMPC. Un hallazgo consistente con los efectos observados en los experimentos de fluorescencia, donde ácido gálico mostró solo una ligera rigidización de la zona polar de DMPC sin causar alteraciones en su entorno hidrófobo. Estudios realizados por Salcedo et al. ¹⁸² demuestran que la presencia de ácido gálico disminuye el potencial dipolar de los grupos polares de DMPC, ocasionando cambios en el empaquetamiento del lípido y el potencial eléctrico de la membrana, lo que explicaría los resultados de difracción de rayos X obtenidos con este metabolito.

El análisis de los extractos acuosos obtenidos de las hojas y corteza de la planta *Pilocarpus goudotianus* mostró una amplia variedad de compuestos fenólicos, principalmente esteres derivados de ácidos fenólicos y flavonoides-O-glucósidos. En el extracto de la corteza se identificaron tentativamente 20 metabolitos, en su mayoría

esteres de ácido quínico, catequinas y formas glucosadas de los flavonoides patuletina y apigenina. Por otro lado, en el extracto de las hojas se encontró una mayor abundancia de polifenoles, permitiendo identificar 50 compuestos, de los que destaca la presencia de esterres de ácido quínico y formas glucosadas de miricetina, patuletina, isoramnetina y quercetina. Estos compuestos, particularmente los flavonoides, han sido señalados por su potente actividad antioxidante ¹⁸³⁻¹⁸⁵. Ambos extractos causaron profundas alteraciones dinámicas en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC y en membranas aisladas de eritrocitos humanos sin sellar (IUM), aumentando significativamente la fluidez tanto del entorno hidrofóbico como de la región de los grupos polares. Este fuerte efecto en ambos entornos de la membrana es atribuido a las diferencias estructurales de la amplia variedad de compuestos presente en los extractos. Resultados similares han sido reportados de otros extractos acuosos de plantas con alto contenido de compuestos fenólicos ^{186,187}. Por otro lado, el ensanchamiento del pico de transición principal de DMPC y DMPE indica que los componentes presentes en los extractos modularon el comportamiento termotrópico de ambos lípidos, reduciendo la cooperatividad de sus moléculas durante el proceso de fusión. La discrepancia de estos resultados con los obtenidos de la difracción rayos X, que mostró que los extractos solo causan perturbaciones en DMPC y no en DMPE, se puede atribuir a la diferencia entre los modelos de membrana usados en cada técnica. Los liposomas multilamelares (MLV) usados en DSC representan un modelo de membrana más fluido debido a su curvatura, lo que permitiría una mayor interacción de los compuestos presentes en los extractos respecto al modelo más compacto de multibicapas usado en rayos X ¹⁰⁰.

Por otro lado, crocina es un carotenoide aislado del azafrán particularmente soluble en agua. Químicamente, este metabolito es un diéster del disacárido gentiobiosa y el ácido dicarboxílico crocetina ¹⁸⁸. Los carotenoides presentan espectros de absorción característicos entre 400 y 500 nm ¹⁸⁹, dificultando los estudios de polarización generalizada con la sonda laurdan, que posee máximos de emisión entre 440 y 490 nm ⁸¹. Por lo tanto, la influencia de crocina sobre la región hidrofílica de LUV de DMPC e IUM se determinó mediante espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR). A partir de esta técnica se puede obtener valiosa información sobre el efecto de

carotenoides en las propiedades estructurales y dinámicas de las membranas lipídicas¹⁹⁰. Los espectros de EPR de la sonda 5-SASL mostraron que crocina indujo una ligera restricción en la movilidad de las cadenas acílicas en la región próxima a los grupos polares de DMPC a 18 °C. Interesantemente, a 37 °C crocina causó un profundo incremento en la dinámica molecular de los grupos polares de DMPC sensados por TEMPO, mientras que los resultados de fluorescencia usando DPH indicaron una marcada disminución en la fluidez del núcleo hidrófobo. Este comportamiento también ha sido reportado de los carotenoides zeaxantina y violaxantina en bicapas de DMPC usando EPR¹⁹¹. En fase gel (18 °C), una molécula marcadamente soluble como crocina (Xlog P3 = -2.5, PubChem 2017) se mantendría preferentemente en la interfase lípido-agua, con sus voluminosos extremos polares interactuando superficialmente con los grupos polares de DMPC. Por otro lado, en fase fluida (37 °C) las bicapas de DMPC experimentan un considerable aumento en la cantidad de agua que ingresa a la membrana, lo que disminuye significativamente su hidrofobicidad¹⁷⁹. Esta condición podría permitir el ingreso de las moléculas de crocina a la membrana, ubicándose paralelas a las cadenas acílicas del fosfolípido, con sus dos grupos polares interactuando con las terminaciones polares de ambos segmentos de la bicapa. Esta ubicación preferencial de crocina en la membrana ya ha sido sugerida para otros carotenoides polares^{190,192}, y está apoyada por los resultados de DSC, los que mostraron una profunda perturbación de este carotenoide en ambos entornos de la bicapa de DMPC. Sin embargo, no se evidenció efecto de crocina en las propiedades dinámicas de las IUM, lo que indica escasa interacción de este metabolito con el entorno lipídico de la membrana de los eritrocitos humanos.

Las observaciones de SEM mostraron que todos los MVs inducen cambios morfológicos en los eritrocitos humanos, de su forma discoide normal a equinocitos. Sin embargo, este efecto fue dependiente de la concentración de los metabolitos. Los eritrocitos incubados con GEGC y los extractos de *P. goudotianus* exhibieron las mayores alteraciones morfológicas, resultado confirmado por los experimentos de fluorescencia, ya que estos compuestos mostraron los más pronunciados efectos dinámicos en la membrana de los eritrocitos. De acuerdo con la hipótesis del par bicapa

¹⁹³, los cambios de forma inducidos en los eritrocitos humanos por moléculas exógenas se deben a la expansión diferencial de las monocapas lipídicas que integran la membrana de los RBC. En consecuencia, cuando las moléculas exógenas se ubican en la monocapa externa se producen equinocitos, mientras que los estomatocitos se forman cuando estas moléculas se insertan en la monocapa interna de la membrana. El hallazgo de que los MVs causaron equinocitos indica que estos metabolitos se localizaron preferentemente en la monocapa externa de la membrana de los eritrocitos. Una conclusión sólidamente soportada por los estudios de DSC y difracción de rayos X, los que mostraron que los MVs interactúan preferencialmente con DMPC, una clase de fosfolípido localizado mayoritariamente en la monocapa externa de la membrana del eritrocito humano.

La habilidad de los MVs de proteger los eritrocitos humanos y multibicapas del fosfolípido DMPE fue evaluada en ensayos en los que estos sistemas fueron expuestos al ácido hipocloroso (HClO). HClO es un poderoso agente oxidante generado como una respuesta inmune por neutrófilos y monocitos ante invasiones microbianas. Sin embargo, HClO también tiene el potencial de causar severos daños en el tejido huésped a través de los mismos mecanismos con los que ejerce su acción antimicrobiana ¹⁷. La presencia de HClO ha sido relacionada con una serie de condiciones patológicas incluyendo aterosclerosis, vasculitis aguda, artritis reumatoide y cáncer ^{56,58,194}. En eritrocitos humanos, la principal consecuencia de su exposición al HClO es la lisis; aunque el mecanismo exacto no es del todo claro, la membrana celular se considera el sitio principal de interacción de este oxidante ⁵³. Previo a la hemólisis de los glóbulos rojos, HClO induce transformaciones morfológicas, cambios en la fluidez y el área superficial de la membrana, inhibición de Na⁺ -, K⁺ - y Mg²⁺ -ATPasa, oxidación de grupos tiol y formación de cloraminas ^{53,164,195}. La difracción de rayos X mostró que HClO solo produjo perturbaciones estructurales en DMPE y no en DMPC. Ambos fosfolípidos poseen dos cadenas acílicas completamente saturadas de 14 átomos de carbono; por lo tanto, este resultado puede explicarse basado en las diferencias estructurales de los grupos de cabeza polar de estos lípidos. En DMPE, una pequeña molécula polar como HClO (pKa = 7.53, ¹⁷) podría insertarse entre los grupos fosfato y

amino adyacentes, interrumpiendo la estrecha red de interacciones electrostáticas y enlaces H que mantienen sus bicapas fuertemente unidas. En el caso de DMPC, debido a sus voluminosos grupos metilo y la presencia de una considerable cantidad de agua entre sus bicapas, presenta interacciones interbicapas relativamente débiles. Por lo tanto, las moléculas de HClO permanecerían disueltas en la capa de agua, causando alguna perturbación estructural solo a muy altas concentraciones ¹⁷⁷. La previa incubación de las multibicapas de DMPE con los MVs previno las alteraciones estructurales causadas por HClO. Este resultado podría deberse al anclaje superficial de las moléculas de los metabolitos en torno a los grupos fuertemente polares de DMPE, lo que impediría el ingreso de HClO al interior de la bicapa y sus correspondientes daños estructurales. Por otro lado, las observaciones de SEM en eritrocitos humanos mostraron que HClO indujo principalmente la formación de estomatocitos. Este hallazgo también concuerda con la hipótesis del par bicapa ¹⁹³, ya que HClO solo interactuó con DMPE, una clase de fosfolípido que se encuentra principalmente en la monocapa interna de la membrana del eritrocito. Sin embargo, con excepción de crocina, el tratamiento previo de los RBC con los MVs evitó las alteraciones morfológicas causadas por HClO, efecto que fue confirmado por los experimentos de hemólisis donde los metabolitos mostraron una marcada disminución de la lisis inducida por HClO. Estos resultados demuestran claramente la capacidad protectora de los MVs contra los daños causados por HClO en los glóbulos rojos. GEGC y el extracto de las hojas de *P. goudotianus* mostraron el mayor efecto protector en los eritrocitos humanos; sin embargo, estos mismos compuestos causaron las mayores perturbaciones biofísicas en la membrana de los RBC, mientras que crocina, que indujo los menores efectos en la membrana, resulto ser el menos activo en la protección contra HClO.

La actividad contra especies oxidantes de metabolitos vegetales ha sido principalmente atribuida a su capacidad para eliminar radicales y quelar metales ^{182,196-198}. Sin embargo, los mecanismos por los que estos compuestos naturales muestran protección contra agentes oxidantes en las membranas biológicas, y particularmente en la del eritrocito humano han sido escasamente estudiados ^{28,199}. Se ha propuesto que el

papel protector de algunos polifenoles y carotenoides contra el daño oxidativo a nivel celular podría estar relacionado con la capacidad de estos compuestos para interactuar con la bicapa lipídica ^{9,164,190}. De hecho, los resultados obtenidos en la presente investigación muestran una fuerte correlación entre la capacidad de los MVs de prevenir las alteraciones morfológicas y la lisis, con la habilidad de estos metabolitos para inducir cambios en la fluidez de la membrana de los eritrocitos humanos. Basado en toda esta evidencia es posible sugerir que la ubicación de los MVs en la monocapa externa de la membrana del eritrocito, y la correspondiente modulación de sus propiedades físicas es un importante factor en el mecanismo protector de estos metabolitos. Esta ubicación permitiría a las moléculas de algunos MVs prevenir efectivamente los efectos estructurales causados por HClO, al impedir su inserción y difusión en la membrana de los RBC ²⁰⁰. Esta conclusión también podría aplicarse a la difusión de otras especies oxidantes en membranas celulares, lo que disminuiría significativamente la capacidad de estos agentes para causar estrés oxidativo en sistemas biológicos.



CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos por difracción de rayos X y calorimetría diferencial de barrido (DSC) mostraron que los metabolitos vegetales (MVs) interactúan preferencialmente con DMPC, una clase de fosfolípido que se localiza mayoritariamente en la monocapa externa de la membrana del eritrocito humano.
- Los estudios de espectroscopía de fluorescencia y de resonancia paramagnética electrónica (EPR) realizados en vesículas de DMPC y en membranas aisladas de eritrocitos humanos (IUM) indicaron que los MVs se ubican en diferentes zonas de la bicapa lipídica, afectando la dinámica e hidratación de las moléculas de lípido.
- Los MVs causaron alteraciones morfológicas en los eritrocitos humanos cambiando su forma discoide normal a equinocitos. De acuerdo con la hipótesis del par bicapa este efecto se debería a la inserción de los metabolitos en la monocapa externa de la membrana de los eritrocitos.
- Con excepción de crocina, los MVs en concentraciones menores a las que indujeron cambios en la forma de los eritrocitos, protegieron estas células de las alteraciones morfológicas y la lisis causada por la especie oxidante ácido hipocloroso (HClO).
- La ubicación preferencial de los MVs en la monocapa externa del eritrocito humano podría impedir el acceso de especies oxidantes como HClO al interior de la membrana, evitando su difusión y protegiendo los glóbulos rojos del estrés oxidativo.
- Esta investigación demostró que la capacidad protectora de ácido gálico, ácido cafeico, galato de epigallocatequina (GECG) y los extractos de hojas y corteza de la planta *P. goudotianus* en eritrocitos humanos está relacionada con la modulación de

las propiedades biofísicas de su membrana plasmática. Estos hallazgos son altamente relevantes para comprender la actividad mostrada por estos metabolitos en sistemas biológicos.



APÉNDICE 1

Parámetros termodinámicos obtenidos de los experimentos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) en vesículas de DMPC y DMPE.

Tabla 10. Parámetros termodinámicos de la pre-transición (Tp) y transición principal (Tm) determinados en los procesos de calentamiento y enfriamiento de vesículas multilamelares (MLV) de DMPC tratadas con ácido cafeico. Fuente: elaboración propia.

Calentamiento

DMPC	Pre-transición			Transición principal			
Ácido cafeico [mM]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tp [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	$\Delta T_{1/2}$ [°C]	Tm [°C]
0.00	2.67	9.28	15.20	18.34	61.73	0.59	24.01
0.025	2.07	7.21	13.92	19.62	66.05	0.72	23.95
0.10	1.46	5.08	13.53	22.33	75.15	0.76	24.00
0.25	-	-	-	26.52	89.45	1.85	23.29
0.50	-	-	-	29.90	101.4	2.47	21.85
1.00	-	-	-	31.70	107.9	2.77	20.77

Enfriamiento

DMPC	Pre-transición			Transición principal			
Ácido cafeico [mM]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tp [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	$\Delta T_{1/2}$ [°C]	Tm [°C]
0.00	1.73	6.11	9.30	17.78	59.98	0.62	23.23
0.025	1.1	3.94	7.67	20.94	70.71	0.84	23.03
0.10	0.97	3.44	7.22	22.69	76.59	0.82	23.09
0.25	-	-	-	28.38	96.25	2.10	21.74
0.50	-	-	-	31.57	107.7	2.52	19.91
1.00	-	-	-	32.84	112.4	2.86	19.05

La temperatura y la entalpía fueron determinadas con una exactitud de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ/mol, respectivamente. Velocidad de barrido 1 °C/min.

Tabla 11. Parámetros termodinámicos de la pre-transición (T_p) y transición principal (T_m) determinados en los procesos de calentamiento y enfriamiento de vesículas multilamelares (MLV) de DMPC tratadas con ácido gálico. Fuente: elaboración propia.

Calentamiento

DMPC	Pre-transición			Transición principal			
Ácido gálico [mM]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	T_p [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	$\Delta T_{1/2}$ [°C]	T_m [°C]
0.00	2.62	9.21	15.26	17.04	57.32	0.61	24.03
0.05	2.64	1.03	14.98	21.61	68.54	0.61	24.01
0.10	2.92	1.19	14.85	21.52	72.43	0.60	23.03
0.25	3.65	1.24	14.67	24.93	83.98	0.62	23.97
0.50	3.43	1.09	12.41	25.06	84.42	0.68	23.86
1.00	2.68	1.34	10.11	22.17	75.67	0.76	23.34

Enfriamiento

DMPC	Pre-transición			Transición principal			
Ácido gálico [mM]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	T_p [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	$\Delta T_{1/2}$ [°C]	T_m [°C]
0.00	1.02	3.67	9.45	18.56	62.34	0.63	23.27
0.05	1.01	3.86	9.42	19.22	64.15	0.62	23.26
0.10	0.16	0.69	9.25	20.69	69.80	0.63	23.27
0.25	0.09	0.36	8.83	23.43	79.12	0.66	22.23
0.50	-	-	-	24.48	82.74	0.77	22.99
1.00	-	-	-	23.11	79.23	0.82	20.75

La temperatura y la entalpía fueron determinadas con una exactitud de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ/mol, respectivamente. Velocidad de barrido 1 °C/min.

Tabla 12. Parámetros termodinámicos de la pre-transición (T_p) y transición principal (T_m) determinados en los procesos de calentamiento y enfriamiento de vesículas multilamelares (MLV) de DMPC tratadas con galato de epigallocatequina (GEGC). Fuente: elaboración propia.

Calentamiento

DMPC	Pre-transición			Transición principal			
GEGC [μM]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	T_p [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	$\Delta T_{1/2}$ [°C]	T_m [°C]
0.00	2.53	8.78	15.18	17.72	59.63	0.61	24.01
10.0	1.11	3.87	13.57	15.53	52.27	0.73	23.98
25.0	-	-	-	18.41	61.97	0.84	23.91
50.0	-	-	-	15.47	52.08	1.23	23.79
100	-	-	-	14.88	50.20	1.79	23.35
250	-	-	-	5.97	20.21	3.64	22.39

Tabla 12. (Continuación)

Enfriamiento

DMPC	Pre-transición			Transición principal			
GEGC [μ M]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	T_p [$^{\circ}$ C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	$\Delta T_{1/2}$ [$^{\circ}$ C]	T_m [$^{\circ}$ C]
0.00	1.73	6.11	9.30	17.00	57.34	0.62	23.23
10.0	1.22	4.35	8.47	16.07	54.24	0.79	23.15
25.0	-	-	-	18.09	61.06	0.85	23.06
50.0	-	-	-	17.39	58.71	0.91	22.97
100	-	-	-	14.76	49.90	1.20	22.61
250	-	-	-	5.12	17.37	1.91	21.71

La temperatura y la entalpía fueron determinadas con una exactitud de ± 0.01 $^{\circ}$ C y ± 0.8 kJ/mol, respectivamente. Velocidad de barrido 1 $^{\circ}$ C/min.

Tabla 13. Parámetros termodinámicos de la pre-transición (T_p) y transición principal (T_m) determinados en los procesos de calentamiento y enfriamiento de vesículas multilamelares (MLV) de DMPC tratadas con crocina. Fuente: elaboración propia.

Calentamiento

DMPC	Pre-transición (calentamiento)			Transición principal (calentamiento)			
Crocina [mM]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	T_p [$^{\circ}$ C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	$\Delta T_{1/2}$ [$^{\circ}$ C]	T_m [$^{\circ}$ C]
0.00	2.56	8.89	15.20	17.84	60.03	0.59	24.01
0.05	1.23	4.27	13.83	16.87	56.77	0.66	24.03
0.10	0.94	3.28	12.15	17.14	57.72	0.71	23.91
0.25	-	-	-	17.64	59.40	0.83	23.84
0.50	-	-	-	17.98	60.58	1.30	23.67
1.00	-	-	-	14.77	49.88	4.81	22.83

Enfriamiento

DMPC	Pre-transición (enfriamiento)			Transición principal (enfriamiento)			
Crocina [mM]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	T_p [$^{\circ}$ C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	$\Delta T_{1/2}$ [$^{\circ}$ C]	T_m [$^{\circ}$ C]
0.00	1.44	5.09	9.30	17.07	57.59	0.63	23.23
0.05	1.09	3.86	8.98	16.82	56.77	0.73	23.20
0.10	0.55	1.97	7.85	16.19	54.68	0.91	23.01
0.25	-	-	-	16.64	56.22	0.99	22.93
0.50	-	-	-	16.86	56.99	1.34	22.73
1.00	-	-	-	14.28	48.57	4.51	20.76

La temperatura y la entalpía fueron determinadas con una exactitud de ± 0.01 $^{\circ}$ C y ± 0.8 kJ/mol, respectivamente. Velocidad de barrido 1 $^{\circ}$ C/min.

Tabla 14. Parámetros termodinámicos de la pre-transición (Tp) y transición principal (Tm) determinados en los procesos de calentamiento y enfriamiento de vesículas multilamelares (MLV) de DMPC tratadas con el extracto de la corteza de *Pilocarpus goudotianus* (P. corteza). Fuente: elaboración propia.

Calentamiento							
DMPC	Pre-transición			Transición principal			
<i>P. corteza</i>	ΔH	ΔS	Tp	ΔH	ΔS	$\Delta T_{1/2}$	Tm
[mM]	[kJ/mol]	[J/mol K]	[°C]	[kJ/mol]	[J/mol K]	[°C]	[°C]
0.00	2.44	8.50	14.89	17.82	60.00	0.64	24.06
0.05	2.41	8.42	14.81	17.06	57.40	0.62	24.08
0.10	2.39	8.30	14.58	16.04	54.00	0.64	24.06
0.25	1.56	5.40	13.26	14.70	49.40	0.68	24.07
0.50	0.92	3.20	11.96	13.60	45.80	0.71	24.02
1.00	-	-	-	13.07	44.00	0.90	23.89

Enfriamiento							
DMPC	Pre-transición			Transición principal			
<i>P. corteza</i>	ΔH	ΔS	Tp	ΔH	ΔS	$\Delta T_{1/2}$	Tm
[mM]	[kJ/mol]	[J/mol K]	[°C]	[kJ/mol]	[J/mol K]	[°C]	[°C]
0.00	1.57	5.60	9.31	17.59	59.30	0.64	23.23
0.05	1.46	5.20	9.18	16.21	54.70	0.64	23.27
0.10	1.39	4.90	8.99	15.94	53.80	0.63	23.24
0.25	0.71	2.70	8.35	13.57	45.80	0.67	23.23
0.50	0.24	0.90	7.39	12.19	41.20	0.73	23.15
1.00	-	-	-	12.05	40.70	1.05	22.84

La temperatura y la entalpía fueron determinadas con una exactitud de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ/mol, respectivamente. Velocidad de barrido 1 °C/min.

Tabla 15. Parámetros termodinámicos de la pre-transición (Tp) y transición principal (Tm) determinados en los procesos de calentamiento y enfriamiento de vesículas multilamelares (MLV) de DMPC tratadas el extracto de las hojas de *Pilocarpus goudotianus* (P. hojas). Fuente: elaboración propia.

Calentamiento							
DMPC	Pre-transición			Transición principal			
<i>P. hojas</i>	ΔH	ΔS	Tp	ΔH	ΔS	$\Delta T_{1/2}$	Tm
[mM]	[kJ/mol]	[J/mol K]	[°C]	[kJ/mol]	[J/mol K]	[°C]	[°C]
0.00	2.44	8.50	14.89	17.82	60.00	0.64	24.06
0.05	1.85	6.50	13.93	15.71	52.90	0.69	24.05
0.10	1.81	6.30	13.93	14.85	50.00	0.67	24.03
0.25	0.77	2.70	12.15	14.79	49.80	0.84	24.03
0.50	0.16	0.50	10.36	12.00	40.42	1.05	24.02
1.00	-	-	-	6.75	22.70	2.13	23.83

Tabla 15. (Continuación)

Enfriamiento

DMPC <i>P.</i> hojas [mM]	Pre-transición			Transición principal			
	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	T_p [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	$\Delta T_{1/2}$ [°C]	T_m [°C]
0.00	1.57	5.60	9.31	17.59	59.30	0.64	23.23
0.05	0.88	3.10	8.78	13.62	46.00	0.73	23.18
0.10	0.85	3.00	8.60	13.52	45.60	0.71	23.18
0.25	0.19	0.70	7.61	12.76	43.10	0.93	23.08
0.50	-	-	-	11.30	38.20	1.24	22.91
1.00	-	-	-	7.27	24.60	3.02	22.30

La temperatura y la entalpía fueron determinadas con una exactitud de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ/mol, respectivamente. Velocidad de barrido 1 °C/min.

Tabla 16. Parámetros termodinámicos de la transición principal (T_m) determinados en los procesos de calentamiento y enfriamiento de vesículas multilamelares (MLV) de DMPE tratadas con ácido cafeico. Fuente: elaboración propia.

DMPE Ácido cafeico [mM]	Transición principal (calentamiento)				Transición principal (enfriamiento)			
	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	$\Delta T_{1/2}$ [°C]	T_m [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	$\Delta T_{1/2}$ [°C]	T_m [°C]
0.00	20.59	63.57	0.70	50.71	19.64	60.92	0.85	49.24
0.025	19.63	60.61	0.71	50.66	20.93	64.93	0.86	49.20
0.10	21.27	65.69	0.69	50.68	23.93	74.23	0.84	49.27
0.25	24.38	75.30	0.82	50.62	24.93	77.36	0.96	49.09
0.50	26.00	80.30	0.95	50.57	25.17	78.15	1.12	48.86
1.00	28.64	88.47	1.06	50.52	29.71	92.34	1.19	48.64

La temperatura y entalpía fueron determinadas con una exactitud de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ/mol, respectivamente. Velocidad de barrido 1 °C/min.

Tabla 17. Parámetros termodinámicos de la transición principal (T_m) determinados en los procesos de calentamiento y enfriamiento de vesículas multilamelares (MLV) de DMPE tratadas con ácido gálico. Fuente: elaboración propia.

DMPE Ácido gálico [mM]	Transición principal (calentamiento)				Transición principal (enfriamiento)			
	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	$\Delta T_{1/2}$ [°C]	T_m [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	$\Delta T_{1/2}$ [°C]	T_m [°C]
0.00	24.73	76.43	0.74	50.43	28.35	88.23	0.72	48.37
0.05	24.23	72.21	0.76	50.48	25.65	71.90	0.74	49.17
0.10	20.40	63.11	0.74	50.61	22.43	69.67	0.74	49.19
0.25	20.15	62.34	0.74	50.57	23.13	71.85	0.76	49.12
0.50	20.98	64.65	0.75	50.57	22.87	71.10	0.77	49.12
1.00	24.15	76.12	0.78	50.53	27.37	86.14	0.80	49.02

La temperatura y la entalpía fueron determinadas con una exactitud de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ/mol, respectivamente. Velocidad de barrido 1 °C/min.

Tabla 18. Parámetros termodinámicos de la transición principal (T_m) determinados en los procesos de calentamiento y enfriamiento de vesículas multilamelares (MLV) de DMPE tratadas con galato de epigalocatequina (GEGC). Fuente: elaboración propia.

DMPE GEGC [μ M]	Transición principal (calentamiento)				Transición principal (enfriamiento)			
	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	$\Delta T_{1/2}$ [$^{\circ}$ C]	T_m [$^{\circ}$ C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	$\Delta T_{1/2}$ [$^{\circ}$ C]	T_m [$^{\circ}$ C]
0.00	20.95	64.68	0.76	50.71	18.19	56.42	0.87	49.24
10.0	20.29	62.65	0.75	50.68	17.27	53.57	0.86	49.19
25.0	20.95	64.70	0.76	50.68	19.57	60.68	0.88	49.22
50.0	20.71	63.94	0.76	50.72	19.45	60.31	0.86	49.29
100	20.24	62.50	0.74	50.72	19.43	60.26	0.84	49.29
250	19.51	60.24	0.86	50.67	18.61	50.74	0.96	49.10

La temperatura y la entalpía fueron determinadas con una exactitud de ± 0.01 $^{\circ}$ C y ± 0.8 kJ/mol, respectivamente. Velocidad de barrido 1 $^{\circ}$ C/min.

Tabla 19. Parámetros termodinámicos de la transición principal (T_m) determinados en los procesos de calentamiento y enfriamiento de vesículas multilamelares (MLV) de DMPE tratadas con crocina. Fuente: elaboración propia.

DMPE Crocina [mM]	Transición principal (calentamiento)				Transición principal (enfriamiento)			
	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	$\Delta T_{1/2}$ [$^{\circ}$ C]	T_m [$^{\circ}$ C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	$\Delta T_{1/2}$ [$^{\circ}$ C]	T_m [$^{\circ}$ C]
0.00	24.72	76.33	0.64	50.73	19.69	61.28	0.83	49.30
0.05	24.16	74.58	0.62	50.73	22.98	71.26	0.82	49.31
0.10	20.89	64.51	0.71	50.68	20.15	62.48	0.84	49.29
0.25	22.43	69.26	0.69	50.69	21.06	65.30	0.88	49.25
0.50	22.18	68.51	0.79	50.61	21.29	66.08	1.00	49.12
1.00	21.66	66.91	0.89	50.59	20.96	65.04	1.27	49.05

La temperatura y la entalpía fueron determinadas con una exactitud de ± 0.01 $^{\circ}$ C y ± 0.8 kJ/mol, respectivamente. Velocidad de barrido 1 $^{\circ}$ C/min.

Tabla 20. Parámetros termodinámicos de la transición principal (T_m) determinados en los procesos de calentamiento y enfriamiento de vesículas multilamelares (MLV) de DMPE tratadas con el extracto de la corteza de *Pilocarpus goudotianus* (P. corteza). Fuente: elaboración propia.

DMPE P. corteza [mM]	Transición principal (calentamiento)				Transición principal (enfriamiento)			
	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	$\Delta T_{1/2}$ [$^{\circ}$ C]	T_m [$^{\circ}$ C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	$\Delta T_{1/2}$ [$^{\circ}$ C]	T_m [$^{\circ}$ C]
0.00	19.43	60.00	0.68	50.83	18.19	56.40	0.81	49.40
0.05	16.27	50.20	0.82	50.83	16.50	51.20	0.81	49.41
0.10	15.21	47.00	0.68	50.81	14.56	45.10	0.83	49.39
0.25	12.96	40.00	0.64	50.83	11.55	35.80	0.82	49.46
0.50	11.23	34.70	0.66	50.81	10.61	32.90	0.95	49.39
1.00	9.75	30.10	0.75	50.47	10.05	31.23	1.63	48.91

La temperatura y la entalpía fueron determinadas con una exactitud de ± 0.01 $^{\circ}$ C y ± 0.8 kJ/mol, respectivamente. Velocidad de barrido 1 $^{\circ}$ C/min.

Tabla 21. Parámetros termodinámicos de la transición principal (T_m) determinados en los procesos de calentamiento y enfriamiento de vesículas multilamelares (MLV) de DMPE tratadas con el extracto de las hojas de *Pilocarpus goudotianus* (P. hojas). Fuente: elaboración propia.

DMPE P. hojas [mM]	Transición principal (calentamiento)				Transición principal (enfriamiento)			
	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	$\Delta T_{1/2}$ [°C]	T_m [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	$\Delta T_{1/2}$ [°C]	T_m [°C]
0.00	19.43	60.00	0.63	50.83	18.19	56.40	0.81	49.40
0.05	18.56	57.30	0.65	50.83	17.09	53.00	0.81	49.40
0.10	15.84	48.90	0.84	50.81	16.12	50.00	0.85	49.38
0.25	15.56	48.10	0.72	50.77	15.78	49.00	1.01	49.35
0.50	15.45	47.70	0.83	50.69	15.37	47.70	1.22	49.25
1.00	14.67	45.30	1.11	50.50	14.69	45.60	1.51	49.08

La temperatura y la entalpía fueron determinadas con una exactitud de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ/mol, respectivamente. Velocidad de barrido 1 °C/min.

APÉNDICE 2

Resumen de los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de una vía y prueba de Dunnett realizado a los datos obtenidos de los experimentos de espectroscopía de fluorescencia y de resonancia paramagnética de electrónica (EPR). Los niveles de significancia son denotados como: NS, no significativo; *, $p < 0.05$ y **, $p < 0.01$.

Tabla 22. Influencia de los metabolitos vegetales sobre las mediciones de polarización generalizada (PG) de lauridan en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC a 18 °C. Fuente: elaboración propia.

Conc. [μ M]	Ácido cafeico	Ácido gálico	GEGC	<i>P. goudotianus</i> Corteza	<i>P. goudotianus</i> Hojas
10	NS	NS	**	**	*
20	**	NS	**	**	**
40	**	NS	**	**	**
80	**	NS	**	**	**
100	**	NS	**	**	**

Concentración 0.0 mM representó el control del experimento.
GEGC, galato de epigallocatequina.

Tabla 23. Influencia de los metabolitos vegetales sobre las mediciones de polarización generalizada (PG) de lauridan en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC a 37 °C. Fuente: elaboración propia.

Conc. [μM]	Ácido cafeico	Ácido gálico	GEGC	<i>P. goudotianus</i> Corteza	<i>P. goudotianus</i> Hojas
10	NS	NS	**	NS	NS
20	NS	NS	**	NS	NS
40	**	NS	**	NS	NS
80	**	**	**	NS	*
100	**	**	**	NS	**

Concentración 0.0 mM representó el control del experimento.

GEGC, galato de epigallocatequina.

Tabla 24. Influencia de los metabolitos vegetales sobre las mediciones de anisotropía de DPH en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC a 18 °C. Fuente: elaboración propia.

Conc. [μM]	Ácido cafeico	Ácido gálico	GEGC	Crocina	<i>P. goudotianus</i> Corteza	<i>P. goudotianus</i> Hojas
10	NS	NS	NS	NS	**	*
20	NS	NS	NS	NS	**	**
40	NS	NS	NS	NS	**	**
80	NS	NS	NS	NS	**	**
100	**	NS	*	NS	**	**

Concentración 0.0 mM representó el control del experimento.

GEGC, galato de epigallocatequina.

Tabla 25. Influencia de los metabolitos vegetales sobre las mediciones de anisotropía de DPH en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC a 37 °C. Fuente: elaboración propia.

Conc. [μM]	Ácido cafeico	Ácido gálico	GEGC	Crocina	<i>P. goudotianus</i> Corteza	<i>P. goudotianus</i> Hojas
10	NS	NS	NS	NS	NS	NS
20	NS	NS	NS	NS	NS	NS
40	NS	NS	**	**	NS	**
80	NS	NS	**	**	*	**
100	NS	*	**	**	**	**

Concentración 0.0 mM representó el control del experimento.

GEGC, galato de epigallocatequina.

Tabla 26. Influencia de los metabolitos vegetales sobre las mediciones de polarización generalizada (PG) de lauridan en membranas aisladas de eritrocitos humanos (IUM) a 37 °C. Fuente: elaboración propia.

Conc. [μM]	Ácido cafeico	Ácido gálico	GEGC	<i>P. goudotianus</i> Corteza	<i>P. goudotianus</i> Hojas
10	NS	NS	NS	*	**
20	NS	NS	NS	*	**
40	**	NS	**	**	**
80	**	NS	**	**	**
100	**	NS	**	**	**

Concentración 0.0 mM representó el control del experimento.
GEGC, galato de epigallocatequina.

Tabla 27. Influencia de los metabolitos vegetales sobre las mediciones de anisotropía de DPH en membranas aisladas de eritrocitos humanos (IUM) a 37 °C. Fuente: elaboración propia.

Conc. [μM]	Ácido cafeico	Ácido gálico	GEGC	Crocina	<i>P. goudotianus</i> Corteza	<i>P. goudotianus</i> Hojas
10	NS	NS	NS	NS	**	NS
20	NS	NS	NS	NS	**	NS
40	NS	NS	NS	NS	**	**
80	NS	NS	NS	NS	**	**
100	NS	NS	*	NS	**	**

Concentración 0.0 mM representó el control del experimento.
GEGC, galato de epigallocatequina.

Tabla 28. Influencia de crocina sobre las mediciones de los parámetros espectroscópicos F y 2Amax obtenidos de los espectros de EPR de las sondas TEMPO y 5-SASL, respectivamente en LUV de DMPC e IUM. Fuente: elaboración propia.

Conc. [mM]	LUV DMPC 18 °C		LUV DMPC 37 °C		IUM 37 °C	
	F	2Amax	F	2Amax	F	2Amax
0.10	NS	NS	**	NS	NS	NS
0.25	NS	NS	**	NS	NS	NS
0.50	NS	*	**	NS	NS	NS
1.0	NS	*	**	NS	NS	NS

APÉNDICE 3

Publicaciones

Artículos publicados

[1] Colina, J.R, Suwalsky, M., Moreno-Manrique, M., Petit, K., Aguilar, L., Jemiola-Rzeminska, M., Strzalka, K. “An in vitro study of the protective effect of caffeic acid on human erythrocytes”. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 662 (2019) 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.12.006>

[2] Colina, J.R, Suwalsky, M., Moreno-Manrique, M., Petit, K., Aguilar, L., Jemiola-Rzeminska, M., Strzalka, K. “Protective effect of epigallocatechin gallate on human erythrocytes”. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 173 (2019) 742–750. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.10.038>

[3] Suwalsky, M., Colina, J.R, Gallardo, M., Jemiola-Rzeminska, M., Strzalka, K., Manrique-Moreno, M., Sepulveda, B. “Antioxidant capacity of gallic acid in vitro assayed on human erythrocytes”. *J Membrane Biol.* 249 (2016) 769–779. <https://doi.org/10.1007/s00232-016-9924-z>

Artículos en preparación

- Colina, J.R, Suwalsky, M., Petit, K., Contreras, D., M., Moreno-Manrique, M., Aguilar, L., Jemiola-Rzeminska, M., Strzalka, K. “Interactions of crocin with human erythrocytes and lipid membrane models”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Colina, J.R, Suwalsky, M., Petit, K., Aguilar, L., Jemiola-Rzeminska, M., Strzalka, K. “Biophysical study of the protective effect of extracts from *Pilocarpus goudotanus* leaves on human erythrocytes”. *Chemico-Biological Interactions*

Artículos en colaboración

[1] Petit, K., Suwalsky, M., Colina, J.R, Aguilar, L., Jemiola-Rzeminska, M., Strzalka, K. “In vitro effects of the antitumor drug miltefosine on human erythrocytes and T molecular models of its membrane”. BBA - Biomembranes 1861 (2019) 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.10.009>

Presentaciones en congresos

- “Estudio biofísico del efecto protector de ácido cafeico en eritrocitos humanos y modelos moleculares de su membrana”. III Reunión de la Asociación Latinoamericana de Cristalografía. Valparaíso, Chile. Octubre de 2018.
- “Protective effect of epigallocatechin gallate on human erythrocytes”. XLII Annual Meeting of the Brazilian Biophysics Society. Santos, Brasil. Octubre de 2017.
- “Interacción de crocina con eritrocitos humanos y modelos moleculares”. VIII Coloquio de Macromoléculas. Parral, Chile. Diciembre de 2016.
- “Estudio estructural del efecto protector de polifenoles en eritrocitos humanos y modelos moleculares. XII Reunión de la asociación Argentina de Cristalografía. San Luis, Argentina. Noviembre de 2016.
- “Efecto protector de las hojas de *Pilocarpus goudotianus* en eritrocitos humanos y modelos moleculares de membrana celular”. 32 Congreso Latinoamericano de Química. Concepción, Chile. Diciembre de 2015.
- “Efecto de *Pilocarpus goudotianus* en eritrocitos humanos y modelos moleculares de membrana plasmática”. XI Reunión de la asociación Argentina de Cristalografía. La Plata, Argentina. Noviembre de 2015.
- “Protective effect of *Pilocarpus goudotianus* bark on human erythrocytes. I Meeting of the Latin American Crystallographic Association. Sao Paulo, Brasil. Septiembre de 2015.

Referencias

- (1) Wootton-Beard, P. C.; Ryan, L. Improving Public Health?: The Role of Antioxidant-Rich Fruit and Vegetable Beverages. *Food Research International* **2011**, *44* (10), 3135–3148. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2011.09.015>.
- (2) Yahia, E. M.; García-Solís, P.; Celis, M. E. M. Contribution of Fruits and Vegetables to Human Nutrition and Health. In *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*; Woodhead Publishing, 2019; pp 19–45. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00002-6>.
- (3) Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53* (6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>.
- (4) Bruno, R. S.; Bomser, J. A.; Ferruzzi, M. G. Antioxidant Capacity of Green Tea (*Camellia Sinensis*). In *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*; Academic Press, 2014; pp 33–39. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404738-9.00004-0>.
- (5) Preedy, V. R. *Coffee in Health and Disease Prevention*; Victor R. Preedy, Ed.; Elsevier, 2015. <https://doi.org/10.1016/C2012-0-06959-1>.
- (6) Croft, K. D. Dietary Polyphenols: Antioxidants or Not? *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2016**, *595*, 120–124. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.11.014>.
- (7) Croft, K. D.; Yamashita, Y.; O'Donoghue, H.; Shirasaya, D.; Ward, N. C.; Ashida, H. Screening Plant Derived Dietary Phenolic Compounds for Bioactivity Related to Cardiovascular Disease. *Fitoterapia* **2018**, *126*, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.12.002>.
- (8) Procházková, D.; Boušová, I.; Wilhelmová, N. Antioxidant and Prooxidant Properties of Flavonoids. *Fitoterapia* **2011**, *82* (4), 513–523. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018>.
- (9) Selvaraj, S.; Krishnaswamy, S.; Devashya, V.; Sethuraman, S.; Krishnan, U. M. Influence of Membrane Lipid Composition on Flavonoid–Membrane Interactions: Implications on Their Biological Activity. *Progress in Lipid Research* **2015**, *58*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2014.11.002>.
- (10) Abram, V.; Berlec, B.; Ota, A.; Šentjurc, M.; Blatnik, P.; Ulrih, N. P. Effect of Flavonoid Structure on the Fluidity of Model Lipid Membranes. *Food Chemistry* **2013**, *139* (1–4), 804–813. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.100>.
- (11) Ota, A.; Abramovič, H.; Abram, V.; Poklar Ulrih, N. Interactions of P-Coumaric, Caffeic and Ferulic Acids and Their Styrenes with Model Lipid Membranes. *Food Chemistry* **2011**, *125* (4), 1256–1261. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.054>.
- (12) Yeagle, P. *The Membranes of Cells*, 3rd Editio.; Elsevier, 2016.
- (13) Deleu, M.; Crowet, J.-M.; Nasir, M. N.; Lins, L. Complementary Biophysical Tools to Investigate Lipid Specificity in the Interaction between Bioactive Molecules and the Plasma Membrane: A Review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2014**, *1838* (12), 3171–3190. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.08.023>.
- (14) Seddon, A. M.; Casey, D.; Law, R. V.; Gee, A.; Templer, R. H.; Ces, O. Drug Interactions with Lipid Membranes. *Chemical Society Reviews* **2009**, *38* (9), 2509. <https://doi.org/10.1039/b813853m>.

- (15) Martínez, V.; Mitjans, M.; Vinardell, M. P. Cytoprotective Effects of Polyphenols against Oxidative Damage. In *Polyphenols in Human Health and Disease*; Elsevier, 2014; pp 275–288. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00022-0>.
- (16) Rayner, B. S.; Love, D. T.; Hawkins, C. L. Comparative Reactivity of Myeloperoxidase-Derived Oxidants with Mammalian Cells. *Free Radical Biology and Medicine* **2014**, *71*, 240–255. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.004>.
- (17) Pullar, J.; Vissers, M.; Winterbourn, C. Living with a Killer: The Effects of Hypochlorous Acid on Mammalian Cells. *IUBMB Life* **2001**, *50* (4), 259–266. <https://doi.org/10.1080/713803731>.
- (18) Shitan, N. Secondary Metabolites in Plants: Transport and Self-Tolerance Mechanisms. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2016**, *80* (7), 1283–1293. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1151344>.
- (19) Caballero, B.; Finglas, P. M.; Toldrá, F. *Encyclopedia of Food and Health*; Elsevier Science, 2015.
- (20) Burri, B. J. Carotenoids: Chemistry, Sources and Physiology. In *Encyclopedia of Human Nutrition*; Academic Press, 2013; pp 283–291. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375083-9.00044-1>.
- (21) Saini, R. K.; Nile, S. H.; Park, S. W. Carotenoids from Fruits and Vegetables: Chemistry, Analysis, Occurrence, Bioavailability and Biological Activities. *Food Research International* **2015**, *76* (Pt 3), 735–750. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.047>.
- (22) Rodriguez-Amaya, D. B. CAROTENOIDS | Occurrence, Properties, and Determination. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*; Academic Press, 2003; pp 927–936. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00176-0>.
- (23) Carochó, M.; Ferreira, I. C. F. R. A Review on Antioxidants, Prooxidants and Related Controversy: Natural and Synthetic Compounds, Screening and Analysis Methodologies and Future Perspectives. *Food and Chemical Toxicology* **2013**, *51*, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>.
- (24) Böhm, F.; Edge, R.; Truscott, G. Interactions of Dietary Carotenoids with Activated (Singlet) Oxygen and Free Radicals: Potential Effects for Human Health. *Molecular Nutrition & Food Research* **2012**, *56* (2), 205–216. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100222>.
- (25) McNulty, H.; Jacob, R. F.; Mason, R. P. Biologic Activity of Carotenoids Related to Distinct Membrane Physicochemical Interactions. *The American Journal of Cardiology* **2008**, *101* (10), S20–S29. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2008.02.004>.
- (26) Quideau, S.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C.; Pouységu, L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50* (3), 586–621. <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>.
- (27) Catalán, Ú.; Barrubés, L.; Valls, R. M.; Solà, R.; Rubió, L. In Vitro Metabolomic Approaches to Investigating the Potential Biological Effects of Phenolic Compounds: An Update. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* **2017**, *15* (4), 236–245. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.12.007>.
- (28) Phan, H. T. T.; Yoda, T.; Chahal, B.; Morita, M.; Takagi, M.; Vestergaard, M. C. Structure-Dependent Interactions of Polyphenols with a Biomimetic Membrane System. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2014**, *1838* (10), 2670–2677. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2014.07.001>.

- (29) Pietta, P. G. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of natural products* **2000**, 63 (7), 1035–1042.
- (30) Hendrich, A. B. Flavonoid-Membrane Interactions: Possible Consequences for Biological Effects of Some Polyphenolic Compounds¹. *Acta Pharmacologica Sinica* **2006**, 27 (1), 27–40. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2006.00238.x>.
- (31) Pahari, B.; Chakraborty, S.; Chaudhuri, S.; Sengupta, B.; Sengupta, P. K. Binding and Antioxidant Properties of Therapeutically Important Plant Flavonoids in Biomembranes: Insights from Spectroscopic and Quantum Chemical Studies. *Chemistry and Physics of Lipids* **2012**, 165 (4), 488–496. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMPHYSLIP.2011.10.006>.
- (32) Seydel, J. K. (Joachim K. *Drug Membrane Interactions : Analysis, Drug Distribution, Modeling*; Wiley-VCH, 2002.
- (33) Shi, Y.; Cai, M.; Zhou, L.; Wang, H. The Structure and Function of Cell Membranes Studied by Atomic Force Microscopy. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2018**, 73, 31–44. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.07.012>.
- (34) Alpert, P. The Limits and Frontiers of Desiccation-Tolerant Life. *Integrative and Comparative Biology* **2005**, 45 (5), 685–695. <https://doi.org/10.1093/icb/45.5.685>.
- (35) Singer, S. J.; Nicolson, G. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science (New York, NY)* **1972**, 175 (4023), 720–731.
- (36) Stillwell, W. *An Introduction to Biological Membranes : Composition, Structure and Function*, 2nd Editio.; Elsevier, 2016.
- (37) Goñi, F. M. The Basic Structure and Dynamics of Cell Membranes: An Update of the Singer–Nicolson Model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2014**, 1838 (6), 1467–1476. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.006>.
- (38) Nicolson, G. L. The Fluid—Mosaic Model of Membrane Structure: Still Relevant to Understanding the Structure, Function and Dynamics of Biological Membranes after More than 40years. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2014**, 1838 (6), 1451–1466. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.10.019>.
- (39) Frisz, J. F.; Klitzing, H. A.; Lou, K.; Hutcheon, I. D.; Weber, P. K.; Zimmerberg, J.; Kraft, M. L. Sphingolipid Domains in the Plasma Membranes of Fibroblasts Are Not Enriched with Cholesterol. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, 288 (23), 16855–16861. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.473207>.
- (40) Latorre, R. *Biofísica y Fisiología Celular*; Universidad de Sevilla, 1996.
- (41) Janmey, P. A.; Kinnunen, P. K. J. Biophysical Properties of Lipids and Dynamic Membranes. *Trends in Cell Biology* **2006**, 16 (10), 538–546. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.08.009>.
- (42) Epand, R. M. Introduction to Membrane Lipids. In *Methods in Membrane Lipids*; Owen, D., Ed.; Humana Press: New York, NY, 2015; pp 1–6. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1752-5_1.
- (43) Dowhan, W.; Bogdanov, M.; Mileykovskaya, E. Functional Roles of Lipids in Membranes. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* **2016**, 1–40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63438-2.00001-8>.
- (44) Blanco, A.; Blanco, G. Membranes. In *Medical Biochemistry*; Academic Press, 2017; pp 215–

250. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803550-4.00011-2>.

- (45) Huang, C.; Li, S. Calorimetric and Molecular Mechanics Studies of the Thermotropic Phase Behavior of Membrane Phospholipids. *Biochimica et biophysica acta* **1999**, *1422* (3), 273–307.
- (46) Lewis, R. N. A. .; McElhaney, R. N. The Mesomorphic Phase Behavior of Lipid Bilayers. In *The structure of biological membranes*; Yeagle, P., Ed.; CRC Press, 2012; pp 20–75.
- (47) Abuja, P. M.; Albertini, R. Methods for Monitoring Oxidative Stress, Lipid Peroxidation and Oxidation Resistance of Lipoproteins. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **2001**, *306* (1–2), 1–17.
- (48) Çimen, M. Y. B. Free Radical Metabolism in Human Erythrocytes. *Clinica Chimica Acta* **2008**, *390* (1–2), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.12.025>.
- (49) Blake, D. R.; Allen, R. Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. *Annals of the Rheumatic Diseases* **1988**, *47* (9), 792.
- (50) Koppenol, W. H. Thermodynamic Considerations on the Formation of Reactive Species from Hypochlorite, Superoxide and Nitrogen Monoxide. Could Nitrosyl Chloride Be Produced by Neutrophils and Macrophages? *FEBS letters* **1994**, *347* (1), 5–8.
- (51) Halliwell, B. Biochemistry of Oxidative Stress. *Biochemical Society Transactions* **2007**, *35* (5), 1147–1150. <https://doi.org/10.1042/BST0351147>.
- (52) Vissers, M. C.; Stern, A.; Kuypers, F.; van den Berg, J.; Winterbourn, C. C. Membrane Changes Associated with Lysis of Red Blood Cells by Hypochlorous Acid. *Free radical biology & medicine* **1994**, *16* (6), 703–712. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)90185-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90185-6).
- (53) Zavodnik, I. B.; Lapshina, E. A.; Zavodnik, L. B.; Bartosz, G.; Soszynski, M.; Bryszewska, M. Hypochlorous Acid Damages Erythrocyte Membrane Proteins and Alters Lipid Bilayer Structure and Fluidity. *Free radical biology & medicine* **2001**, *30* (4), 363–369. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00479-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00479-2).
- (54) Favero, T. G.; Colter, D.; Hooper, P. F.; Abramson, J. J. Hypochlorous Acid Inhibits Ca(2+) -ATPase from Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum. *Journal of Applied Physiology* **1998**, *84* (2), 425–430. <https://doi.org/10.1152/jappl.1998.84.2.425>.
- (55) Epstein, F. H.; Weiss, S. J. Tissue Destruction by Neutrophils. *New England Journal of Medicine* **1989**, *320* (6), 365–376. <https://doi.org/10.1056/NEJM198902093200606>.
- (56) Malech, H. L.; Gallin, J. I. Neutrophils in Human Diseases. *New England Journal of Medicine* **1987**, *317* (11), 687–694. <https://doi.org/10.1056/NEJM198709103171107>.
- (57) Malle, E.; Buch, T.; Grone, H.-J. Myeloperoxidase in Kidney Disease. *Kidney International* **2003**, *64* (6), 1956–1967. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00336.x>.
- (58) Ohshima, H.; Tatemichi, M.; Sawa, T. Chemical Basis of Inflammation-Induced Carcinogenesis. *Archives of biochemistry and biophysics* **2003**, *417* (1), 3–11.
- (59) Rosilio, V. How Can Artificial Lipid Models Mimic the Complexity of Molecule–Membrane Interactions? *Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly* **2018**, *27*, 107–146. <https://doi.org/10.1016/BS.ABL.2017.12.004>.
- (60) Salehi-Reyhani, A.; Ces, O.; Elani, Y. Artificial Cell Mimics as Simplified Models for the Study

- of Cell Biology. *Experimental Biology and Medicine* **2017**, *242* (13), 1309–1317. <https://doi.org/10.1177/1535370217711441>.
- (61) Lybarger, R. Z.; Costantino, M.; Ramkumar, A.; Ray, B. D.; Petrache, H. I. Interactions of Lipid Multilayers in the Presence of ATP. *Biophysical Journal* **2018**, *114* (3), 361. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.11.2004>.
- (62) Suwalsky, M. Phospholipid Bilayers. In *Polymeric Materials Encyclopedia*; Salamone, J., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1996; pp 5073–5078.
- (63) Peetla, C.; Stine, A.; Labhasetwar, V. Biophysical Interactions with Model Lipid Membranes: Applications in Drug Discovery and Drug Delivery. *Molecular Pharmaceutics* **2009**, *6* (5), 1264–1276. <https://doi.org/10.1021/mp9000662>.
- (64) Eeman, M.; Deleu, M. From Biological Membranes to Biomimetic Model Membranes. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement/Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* **2010**, *14* (4), 719–736.
- (65) de Oliveira, S.; Saldanha, C. An Overview about Erythrocyte Membrane. *Clinical hemorheology and microcirculation* **2010**, *44* (1), 63–74. <https://doi.org/10.3233/CH-2010-1253>.
- (66) Lim, G.; Wortis, M.; Mukhopadhyay, R. Soft Matter. In *Soft Matter*; Gompper, G., Schick, M., Eds.; Wiley-VCH, 2006; pp 83–202.
- (67) Lim H. W., G.; Wortis, M.; Mukhopadhyay, R. Stomatocyte-Discocyte-Echinocyte Sequence of the Human Red Blood Cell: Evidence for the Bilayer- Couple Hypothesis from Membrane Mechanics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99* (26), 16766–16769. <https://doi.org/10.1073/pnas.202617299>.
- (68) Steck, T. L.; Ye, J.; Lange, Y. Probing Red Cell Membrane Cholesterol Movement with Cyclodextrin. *Biophysical Journal* **2002**, *83* (4), 2118–2125. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)73972-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)73972-6).
- (69) Saffari, Y.; Sadrzadeh, S. M. H. Green Tea Metabolite EGCG Protects Membranes against Oxidative Damage in Vitro. *Life Sciences* **2004**, *74* (12), 1513–1518. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2003.08.019>.
- (70) Farag, M. R.; Alagawany, M. Erythrocytes as a Biological Model for Screening of Xenobiotics Toxicity. *Chemico-Biological Interactions* **2018**, *279*, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.11.007>.
- (71) Shtelman, E.; Tomer, A.; Kolusheva, S.; Jelinek, R. Imaging Membrane Processes in Erythrocyte Ghosts by Surface Fusion of a Chromatic Polymer. *Analytical Biochemistry* **2006**, *348* (1), 151–153. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.10.028>.
- (72) Dodge, J. T.; Mitchell, C.; Hanahan, D. J. The Preparation and Chemical Characteristics of Hemoglobin-Free Ghosts of Human Erythrocytes. *Archives of biochemistry and biophysics* **1963**, *100*, 119–130. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(63\)90042-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(63)90042-0).
- (73) Tyler, A. I. I.; Law, R. V.; Seddon, J. M. X-Ray Diffraction of Lipid Model Membranes. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*; 2015; Vol. 1232, pp 199–225. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1752-5_16.
- (74) Preston Mason, R.; Tulenko, T. N.; Jacob, R. F. Direct Evidence for Cholesterol Crystalline Domains in Biological Membranes: Role in Human Pathobiology. *Biochimica et biophysica acta*

2003, 1610 (2), 198–207.

- (75) Sun, S. F. Small-Angle X-Ray Scattering, Neutron Scattering, and Laser Light Scattering. In *Physical Chemistry of Macromolecules*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2004; pp 371–398. <https://doi.org/10.1002/0471623571.ch16>.
- (76) Marsh, D. Lateral Order in Gel, Subgel and Crystalline Phases of Lipid Membranes: Wide-Angle X-Ray Scattering. *Chemistry and physics of lipids* **2012**, 165 (1), 59–76. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.11.001>.
- (77) Kiselev, M. A.; Lombardo, D. Structural Characterization in Mixed Lipid Membrane Systems by Neutron and X-Ray Scattering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2017**, 1861 (1), 3700–3717. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.04.022>.
- (78) Lewis, R. N. A. H.; Mannock, D. A.; McElhaney, R. N. Differential Scanning Calorimetry in the Study of Lipid Phase Transitions in Model and Biological Membranes. In *Methods in Membrane Lipids*; Dopico, A. M., Ed.; Humana Press: New Jersey, 2007; pp 171–195. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-519-0_12.
- (79) Lakowicz, J. R. Fluorescence Anisotropy. In *Principles of fluorescence spectroscopy*; Springer: New York, 2006; pp 353–382.
- (80) Ionescu, D.; Margina, D.; Ilie, M.; Iftime, A.; Ganea, C. Quercetin and Epigallocatechin-3-Gallate Effect on the Anisotropy of Model Membranes with Cholesterol. *Food and Chemical Toxicology* **2013**, 61, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.03.007>.
- (81) Parasassi, T.; Gratton, E. Membrane Lipid Domains and Dynamics as Detected by Laurdan Fluorescence. *Journal of Fluorescence* **1995**, 5 (1), 59–69. <https://doi.org/10.1007/bf00718783>.
- (82) Golfetto, O.; Hinde, E.; Gratton, E. The Laurdan Spectral Phasor Method to Explore Membrane Micro-Heterogeneity and Lipid Domains in Live Cells. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*; 2015; Vol. 1232, pp 273–290. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1752-5_19.
- (83) Brustolon, M.; Giamello, G. *Electron Paramagnetic Resonance : A Practitioner's Toolkit*; Wiley, 2009.
- (84) Guzzi, R.; Bartucci, R. Electron Spin Resonance of Spin-Labeled Lipid Assemblies and Proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2015**, 580, 102–111. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2015.06.015>.
- (85) Gordon-Grossman, M.; Zimmermann, H.; Wolf, S. G.; Shai, Y.; Goldfarb, D. Investigation of Model Membrane Disruption Mechanism by Melittin Using Pulse Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy and Cryogenic Transmission Electron Microscopy. *The Journal of Physical Chemistry B* **2012**, 116 (1), 179–188. <https://doi.org/10.1021/jp207159z>.
- (86) Man, D.; Olchawa, R.; Kubica, K. Membrane Fluidity and the Surface Properties of the Lipid Bilayer: ESR Experiment and Computer Simulation. *Journal of Liposome Research* **2010**, 20 (3), 211–218. <https://doi.org/10.3109/08982100903286485>.
- (87) Paredes, A. M. Scanning Electron Microscopy. In *Encyclopedia of food microbiology*; Batt, C. A., Tortorello, M. Lou, Eds.; Elsevier Ltd, 2014; p 3248.
- (88) Inkson, B. J. Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM) for Materials Characterization. In *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*; Gerhard, H., Altpeter, I., Tschuncky, R., Herrmann, H.-G., Eds.;

- Woodhead Publishing, 2016; pp 17–43. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100040-3.00002-X>.
- (89) Allen, T. D.; Goldberg, M. W. Scanning Electron Microscopy in Cell Biology. *Encyclopedia of Cell Biology* **2016**, 2, 14–21. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.20005-9>.
- (90) Pattabhi, V.; Gautham, N. *Biophysics*, 2nd Editio.; Alpha Science International, 2009.
- (91) Vinhal Costa Orsine, J.; Vinhal Da Costa, R.; Carvalho Da Silva, R.; De, M.; Menezes, F.; Santos, A.; Carvalho, M. R.; Novaes, G. The Acute Cytotoxicity and Lethal Concentration (LC 50) of *Agaricus Sylvaticus* through Hemolytic Activity on Human Erythrocyte. *International Journal of Nutrition and Metabolism* **2012**, 4 (11), 19–23. <https://doi.org/10.5897/IJNAM11.064>.
- (92) Manaargadoo-Catin, M.; Ali-Cherif, A.; Pougna, J.-L.; Perrin, C. Hemolysis by Surfactants — A Review. *Advances in Colloid and Interface Science* **2016**, 228, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.10.011>.
- (93) Macías-Martínez, B. I.; Cortés-Hernández, D. A.; Zugasti-Cruz, A.; Cruz-Ortíz, B. R.; Múzquiz-Ramos, E. M. Heating Ability and Hemolysis Test of Magnetite Nanoparticles Obtained by a Simple Co-Precipitation Method. *Journal of Applied Research and Technology* **2016**, 14 (4), 239–244. <https://doi.org/10.1016/J.JART.2016.05.007>.
- (94) Visser, M. C.; Winterbourn, C. C. Oxidation of Intracellular Glutathione after Exposure of Human Red Blood Cells to Hypochlorous Acid. *The Biochemical journal* **1995**, 307 (1), 57–62. <https://doi.org/10.1042/bj3070057>.
- (95) Suwalsky, M.; Colina, J. R.; Gallardo, M. J.; Jemiola-Rzeminska, M.; Strzalka, K.; Manrique-Moreno, M.; Sepúlveda, B. Antioxidant Capacity of Gallic Acid in Vitro Assayed on Human Erythrocytes. *The Journal of membrane biology* **2016**, 249 (6), 769–779. <https://doi.org/10.1007/s00232-016-9924-z>.
- (96) Marsh, D. *Handbook of Lipid Bilayers*, 2nd ed.; CRC Press, 2013. <https://doi.org/10.1201/b11712>.
- (97) do Canto, A. M. T. M.; Robalo, J. R.; Santos, P. D.; Carvalho, A. J. P.; Ramalho, J. P. P.; Loura, L. M. S. Diphenylhexatriene Membrane Probes DPH and TMA-DPH: A Comparative Molecular Dynamics Simulation Study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2016**, 1858 (11), 2647–2661. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2016.07.013>.
- (98) Jajić, I.; Wiśniewska-Becker, A.; Sarna, T.; Jemioła-Rzemińska, M.; Strzałka, K. EPR Spin Labeling Measurements of Thylakoid Membrane Fluidity during Barley Leaf Senescence. *Journal of Plant Physiology* **2014**, 171 (12), 1046–1053. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.03.017>.
- (99) Pawlikowska-Pawłęga, B.; Misiak, L. E.; Jarosz-Wilkoszka, A.; Zarzyka, B.; Paduch, R.; Gawron, A.; Gruszecki, W. I. Biophysical Characterization of Genistein–Membrane Interaction and Its Correlation with Biological Effect on Cells — The Case of EYPC Liposomes and Human Erythrocyte Membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2014**, 1838 (8), 2127–2138. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.04.029>.
- (100) Petit, K.; Suwalsky, M.; Colina, J. R.; Aguilar, L. F.; Jemiola-Rzeminska, M.; Strzalka, K. In Vitro Effects of the Antitumor Drug Miltefosine on Human Erythrocytes and Molecular Models of Its Membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2019**, 1861 (1), 17–25. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2018.10.009>.

- (101) Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R. M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology* **1999**, *299*, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).
- (102) Cittan, M.; Altuntaş, E.; Çelik, A. Evaluation of Antioxidant Capacities and Phenolic Profiles in Tilia Cordata Fruit Extracts: A Comparative Study to Determine the Efficiency of Traditional Hot Water Infusion Method. *Industrial Crops and Products* **2018**, *122*, 553–558. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.044>.
- (103) McIntosh, T. J. Differences in Hydrocarbon Chain Tilt between Hydrated Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylcholine Bilayers. A Molecular Packing Model. *Biophysical Journal* **1980**, *29* (2), 237–245. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(80\)85128-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(80)85128-9).
- (104) Riske, K. A.; Barroso, R. P.; Vequi-Suplicy, C. C.; Germano, R.; Henriques, V. B.; Lamy, M. T. Lipid Bilayer Pre-Transition as the Beginning of the Melting Process. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2009**, *1788* (5), 954–963. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.01.007>.
- (105) Zhao, L.; Feng, S.-S.; Kocherginsky, N.; Kostetski, I. DSC and EPR Investigations on Effects of Cholesterol Component on Molecular Interactions between Paclitaxel and Phospholipid within Lipid Bilayer Membrane. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *338* (1–2), 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.01.045>.
- (106) Sanchez, S. A.; Tricceri, M. A.; Gratton, E. Laurdan Generalized Polarization Fluctuations Measures Membrane Packing Micro-Heterogeneity in Vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2012**, *109* (19), 7314–7319. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118288109>.
- (107) Prendergast, F. G.; Haugland, R. P.; Callahan, P. J. 1-[4-(Trimethylamino)Phenyl]-6-Phenylhexa-1,3,5-Triene: Synthesis, Fluorescence Properties and Use as a Fluorescence Probe of Lipid Bilayers. *Biochemistry* **1981**, *20* (26), 7333–7338. <https://doi.org/10.1021/bi00529a002>.
- (108) Turgeon, M. L. *Clinical Hematology: Theory and Procedures*, 5th ed.; Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2012. <https://doi.org/10.1093/ajcp/102.2.265>.
- (109) Bento, C.; Gonçalves, A. C.; Silva, B.; Silva, L. R. Assessing the Phenolic Profile, Antioxidant, Antidiabetic and Protective Effects against Oxidative Damage in Human Erythrocytes of Peaches from Fundão. *Journal of Functional Foods* **2018**, *43*, 224–233. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2018.02.018>.
- (110) Spínola, V.; Pinto, J.; Castilho, P. C. Identification and Quantification of Phenolic Compounds of Selected Fruits from Madeira Island by HPLC-DAD–ESI–MSⁿ and Screening for Their Antioxidant Activity. *Food Chemistry* **2015**, *173*, 14–30. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.163>.
- (111) Parveen, I.; Winters, A.; Threadgill, M. D.; Hauck, B.; Morris, P. Extraction, Structural Characterisation and Evaluation of Hydroxycinnamate Esters of Orchard Grass (*Dactylis Glomerata*) as Substrates for Polyphenol Oxidase. *Phytochemistry* **2008**, *69* (16), 2799–2806. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.08.019>.
- (112) Lin, L.-Z.; Harnly, J. M. Identification of the Phenolic Components of Chrysanthemum Flower (*Chrysanthemum Morifolium* Ramat). *Food Chemistry* **2010**, *120* (1), 319–326. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2009.09.083>.

- (113) Wyrepkowski, C.; Gomes da Costa, D.; Sinhorin, A.; Vilegas, W.; De Grandis, R.; Resende, F.; Varanda, E.; dos Santos, L. Characterization and Quantification of the Compounds of the Ethanolic Extract from *Caesalpinia Ferrea* Stem Bark and Evaluation of Their Mutagenic Activity. *Molecules* **2014**, *19* (10), 16039–16057. <https://doi.org/10.3390/molecules191016039>.
- (114) Gordon, A.; Jungfer, E.; da Silva, B. A.; Maia, J. G. S.; Marx, F. Phenolic Constituents and Antioxidant Capacity of Four Underutilized Fruits from the Amazon Region. *Journal of agricultural and food chemistry* **2011**, *59* (14), 7688–7699. <https://doi.org/10.1021/jf201039r>.
- (115) Del Rio, D.; Stewart, A. J.; Mullen, W.; Burns, J.; Lean, M. E. J.; Brighenti, F.; Crozier, A. HPLC-MSn Analysis of Phenolic Compounds and Purine Alkaloids in Green and Black Tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52* (10), 2807–2815. <https://doi.org/10.1021/jf0354848>.
- (116) Stalmach, A.; Edwards, C. A.; Wightman, J. D.; Crozier, A. Identification of (Poly)Phenolic Compounds in Concord Grape Juice and Their Metabolites in Human Plasma and Urine after Juice Consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59* (17), 9512–9522. <https://doi.org/10.1021/jf2015039>.
- (117) Vallverdú-Queralt, A.; Medina-Remón, A.; Andres-Lacueva, C.; Lamuela-Raventos, R. M. Changes in Phenolic Profile and Antioxidant Activity during Production of Diced Tomatoes. *Food Chemistry* **2011**, *126* (4), 1700–1707. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.061>.
- (118) Simirgiotis, M. Antioxidant Capacity and HPLC-DAD-MS Profiling of Chilean Peumo (*Cryptocarya Alba*) Fruits and Comparison with German Peumo (*Crataegus Monogyna*) from Southern Chile. *Molecules* **2013**, *18* (2), 2061–2080. <https://doi.org/10.3390/molecules18022061>.
- (119) Fracassetti, D.; Costa, C.; Moulay, L.; Tomás-Barberán, F. A. Ellagic Acid Derivatives, Ellagitannins, Proanthocyanidins and Other Phenolics, Vitamin C and Antioxidant Capacity of Two Powder Products from Camu-Camu Fruit (*Myrciaria Dubia*). *Food Chemistry* **2013**, *139* (1–4), 578–588. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.121>.
- (120) Zhao, X.; Yuan, Z.; Fang, Y.; Yin, Y.; Feng, L. Characterization and Evaluation of Major Anthocyanins in Pomegranate (*Punica Granatum* L.) Peel of Different Cultivars and Their Development Phases. *European Food Research and Technology* **2013**, *236* (1), 109–117. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1869-6>.
- (121) Negri, G.; Santi, D. de; Tabach, R. Chemical Composition of Hydroethanolic Extracts from *Siparuna Guianensis*, Medicinal Plant Used as Anxiolytics in Amazon Region. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2012**, *22* (5), 1024–1034. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000034>.
- (122) Benayad, Z.; Gómez-Cordovés, C.; Es-Safi, N. Characterization of Flavonoid Glycosides from Fenugreek (*Trigonella Foenum-Graecum*) Crude Seeds by HPLC–DAD–ESI/MS Analysis. *International Journal of Molecular Sciences* **2014**, *15* (11), 20668–20685. <https://doi.org/10.3390/ijms151120668>.
- (123) Mämmelä, P. Phenolics in Selected European Hardwood Species by Liquid Chromatography-Electrospray Ionisation Mass Spectrometry. *The Analyst* **2001**, *126* (9), 1535–1538.
- (124) Lu, J.-L.; Wang, D.-M.; Shi, X.-G.; Yang, D.-P.; Zheng, X.-Q.; Ye, C.-X. Determination of Purine Alkaloids and Catechins in Different Parts of *Camellia Assamica* Var. *Kucha* by HPLC-DAD/ESI-MS/MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2009**, *89* (12), 2024–2029. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3683>.

- (125) Mullen, W.; Marks, S. C.; Crozier, A. Evaluation of Phenolic Compounds in Commercial Fruit Juices and Fruit Drinks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55* (8), 3148–3157. <https://doi.org/10.1021/jf062970x>.
- (126) Guo, H.; Liu, A.-H.; Ye, M.; Yang, M.; Guo, D.-A. Characterization of Phenolic Compounds in the Fruits of *Forsythia Suspensa* by High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2007**, *21* (5), 715–729. <https://doi.org/10.1002/rcm.2875>.
- (127) Parejo, I.; Jauregui, O.; Sánchez-Rabaneda, F.; Viladomat, F.; Bastida, J.; Codina, C. Separation and Characterization of Phenolic Compounds in Fennel (*Foeniculum Vulgare*) Using Liquid Chromatography–Negative Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52* (12), 3679–3687. <https://doi.org/10.1021/jf030813h>.
- (128) Gouveia, S.; Castilho, P. C. Characterisation of Phenolic Acid Derivatives and Flavonoids from Different Morphological Parts of *Helichrysum Obconicum* by a RP-HPLC–DAD(–)–ESI–MSn Method. *Food Chemistry* **2011**, *129* (2), 333–344. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.04.078>.
- (129) Zhang, J.-Y.; Li, N.; Che, Y.-Y.; Zhang, Y.; Liang, S.-X.; Zhao, M.-B.; Jiang, Y.; Tu, P.-F. Characterization of Seventy Polymethoxylated Flavonoids (PMFs) in the Leaves of *Murraya Paniculata* by on-Line High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Photodiode Array Detection and Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2011**, *56* (5), 950–961. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.08.019>.
- (130) Justesen, U. Collision-Induced Fragmentation of Deprotonated Methoxylated Flavonoids, Obtained by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2001**, *36* (2), 169–178. <https://doi.org/10.1002/jms.118>.
- (131) Moraes de Souza, R. A.; Oldoni, T. L. C.; Regitano-d’Arce, M. A. B.; Alencar, S. M. ANTIOXIDANT ACTIVITY AND PHENOLIC COMPOSITION OF HERBAL INFUSIONS CONSUMED IN BRAZIL. *Ciencia y Tecnologia Alimentaria* **2008**, *6* (1), 41–47. <https://doi.org/10.1080/11358120809487626>.
- (132) Obied, H. K.; Bedgood, D. R.; Prenzler, P. D.; Robards, K. Chemical Screening of Olive Biophenol Extracts by Hyphenated Liquid Chromatography. *Analytica Chimica Acta* **2007**, *603* (2), 176–189. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.09.044>.
- (133) Lin, L.-Z.; Harnly, J. M.; Pastor-Corrales, M. S.; Luthria, D. L. The Polyphenolic Profiles of Common Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Food Chemistry* **2008**, *107* (1), 399–410. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.038>.
- (134) Lin, L. Z.; He, X. G.; Lindenmaier, M.; Yang, J.; Cleary, M.; Qiu, S. X.; Cordell, G. A. LC-ESI-MS Study of the Flavonoid Glycoside Malonates of Red Clover (*Trifolium Pratense*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48* (2), 354–365.
- (135) Cavaliere, C.; Foglia, P.; Guarino, C.; Nazzari, M.; Samperi, R.; Laganà, A. Determination of Aflatoxins in Olive Oil by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2007**, *596* (1), 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.05.055>.
- (136) Wu, Q.; Wang, M.; Simon, J. E. Determination of Isoflavones in Red Clover and Related Species by High-Performance Liquid Chromatography Combined with Ultraviolet and Mass Spectrometric Detection. *Journal of Chromatography A* **2003**, *1016* (2), 195–209.
- (137) Cho, M. J.; Howard, L. R.; Prior, R. L.; Morelock, T. Flavonoid Content and Antioxidant

- Capacity of Spinach Genotypes Determined by High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2008**, *88* (6), 1099–1106. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3206>.
- (138) Ruiz, A.; Hermosín-Gutiérrez, I.; Mardones, C.; Vergara, C.; Herlitz, E.; Vega, M.; Dorau, C.; Winterhalter, P.; von Baer, D. Polyphenols and Antioxidant Activity of Calafate (*Berberis Microphylla*) Fruits and Other Native Berries from Southern Chile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58* (10), 6081–6089. <https://doi.org/10.1021/jf100173x>.
- (139) Favretto, D.; Flamini, R. Application of Electrospray Ionization Mass Spectrometry to the Study of Grape Anthocyanins. *American Journal of Enology and Viticulture* **2000**, *51* (1), 55–64.
- (140) ZHANG, W.-K.; XU, J.-K.; ZHANG, L.; DU, G.-H. Flavonoids from the Bran of *Avena Sativa*. *Chinese Journal of Natural Medicines* **2012**, *10* (2), 110–114. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1009.2012.00110>.
- (141) Rajbhandari, R.; Peng, N.; Moore, R.; Arabshahi, A.; Wyss, J. M.; Barnes, S.; Prasain, J. K. Determination of Cranberry Phenolic Metabolites in Rats by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59* (12), 6682–6688. <https://doi.org/10.1021/jf200673h>.
- (142) Boulekbache-Makhlouf, L.; Meudec, E.; Chibane, M.; Mazauric, J.-P.; Slimani, S.; Henry, M.; Cheynier, V.; Madani, K. Analysis by High-Performance Liquid Chromatography Diode Array Detection Mass Spectrometry of Phenolic Compounds in Fruit of *Eucalyptus Globulus* Cultivated in Algeria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58* (24), 12615–12624. <https://doi.org/10.1021/jf1029509>.
- (143) Regueiro, J.; Sánchez-González, C.; Vallverdú-Queralt, A.; Simal-Gándara, J.; Lamuela-Raventós, R.; Izquierdo-Pulido, M. Comprehensive Identification of Walnut Polyphenols by Liquid Chromatography Coupled to Linear Ion Trap–Orbitrap Mass Spectrometry. *Food Chemistry* **2014**, *152*, 340–348. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.11.158>.
- (144) Sánchez-Rabaneda, F.; Jáuregui, O.; Lamuela-Raventós, R. M.; Viladomat, F.; Bastida, J.; Codina, C. Qualitative Analysis of Phenolic Compounds in Apple Pomace Using Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry in Tandem Mode. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2004**, *18* (5), 553–563. <https://doi.org/10.1002/rcm.1370>.
- (145) Michel, P.; Dobrowolska, A.; Kicel, A.; Owczarek, A.; Bazytko, A.; Granica, S.; Piwowarski, J.; Olszewska, M. Polyphenolic Profile, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of Eastern Teaberry (*Gaultheria Procumbens* L.) Leaf Extracts. *Molecules* **2014**, *19* (12), 20498–20520. <https://doi.org/10.3390/molecules191220498>.
- (146) Bystrom, L. M.; Lewis, B. A.; Brown, D. L.; Rodriguez, E.; Obendorf, R. L. Characterization of Phenolics by LC-UV/Vis, LC-MS/MS and Sugars by GC in *Melicoccus Bijugatus* Jacq. “Montgomery” Fruits. *Food chemistry* **2008**, *111* (4), 1017–1024. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.058>.
- (147) Saldanha, L.; Vilegas, W.; Dokkedal, A. Characterization of Flavonoids and Phenolic Acids in *Myrcia Bella* Cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS Combined with NMR. *Molecules* **2013**, *18* (7), 8402–8416. <https://doi.org/10.3390/molecules18078402>.
- (148) Ding, S.; Dudley, E.; Plummer, S.; Tang, J.; Newton, R. P.; Brenton, A. G. Fingerprint Profile of Ginkgo Biloba Nutritional Supplements by LC/ESI-MS/MS. *Phytochemistry* **2008**, *69* (7), 1555–1564. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.01.026>.

- (149) Regos, I.; Urbanella, A.; Treutter, D. Identification and Quantification of Phenolic Compounds from the Forage Legume Sainfoin (*Onobrychis Viciifolia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57* (13), 5843–5852. <https://doi.org/10.1021/jf900625r>.
- (150) Wang, Y.; Guo, Z.; Jin, Y.; Zhang, X.; Wang, L.; Xue, X.; Liang, X. Identification of Prenyl Flavonoid Glycosides and Phenolic Acids in *Epimedium Koreanum* Nakai by Q-TOF-MS Combined with Selective Enrichment on “Click Oligo (Ethylene Glycol)” Column. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2010**, *51* (3), 606–616. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.09.033>.
- (151) Ivanova, V.; Stefova, M.; Vojnoski, B.; Dörnyei, Á.; Márk, L.; Dimovska, V.; Stafilov, T.; Kilár, F. Identification of Polyphenolic Compounds in Red and White Grape Varieties Grown in R. Macedonia and Changes of Their Content during Ripening. *Food Research International* **2011**, *44* (9), 2851–2860. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2011.06.046>.
- (152) Sandhu, A. K.; Gu, L. Antioxidant Capacity, Phenolic Content, and Profiling of Phenolic Compounds in the Seeds, Skin, and Pulp of *Vitis Rotundifolia* (Muscadine Grapes) As Determined by HPLC-DAD-ESI-MS *. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58* (8), 4681–4692. <https://doi.org/10.1021/jf904211q>.
- (153) Bresciani, L.; Calani, L.; Cossu, M.; Mena, P.; Sayegh, M.; Ray, S.; Del Rio, D. (Poly)Phenolic Characterization of Three Food Supplements Containing 36 Different Fruits, Vegetables and Berries. *PharmaNutrition* **2015**, *3* (2), 11–19. <https://doi.org/10.1016/J.PHANU.2015.01.001>.
- (154) Simirgiotis, M. J.; Schmeda-Hirschmann, G. Direct Identification of Phenolic Constituents in Boldo Folium (*Peumus Boldus* Mol.) Infusions by High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2010**, *1217* (4), 443–449. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.014>.
- (155) Falcão, S. I.; Tomás, A.; Vale, N.; Gomes, P.; Freire, C.; Vilas-Boas, M. Phenolic Quantification and Botanical Origin of Portuguese Propolis. *Industrial Crops and Products* **2013**, *49*, 805–812. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2013.07.021>.
- (156) Wang, Y.; Gao, L.; Shan, Y.; Liu, Y.; Tian, Y.; Xia, T. Influence of Shade on Flavonoid Biosynthesis in Tea (*Camellia Sinensis* (L.) O. Kuntze). *Scientia Horticulturae* **2012**, *141*, 7–16. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2012.04.013>.
- (157) Brito, A.; Ramirez, J.; Areche, C.; Sepúlveda, B.; Simirgiotis, M. HPLC-UV-MS Profiles of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Fruits from Three Citrus Species Consumed in Northern Chile. *Molecules* **2014**, *19* (11), 17400–17421. <https://doi.org/10.3390/molecules191117400>.
- (158) Romani, A.; Galardi, C.; Pinelli, P.; Mulinacci, N.; Heimler, D. HPLC Quantification of Flavonoids and Biflavonoids InCupressaceae Leaves. *Chromatographia* **2002**, *56* (7–8), 469–474. <https://doi.org/10.1007/BF02492011>.
- (159) Sánchez-Rabaneda, F.; Jáuregui, O.; Casals, I.; Andrés-Lacueva, C.; Izquierdo-Pulido, M.; Lamuela-Raventós, R. M. Liquid Chromatographic/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometric Study of the Phenolic Composition of Cocoa (*Theobroma Cacao*). *Journal of Mass Spectrometry* **2003**, *38* (1), 35–42. <https://doi.org/10.1002/jms.395>.
- (160) Zanutto, F.; Boldrin, P.; Varanda, E.; Souza, S.; Sano, P.; Vilegas, W.; Santos, L. Characterization of Flavonoids and Naphthopyranones in Methanol Extracts of *Paepalanthus Chiquitensis* Herzog by HPLC-ESI-IT-MSn and Their Mutagenic Activity. *Molecules* **2012**, *18* (1), 244–262. <https://doi.org/10.3390/molecules18010244>.

- (161) Goyal, M. R.; Ayeleso, A. O. *Bioactive Compounds of Medicinal Plants: Properties and Potential for Human Health*, 1st Editio.; Apple Academic Press, 2018.
- (162) Macias, F. A.; Galindo, J. C. G.; Massanet, G. M.; Rodriguez-Luis, F.; Zubia, E. Allelochemicals From *Pilocarpus Goudotianus* Leaves. *Journal of Chemical Ecology* **1993**, *19* (7), 1371–1379. <https://doi.org/10.1007/BF00984882>.
- (163) Amaro-Luis, J.; Massanet, G.; Pando, E.; Rodriguez-Luis, F.; Zubia, E. New Coumarins from *Pilocarpus Goudotianus*. *Planta Medica* **1990**, *56* (03), 304–306. <https://doi.org/10.1055/s-2006-960965>.
- (164) Suwalsky, M.; F.Villena; Gallardo, M. J. In Vitro Protective Effects of Resveratrol against Oxidative Damage in Human Erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2015**, *1848* (1), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.09.009>.
- (165) Suwalsky, M.; Ramírez, P.; Avello, M.; Villena, F.; Gallardo, M. J.; Barriga, A.; Manrique-Moreno, M. Morphological Effects and Antioxidant Capacity of *Solanum Crispum* (Natre) In Vitro Assayed on Human Erythrocytes. *The Journal of Membrane Biology* **2016**, *249* (3), 349–361. <https://doi.org/10.1007/s00232-016-9873-6>.
- (166) Suwalsky, M.; Jemiola-Rzeminska, M.; Altamirano, M.; Villena, F.; Dukes, N.; Strzalka, K. Interactions of the Antiviral and Antiparkinson Agent Amantadine with Lipid Membranes and Human Erythrocytes. *Biophysical chemistry* **2015**, *202*, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2015.04.002>.
- (167) Janiak, M. J.; Small, D. M.; Shipley, G. G. Nature of the Thermal Pretransition of Synthetic Phospholipids: Dimyristoyl- and Dipalmitoyllecithin. *Biochemistry* **1976**, *15* (21), 4575–4580. <https://doi.org/10.1021/bi00666a005>.
- (168) Benesch, M. G. K.; McElhaney, R. N. A Comparative Differential Scanning Calorimetry Study of the Effects of Cholesterol and Various Oxysterols on the Thermotropic Phase Behavior of Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayer Membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* **2016**, *195*, 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2015.11.003>.
- (169) McElhaney, R. N. The Use of Differential Scanning Calorimetry and Differential Thermal Analysis in Studies of Model and Biological Membranes. *Chemistry and physics of lipids* **1982**, *30* (2–3), 229–259.
- (170) Demetzos, C. Differential Scanning Calorimetry (DSC): A Tool to Study the Thermal Behavior of Lipid Bilayers and Liposomal Stability. *Journal of Liposome Research* **2008**, *18* (3), 159–173. <https://doi.org/10.1080/08982100802310261>.
- (171) Bothun, G. D.; Boltz, L.; Kurniawan, Y.; Scholz, C. Cooperative Effects of Fatty Acids and N-Butanol on Lipid Membrane Phase Behavior. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2016**, *139*, 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.11.054>.
- (172) Caturla, N.; Vera-Samper, E.; Villalaín, J.; Mateo, C. R.; Micol, V. The Relationship between the Antioxidant and the Antibacterial Properties of Galloylated Catechins and the Structure of Phospholipid Model Membranes. *Free radical biology & medicine* **2003**, *34* (6), 648–662. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01366-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01366-7).
- (173) Erlejman, A. G.; Verstraeten, S. V.; Fraga, C. G.; Oteiza, P. I. The Interaction of Flavonoids with Membranes: Potential Determinant of Flavonoid Antioxidant Effects. *Free Radical Research* **2004**, *38* (12), 1311–1320. <https://doi.org/10.1080/10715760400016105>.

- (174) Ulrich, N. P. Effects of Caffeic, Ferulic, and p-Coumaric Acids on Lipid Membranes. In *Coffee in Health and Disease Prevention*; Academic Press, 2015; pp 813–821. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00089-9>.
- (175) Sirk, T. W.; Brown, E. F.; Sum, A. K.; Friedman, M. Molecular Dynamics Study on the Biophysical Interactions of Seven Green Tea Catechins with Lipid Bilayers of Cell Membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56* (17), 7750–7758. <https://doi.org/10.1021/jf8013298>.
- (176) Kamihira, M.; Nakazawa, H.; Kira, A.; Mizutani, Y.; Nakamura, M.; Nakayama, T. Interaction of Tea Catechins with Lipid Bilayers Investigated by a Quartz-Crystal Microbalance Analysis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2008**, *72* (5), 1372–1375. <https://doi.org/10.1271/bbb.70786>.
- (177) Colina, J. R.; Suwalsky, M.; Manrique-Moreno, M.; Petit, K.; Aguilar, L. F.; Jemiola-Rzeminska, M.; Strzalka, K. Protective Effect of Epigallocatechin Gallate on Human Erythrocytes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2019**, *173*, 742–750. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2018.10.038>.
- (178) Maegawa, Y.; Sugino, K.; Sakurai, H. Identification of Free Radical Species Derived from Caffeic Acid and Related Polyphenols. *Free Radical Research* **2007**, *41* (1), 110–119. <https://doi.org/10.1080/10715760600943892>.
- (179) Heimburg, T. *Thermal Biophysics of Membranes*; Wiley-VCH Verlag, 2007.
- (180) Pentak, D. Alternative Methods of Determining Phase Transition Temperatures of Phospholipids That Constitute Liposomes on the Example of DPPC and DMPC. *Thermochimica Acta* **2014**, *584*, 36–44. <https://doi.org/10.1016/J.TCA.2014.03.020>.
- (181) Cláudio, A. F. M.; Ferreira, A. M.; Freire, C. S. R.; Silvestre, A. J. D.; Freire, M. G.; Coutinho, J. A. P. Optimization of the Gallic Acid Extraction Using Ionic-Liquid-Based Aqueous Two-Phase Systems. *Separation and Purification Technology* **2012**, *97*, 142–149. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2012.02.036>.
- (182) Salcedo, C. L.; Frías, M. A.; Cutro, A. C.; Nazareno, M. A.; Disalvo, E. A. Antiradical Activity of Gallic Acid Included in Lipid Interphases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2014**, *1838* (10), 2656–2661. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2014.06.019>.
- (183) Galleano, M.; Verstraeten, S. V.; Oteiza, P. I.; Fraga, C. G. Antioxidant Actions of Flavonoids: Thermodynamic and Kinetic Analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2010**, *501* (1), 23–30. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2010.04.005>.
- (184) Shahidi, F.; Ambigaipalan, P. Phenolics and Polyphenolics in Foods, Beverages and Spices: Antioxidant Activity and Health Effects – A Review. *Journal of Functional Foods* **2015**, *18*, 820–897. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2015.06.018>.
- (185) Chen, X.; Deng, Z.; Zhang, C.; Zheng, S.; Pan, Y.; Wang, H.; Li, H. Is Antioxidant Activity of Flavonoids Mainly through the Hydrogen-Atom Transfer Mechanism? *Food Research International* **2018**. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.11.018>.
- (186) Suwalsky, M.; Vargas, P.; Avello, M.; Villena, F.; Sotomayor, C. P. Human Erythrocytes Are Affected in Vitro by Flavonoids of *Aristolochia chilensis* (Maqui) Leaves. *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, *363* (1–2), 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.005>.
- (187) Suwalsky, M.; Duguet, J.; Speisky, H. An In Vitro Study of the Antioxidant and Antihemolytic

- Properties of Buddleja Globosa (Matico). *The Journal of Membrane Biology* **2017**, *250* (3), 239–248. <https://doi.org/10.1007/s00232-017-9955-0>.
- (188) Elsherbiny, N. M.; Salama, M. F.; Said, E.; El-Sherbiny, M.; Al-Gayyar, M. M. H. Crocin Protects against Doxorubicin-Induced Myocardial Toxicity in Rats through down-Regulation of Inflammatory and Apoptic Pathways. *Chemico-Biological Interactions* **2016**, *247*, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.01.014>.
- (189) Vickackaite, V.; Romani, A.; Pannacci, D.; Favaro, G. Photochemical and Thermal Degradation of a Naturally Occurring Dye Used in Artistic Painting. A Chromatographic, Spectrophotometric and Fluorimetric Study on Saffron. *International Journal of Photoenergy* **2004**, *6* (4), 175–183. <https://doi.org/10.1155/S1110662X04000224>.
- (190) Gruszecki, W. I.; Strzałka, K. Carotenoids as Modulators of Lipid Membrane Physical Properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2005**, *1740* (2), 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.11.015>.
- (191) Subczynski, W. K.; Markowska, E.; Gruszecki, W. I.; Siewiesiuk, J. Effects of Polar Carotenoids on Dimyristoylphosphatidylcholine Membranes: A Spin-Label Study. *Biochimica et biophysica acta* **1992**, *1105* (1), 97–108.
- (192) Widomska, J.; Kostecka-Gugała, A.; Latowski, D.; Gruszecki, W. I.; Strzałka, K. Calorimetric Studies of the Effect of Cis-Carotenoids on the Thermotropic Phase Behavior of Phosphatidylcholine Bilayers. *Biophysical Chemistry* **2009**, *140* (1–3), 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2008.12.002>.
- (193) Sheetz, M. P.; Singer, S. J. Biological Membranes as Bilayer Couples. A Molecular Mechanism of Drug-Erythrocyte Interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1974**, *71* (11), 4457–4461. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.11.4457>.
- (194) Pennathur, S.; Maitra, D.; Byun, J.; Sliskovic, I.; Abdulhamid, I.; Saed, G. M.; Diamond, M. P.; Abu-Soud, H. M. Potent Antioxidative Activity of Lycopene: A Potential Role in Scavenging Hypochlorous Acid. *Free Radical Biology and Medicine* **2010**, *49* (2), 205–213. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2010.04.003>.
- (195) Battistelli, M.; De Sanctis, R.; De Bellis, R.; Cucchiari, L.; Dachà, M.; Gobbi, P. Rhodiola Rosea as Antioxidant in Red Blood Cells: Ultrastructural and Hemolytic Behaviour. *European journal of histochemistry : EJH* **2005**, *49* (3), 243–254. <https://doi.org/10.4081/951>.
- (196) Dar, R. A.; Brahman, P. K.; Khurana, N.; Wagay, J. A.; Lone, Z. A.; Ganaie, M. A.; Pitre, K. S. Evaluation of Antioxidant Activity of Crocin, Podophyllotoxin and Kaempferol by Chemical, Biochemical and Electrochemical Assays. *Arabian Journal of Chemistry* **2017**, *10*, S1119–S1128. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2013.02.004>.
- (197) Casanova, E.; Baselga-Escudero, L.; Ribas-Latre, A.; Arola-Arnal, A.; Bladé, C.; Arola, L.; Salvadó, M. J. Epigallocatechin Gallate Counteracts Oxidative Stress in Docosahexaenoic Acid-Treated Myocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2014**, *1837* (6), 783–791. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.01.014>.
- (198) Gulcin, I. Antioxidant Activity of Caffeic Acid (3,4-Dihydroxycinnamic Acid). *Toxicology* **2006**, *217* (2–3), 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.09.011>.
- (199) Jomova, K.; Valko, M. Health Protective Effects of Carotenoids and Their Interactions with Other Biological Antioxidants. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *70*, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.09.054>.

- (200) Colina, J. R.; Suwalsky, M.; Manrique-Moreno, M.; Petit, K.; Aguilar, L. F.; Jemiola-Rzeminska, M.; Strzalka, K. An in Vitro Study of the Protective Effect of Caffeic Acid on Human Erythrocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2019**, *662*, 75–82. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2018.12.006>.

