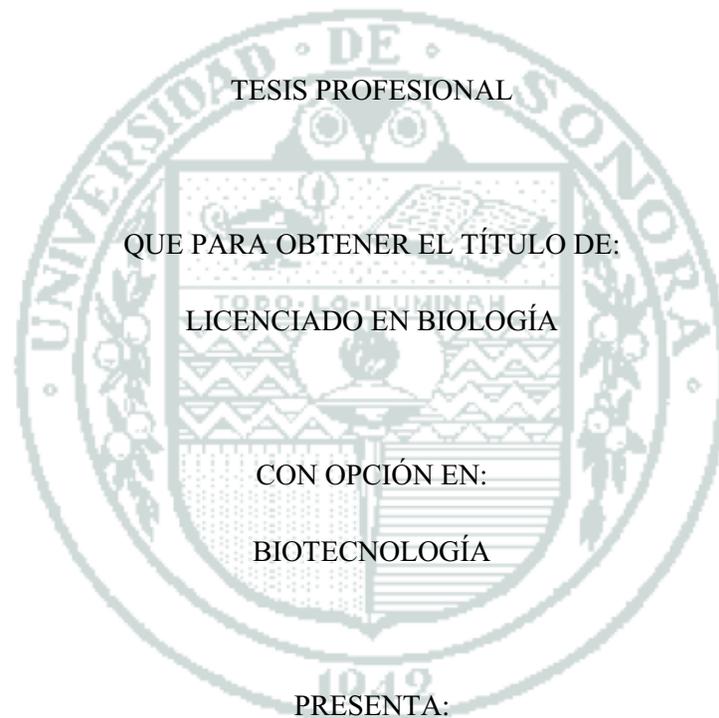


# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

INTERACCIÓN DE QUERCETINA CON MONOCAPAS DE  
DIPALMITOILFOSFATIDILCOLINA (DPPC) COMO MODELO DE MEMBRANA CELULAR



LEONARDO IBOR RUIZ ORTEGA

Hermosillo, Sonora

Agosto del 2011

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Los miembros del Comité de Tesis designado para revisar la tesis de Leonardo Ibor Ruiz Ortega la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito para obtener el Título de Licenciado en Biología con Opción en Biotecnología.

---

Dr. Miguel Ángel Valdés Covarrubias

Director de Tesis

---

Dr. Luis Ángel Medina Juárez

Sinodal Secretario

---

Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán

Sinodal

---

Dra. María Guadalupe Burboa Zazueta

Suplente

A mis padres, Irma y Leonardo.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Miguel Ángel Valdés del departamento de física de la Universidad de Sonora por darme la oportunidad de trabajar con él en su laboratorio de fluidos complejos, así como por todo su apoyo en todos los aspectos durante el desarrollo de mi trabajo de tesis.

A la Dra. María Guadalupe Burboa Zazueta del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la misma universidad por formar parte de mi comité de tesis y por el apoyo otorgado con reactivos y asesoramiento, así como su disposición en todo momento para permitirme avanzar con mi trabajo de tesis.

A mis sinodales, el Dr. Luis Medina y el Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán por aceptar formar parte del comité de revisión de tesis y los valorables consejos y correcciones que hicieron durante el proceso de revisión de mi trabajo.

A mis compañeros de laboratorio Emmanuel y Ana que me apoyaron en todo momento durante el desarrollo experimental y mi estadía en el laboratorio de fluidos complejos del departamento de física.

Al Dr. Alf Meling, coordinador de la carrera de biología por su apoyo.

A CONACYT por el apoyo otorgado al proyecto 83191.

## ÍNDICE

Acta de aprobación	i
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Índice	iv
Índice de figuras	vi
Índice de tablas	viii
<b>I.INTRODUCCIÓN</b>	1
II. Antecedentes	3
II.1.Compuestos bioactivos	3
II.2.Flavonoides	3
II.3. Interacción flavonoide membrana	4
II.4.Quercetina	4
II.5.Bioasimilación de la quercetina	5
II.6.Fosfolípidos	7
II.7.Aspectos históricos de las monocapas de Langmuir	9
II.7.1.Franklin	9
II.7.2.Agnes Pockels	9
II.7.3.Langmuir	10
II.7.4.Blodgett	11
II.8.Estructura membranal: Perspectiva histórica	12
II.8.1.Overton y Langmuir	12
II.8.2.Gorter y Grendel: la bicapa lipídica	13
II.9.Monocapas de Langmuir como modelos de membranas biológicas	15
II.10.Balanza de Langmuir	15
II.11.Medición de la presión de superficie	18
II.12.Isotermas presión superficial / área	22
II.13.Observación de las monocapas	24
<b>III.JUSTIFICACIÓN</b>	26

<b>IV.HIPÓTESIS</b>	27
<b>V.OBJETIVO GENERAL</b>	28
<b>VI.OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	28
<b>VII.METODOLOGÍA</b>	29
VII.1.Isotermas y películas Langmuir-Blodgett	29
VII.2.Diagrama general para la metodología	31
VII.3.Diagrama de flujo para la obtención de isotermas a diferentes proporciones de DPPC – Quercetina	32
VII.4.Diagrama de flujo para la realización de ciclos compresión-expansión	33
VII.5.Diagrama de flujo para los incrementos de presión	34
<b>VIII.RESULTADOS</b>	35
VIII.1.Isotermas	35
VIII.2.Microscopía de ángulo de Brewster	37
VIII.3.Incrementos de presión	38
VIII.4.Módulos elásticos	39
VIII.5.Ciclos de expansión y compresión	41
VIII.6 Microscopía de fuerza atómica	44
<b>IX.DISCUSIÓN</b>	50
<b>X.CONCLUSIONES</b>	53
<b>XI.REFERENCIAS</b>	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructuras de las subclases de flavonoides más usuales.	4
Figura 2.	Estructura química de la quercetina.	5
Figura 3.	Estructura de la quercetin-3-rutinósido.	6
Figura 4.	Estructura de la rutina, o quercetina glicosidada.	6
Figura 5.	Representación típica anfipática de los fosfolípidos	8
Figura 6.	Estructura de la fosfatidilcolina	8
Figura 7.	Línea del tiempo sobre el desarrollo de la estructura de la membrana	14
Figura 8.	Técnica de deposición	16
Figura 9.	Típica isoterma para un fosfolípido, en la cual se muestran las diferentes fases de una monocapa	17
Figura 10.	Plato de Wilhelmy	20
Figura 11.	Imagen de la balanza de Langmuir	21
Figura 12.	Isoterma esquemática y B) Orientación de las moléculas en distintas fases	22
Figura 13.	Isoterma típica de un ácido graso y un fosfolípido	23
Figura 14.	Esquema de microscopía de ángulo de Brewster (BAM)	25
Figura 15.	Esquema de microscopía de fuerza atómica	25
Figura 16.	AFM marca JEOL, modelo JSPM 4210	30
Figura 17.	Diagrama general de la metodología	31
Figura 18.	Diagrama para la obtención de películas Langmuir-Blodgett	32
Figura 19.	Diagrama para la realización de ciclos de expansión y compresión	33
Figura 20.	Diagramas para los incrementos de presión	34
Figura 21.	Isotermas a diferentes proporciones de DPPC-Quercetina	36
Figura 22.	Imágenes de microscopía de ángulo de Brewster	38
Figura 23.	Incrementos de presión en una monocapa al inyectar quercetina a diferentes presiones iniciales	39
Figura 24.	Módulos elásticos	40
Figura 25.	Ciclos de expansión y compresión para de una monocapa DPPC	41

Figura 26.	Ciclos de expansión y compresión para de una monocapa de 70-30% DPPC-quercetina	42
Figura 27.	Ciclos de expansión y compresión para de una monocapa de 90-10% DPPC-quercetina	42
Figura 28.	Diferencia de áreas en cada ciclo, para monocapas a diferentes proporciones de DPPC-Quercetina	43
Figura 29.	Imágenes de AFM en tercera dimensión	45
Figura 30.	Monocapa de 100% transferida en mica a una presión de 25 mN/m, con su respectivo análisis de altura para el eje Z	46
Figura 31.	Monocapa de 70-30% DPPC-quercetina transferida en mica a una presión de 25 mN/m	47
Figura 32.	Monocapa de 90-10% DPPC-quercetina transferida en mica a una presión de 25 mN/m. con su respectivo análisis de alturas para el eje Z	48
Figura 33.	Monocapa de 95-05% DPPC-quercetina transferida en mica a una presión de 25 mN/m con su respectivo análisis de alturas para el eje Z	49

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.	Efecto de quercetina en función de la proporción de flavonoide en las isotermas de DPPC	36
----------	---	----

## I. INTRODUCCIÓN

En este trabajo se estudia la interacción entre el fosfolípido dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) con el antioxidante perteneciente a la familia de los flavonoles conocido como quercetina, utilizando monocapas de Langmuir como modelo de membrana celular. Los flavonoides han captado gran atención recientemente gracias a sus propiedades antioxidantes y sus posibles efectos anticancerígenos que están experimentalmente demostrados como protectores celulares; sin embargo se desconocen sus mecanismos de acción en las membranas celulares (Bijal et al., 2010). Los estudios de interacción membrana-antioxidante que se han realizado utilizando liposomas o cromatografías de afinidad son muy escasos (Ollila et al., 2002). La utilización de monocapas de Langmuir nos permite obtener modelos de membrana estables donde se permite tener control estricto de las variables endógenas del sistema, así como la naturaleza, composición, presión y temperatura de la membrana. (Duncan y Larson, 2008). Los objetivos de este trabajo fueron primeramente obtener películas de Langmuir a partir de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) para biomimetizar las membranas celulares in vitro, considerando que este componente (DPPC) es una de las estructuras fundamentales de las membranas celulares animales. Seguidamente, obtener películas de mezclas a diferentes proporciones de DPPC-Quercetina, y analizar su comportamiento en la interfase aire-agua. A partir de dicha información se estudió la interacción entre una monocapa como modelo de membrana y la quercetina. Por medio de la inyección de quercetina en la subfase, se simuló un ambiente extracelular saturado con quercetina y se observaron los cambios en la presión de la monocapa causados por la intercalación de las moléculas de quercetina en la misma. Por medio de la obtención de películas Langmuir-Blodgett, se obtuvieron imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM) para observar la presencia del flavonoide en la membrana. Simultáneamente a la formación de la isoterma, también se utilizó microscopía de ángulo de Brewster (BAM) para observar la monocapa en la interfase aire-agua. La microscopía de fuerza atómica es un método novedoso de alta resolución para el análisis de cualquier superficie, incluyendo el de células vivas o modelos biológicos. Esta técnica

potente es utilizada también para la caracterización mecánica, eléctrica y magnética de muestras tanto de muestras biológicas como no biológicas, así como su estudio cuantitativo y cualitativo. La operación de AFM está basada en la detección de las fuerzas ya sean de repulsión o atracción a nivel atómico de la muestra. La interacción entre la superficie estudiada y la punta del microscopio localizado muy cerca de la muestra corresponde a la fuerza entre los átomos y los de la muestra. Una imagen de contraste es generada al monitorear las fuerzas de interacción entre la punta y la superficie estudiada (Kuznetsova et al, 2007). La importancia de conocer la interacción entre la membrana y los flavonoides ha sido descrita anteriormente por (Hendrich, 2006), quienes aseguran que, gracias a que se cree que los compuestos orgánicos presentes en las plantas tienen una influencia positiva en la salud humana, han sido utilizados como medicina. En años recientes, estos compuestos ya han sido extraídos, purificados y caracterizados químicamente y en muchos casos, su acción biológica ha sido establecida. Para muchos compuestos, el espectro de su actividad biológica ha sido ampliado, y crece constantemente más de lo esperado conforme se van realizando investigaciones sobre la base más profunda de los efectos biológicos de las biomoléculas. Los blancos de los medicamentos basados en compuestos bioactivos se localizan en distintos lugares a nivel celular. Generalmente los medicamentos atacan dentro de los compartimentos que están delimitados por membranas. Incluso en el último ejemplo, el medicamento necesita interactuar con la membrana, porque el medicamento necesita atravesar dicha membrana para llegar a su destino. Por eso mismo, la lipofilidad es una característica importante desde el punto de vista farmacológico de un compuesto y las interacciones con las membranas biológicas juegan un rol esencial en su bioactividad.

## **II. ANTECEDENTES**

### **II.1. Compuestos Bioactivos**

Los medicamentos basados en compuestos naturales juegan un rol muy importante en la investigación y en la producción de fármacos. La naturaleza es una fuente atractiva de nuevos compuestos bioactivos candidatos gracias a que podemos encontrar una diversidad química tremenda en millones de especies de plantas, animales, organismos marinos, y microorganismos (Bijal et al., 2010). Las frutas, los vegetales y las plantas contienen abundantes nutraceuticos o fitoquímicos como carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas, enzimas, fibras dietéticas, minerales, flavonoides, antocianinas y otros compuestos diversos incluyendo químicos traza. Estos compuestos pueden ser explotados para el desarrollo de nuevos medicamentos.

### **II.2. Flavonoides**

Los flavonoides son un grupo de compuestos naturales que están ampliamente distribuidos en todo el reino de las plantas. Están especialmente presentes en los vegetales y las frutas. (Hertog et al., 1992). En las últimas décadas esta clase de compuestos ha atraído atención sustancial gracias a su atribución de propiedades antioxidantes y efectos benéficos para la salud (JuQun et al., 2007). El rol de los flavonoides como los principales pigmentos de color morado, azul y rojo en plantas les han conferido gran atención en los últimos años. Desde la primera descripción de los efectos de los ácidos y las bases sobre los pigmentos vegetales por Robert Boyle en 1664, hasta la caracterización estructural y genes regulatorios en el siglo XX, bastante información ha sido colectada sobre la estructura, actividad química y biosíntesis de estos compuestos (Winkel, 2001). Interesantemente, los flavonoides y las antocianinas en los fitoquímicos podrían estar significativamente asociados con la reducción de enfermedades cardiovasculares, degeneración muscular, y prevención o incluso mejoras en tratamientos de muchas enfermedades. (Shirataki y

Motohashi, 2009). Las actividades de los flavonoides y su acción sinérgica mostrada con otros medicamentos, los convierte en una herramienta ideal en terapias alternas contra el cáncer (Bijal et al., 2010). Se sabe que los flavonoides poseen actividades anti-inflamatorias, antioxidativas, hepatoprotectoras, antitrombóticas, antivirales y anticarcinogénica (Middleton, 2000).

### II.3. Interacción Flavonoide Membrana

Algunos estudios han reportado interacciones membrana-flavonoide. Por ejemplo, se ha reportado que la incorporación de flavonoides en una membrana liposomal alteró las funciones de barrera en una bicapa. (Saija et al., 1995). También se han estudiado las interacciones de genisteína y otros isoflavonoides con micelas lipídicas y se ha sugerido que la incorporación de daidzeína en liposomas de fosfatidilcolina promovió la agregación y aceleraron su formación. (Whaley et al., 2006)

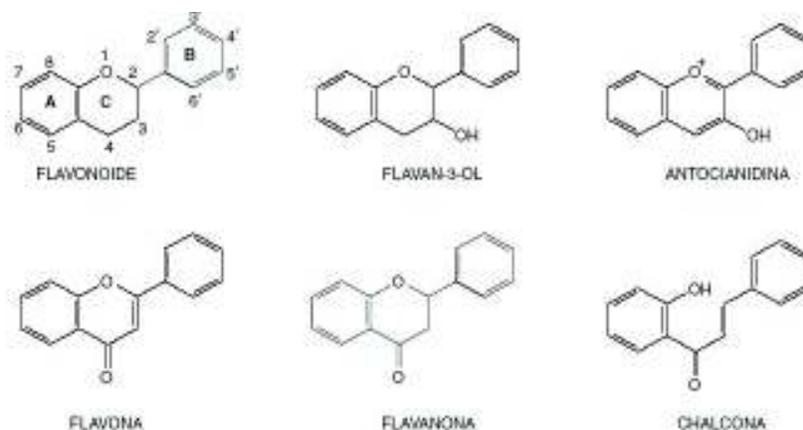


Figura 1. Estructuras de las subclases de flavonoides más usuales.

### II.4. Quercetina

La quercetina es una biomolécula de la familia de los flavonoles. Es un flavonoide derivado de las plantas, frutas, vegetales, hojas y semillas. Se usa también como suplemento

alimenticio en comidas y bebidas. A esta biomolécula se le han atribuido funciones específicas comprobadas experimentalmente que resultan benéficas para la célula tanto in vivo como in vitro. In vitro, un cultivo de células cancerosas de piel y próstata fue suprimido cuando fue tratado con una combinación de quercetina y ultrasonido (Paliwal S et al., 2005). La quercetina podría tener propiedades inhibitorias contra el cáncer, prostatitis, enfermedades cardíacas, cataratas, alergias y enfermedades respiratorias como la bronquitis y el asma (Edwards et al., 2007). Algunos estudios han revelado que la quercetina lleva a cabo funciones farmacológicas importantes dentro de las cuales se incluyen efectos antiproliferativos selectivos (Csokay, 1997), muerte celular predominantemente a través de un mecanismo apoptótico en células cancerosas pero no en células sanas (Wei YQ et al., 1994).



Figura 2. Estructura química de la quercetina.

## II.5 Bioasimilación de la Quercetina

En las plantas, la quercetina se encuentra unida a azúcares, formando glucósidos hidrofílicos muy difíciles de absorber para los seres humanos. Estos glucósidos son hidrolizados en el intestino delgado. Así, tras la hidrólisis, la quercetina aglicada es absorbida eficientemente. Un glucósido de la quercetina es la rutina. Frecuentemente, en la naturaleza, la quercetina se encuentra en forma glicosidada (derivado de los azúcares), como por ejemplo en la rutina. En la rutina, el hidrógeno del grupo hidroxilo R-4 es

reemplazado por un disacárido. La quercetina se conoce como el aglucón, es decir, la forma sin azúcares de la rutina. (Cody, 1986). En la quercetina, tal como se muestra en la Figura 2, los grupos R1, R3 y R3 son todos OH. La rutina es un glucósido de la quercetina en donde el grupo R4 es un disacárido, también conocido como rutinosa.

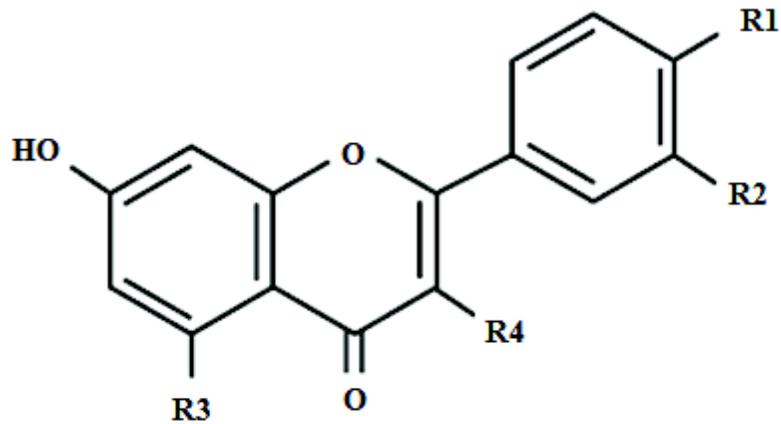


Figura 3. Estructura de la quercetin-3-rutinósido.

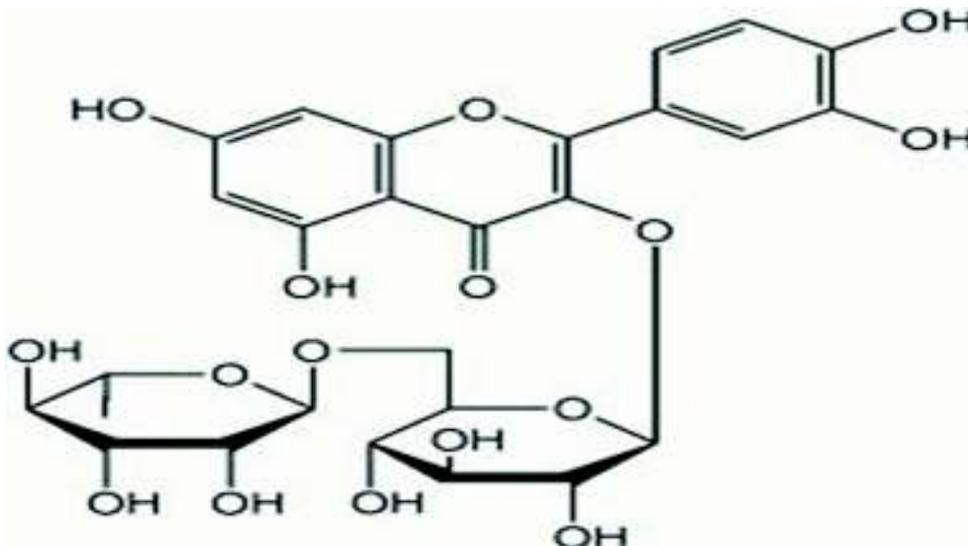


Figura 4. Estructura de la rutina, o quercetina glicosidada.

El grado de eficacia de un flavonoide in vivo reside, entre otras causas, en su bioasimilación (Holst y Williamson, 2008). Por lo tanto, es más importante conocer la capacidad de bioasimilación por parte del organismo de un nutriente o suplemento dietético procedente de un alimento específico, que saber la cantidad del mismo que está presente en el alimento (D'Archivio et al., 2007). Para ser bioasimilados, los flavonoides deben de superar ciertas barreras como la solubilidad, la permeabilidad, el metabolismo, la excreción y la captación por parte de los tejidos diana (Hu, 2007). Generalmente, los flavonoides libres (aglucones) procedentes de la dieta suelen ser absorbidos en el intestino delgado, pero en su mayoría se presentan en forma glicosilada (heterósidos o glucósidos) o en estructuras polimerizadas, lo que dificulta su absorción. La mayoría de los glucósidos resisten la hidrólisis ácida del estómago y llegan intactos al intestino. Las enzimas intestinales (glicosidasa y otras hidrolasas) o las procedentes de su microflora hidrolizan estos compuestos hasta las formas aglucon (Heim et al., 2002), convirtiéndolos en metabolitos más asimilables.

## **II.6. Fosfolípidos**

Todas las células están rodeadas y separadas de su ambiente exterior por una membrana con una permeabilidad selectiva llamada membrana plasmática, que define los límites de la célula, su perímetro celular, actuando como una barrera que separa su contenido interno (el citoplasma y núcleo) del medio externo. El modelo actual que describe la organización estructural de la membrana plasmática describe la membrana plasmática como un mosaico fluido que contiene diversas proteínas embebidas en una matriz de fosfolípidos. Los fosfolípidos en la membrana forman una bicapa lipídica con las cabezas polares dirigidas hacia el exterior y las colas hidrofóbicas hacia el interior de la bicapa. Esta tiene un grosor aproximado de 75 Å (ángstrom) o 7.5 nanómetros (nm), por ello no es posible visualizarla al microscopio óptico pero sí con el microscopio electrónico, ya que éste ofrece imágenes de la membrana plasmática en la que se pueden observar dos líneas oscuras laterales y una central más clara (Wimley, 2001)



Figura 5. Unidades con forma de cilindro (cabeza de igual tamaño que la cadena). En una bicapa abierta todas las cadenas hidrofóbicas están protegidas del agua, excepto las situadas en los bordes. Representación abreviada típica de la estructura anfipática de los fosfolípidos, con una cabeza polar hidrofílica y una cola apolar hidrofóbica.

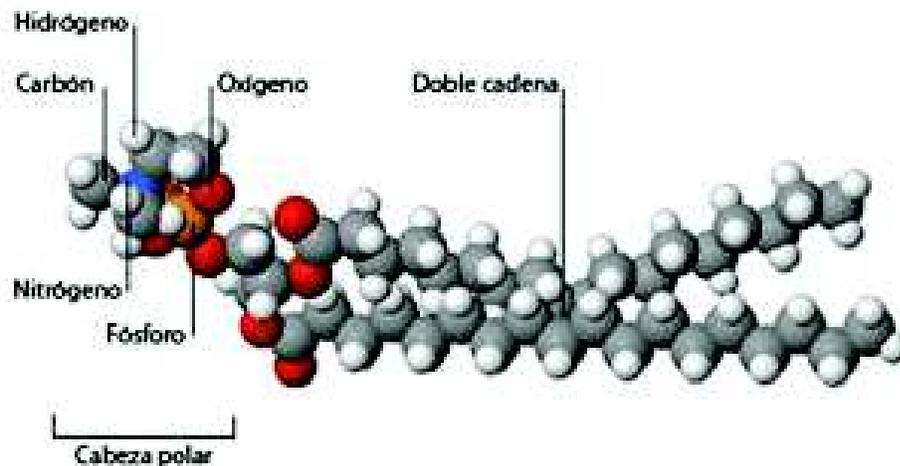


Figura 6. Estructura de la fosfatidilcolina uno de los fosfolípidos (fosfoglicérido) más comunes en las membranas biológicas. Estructura química y representación de modelos de bolas de su estructura atómica, que da una idea aproximada de la forma de la molécula. (Wimley, 2001).

Los fosfolípidos son una clase de moléculas anfífilas de gran importancia en la biología debido a que estos forman bicapas, las cuales son la principal estructura que envuelve a todas las células animales. Los fosfolípidos son lípidos complejos que consisten de grupos cabezas polares (hidrofilicos) que contienen un grupo glicerol con un grupo fosfato y dos colas hidrocarbonadas no polares (hidrofóbicas). Las colas hidrofóbicas están formadas generalmente de ácidos grasos de longitud variable con una cola teniendo uno o más dobles enlaces insaturados cis, los cuales provocan una deformación en la cola. Las variaciones en la longitud y la saturación de las colas afectan la habilidad de empaquetamiento de los fosfolípidos, por lo tanto, confieren diferentes propiedades reológicas como la fluidez a las membranas. (Morris, 2001)

## **II.7. Aspectos Históricos de las Monocapas de Langmuir.**

### **II.7.1. Franklin**

El primer intento de establecer las bases científicas de las monocapas fue hecho por Benjamín Franklin. Benjamín Franklin, a partir de simples cálculos cuantitativos reportó en 1774 que una cucharada de aceite (2 ml) depositados sobre una laguna de medio acre daba como resultado una capa de aceite de 2 nm de espesor. Cien años después Lord Rayleigh, sospechó que la extensión máxima del aceite en el agua, representa una capa delgada de una sola molécula de espesor (Roberts, 1990)

### **II.7.2. Agnes Pockels**

Rayleigh le debió las mediciones directas de tamaños moleculares al simple aparato de Agnes Pockels, que después se convirtió el modelo para lo que hoy se conoce como balanza de Langmuir. Giles y Forrester describieron su educación doméstica y el como ella trabajó en el problema por 10 años, desde que tenía 18, literalmente en su mesa de cocina. Aun así en su carta hacia Rayleigh, Pockels describió los métodos que permanecen hasta hoy en día

para el estudio esencial de las monocapas. Ella describió el uso de una tina de 70 cm x 5 cm x 2 cm, llena de agua con una vara de 1.5 cm de ancho acomodada a través de la tina, justo en contacto con el agua. De tal forma que cuando Pockels movía la vara cambiaba el área así como limpiaba la superficie del agua. Por este medio ella examinó la variación en la tensión superficial de una superficie contaminada con aceite, usando una balanza que medía la fuerza requerida para levantar un pequeño disco (un botón). Pockels descubrió que era esencial limpiar la superficie del agua primeramente pasando la vara por toda la superficie. Esta fue una técnica crítica en la cual todo el trabajo subsiguiente ha dependido (Roberts, 1990). Al leer la carta de Pockels, Rayleigh se dio cuenta inmediatamente de la importancia del simple aparato y el método que Pockels había descrito. Por lo cual, siendo consistente con su carácter de generosidad hacia quienes merecían reconocimiento, mandó la carta a la revista científica británica principal con una nota recomendando su publicación. El editor lo publicó completo junto con la nota de Rayleigh. Se sospecha que la nota de Rayleigh fue para anticipar cualquier criticismo debido a la publicación de un autor desconocido y aparentemente no profesional. Las primeras isothermas Presión-Área, tan familiares hoy en día en la investigación en monocapas, fueron publicadas por Agnes Pockels. Es sorprendente que si se trasladan los datos de Pockels a la actualidad, estos nos indican que se obtiene un área molecular para el ácido esteárico de  $2.2 \text{ nm}^2$ , la cual es correcta (Roberts, 1990).

### **II.7.3. Langmuir**

La propuesta de Rayleigh de que era posible experimentar con películas de una sola molécula de espesor incremento el nivel de actividad en este campo a pesar de quienes se mantenían escépticos con este punto de vista. Por ejemplo Devaux, usando métodos elegantes adicionales midió el espesor de varias películas y mostró que estos reasentaban diámetros moleculares. En particular, él fue el primero en esparcir polímeros como películas delgadas usando proteínas y celulosa. También reportó que la albúmina de huevo se esparce en el agua formando una monocapa muy elástica. Poco después Hardy descubrió que los aceites que no poseen grupo funcional polar no podían esparcirse en la

superficie del agua de la misma forma que los aceites animales y vegetales lo hacían (Hardy, 1939). Él fue el primero en postular la orientación de las moléculas polares en las superficies y en considerar su función en el campo de la lubricación. Por otro lado, él se equivocó en su aserción de que las fuerzas cohesivas entre las moléculas eran de largo alcance. Fue Langmuir quien resumió correctamente que las fuerzas eran de corto alcance y actuaban únicamente entre moléculas en contacto. Inspirado en Marcelini y los autores ya mencionados, Langmuir fue el responsable en establecer el fundamento científico de las películas monomoleculares (Roberts, 1990). Irving Langmuir nació el 31 de enero de 1881 en Brooklyn, Nueva York. Para las mediciones de las presiones de películas delgadas, Langmuir desarrolló un gran número de técnicas incluyendo la balanza de superficie la cual lleva su nombre. Langmuir confirmó que estas películas tenían un espesor de una sola molécula así como también que las moléculas estaban orientadas en la superficie del agua, con los grupos funcionales polares inmersos en el agua mientras que las largas colas hidrocarbonadas se orientaban casi verticalmente se orientaban hacia el aire. Sus experimentos proporcionaron fuerte evidencia de la existencia de fuerzas de corto alcance y explicaron claramente las bases en las que ciertas moléculas forman o no buenas monocapas (Roberts, 1990)

#### **II.7.4. Blodgett**

Katherin Blodgett se unió al laboratorio de investigación de General Electric en Schenectady en 1919. Su maestría la obtuvo en la Universidad de Chicago. Ella mantiene la distinción de ser la primera mujer científica en incorporarse al laboratorio de investigación de GE y la primera en obtener su doctorado en el laboratorio Cavendish en Cambridge, Inglaterra. Para 1919 Blodgett, bajo el asesoramiento de Langmuir, fue capaz de transferir una monocapa de ácidos grasos de la superficie del agua a sustratos sólidos como portaobjetos de vidrio. La construcción de ensamblajes en monocapas se conoce hoy en día como películas Langmuir-Blodgett (LB) y se distinguen de las películas de Langmuir que son solamente monocapas flotantes sobre una subfase acuosa. El primer reporte formal de la preparación de una película Langmuir-Blodgett apareció hasta 1935 (con una fecha de

recepción de Enero 24 de 1934). El retraso fue debido a que Langmuir y Blodgett estaban activamente involucrados en el período de 1919-1934 en diversas áreas de investigación de importancia para su compañía, General Electric. Posteriormente Blodgett se concentró en las propiedades ópticas de multicapas mientras que Langmuir en monocapas de proteínas (Roberts, 1990)

## **II. 8. Estructura Membranal: Perspectiva Histórica**

### **II.8.1. Overton y Langmuir.**

Las membranas biológicas son estructuras delgadas que normalmente se pueden visualizar solamente con microscopía electrónica. Es por lo tanto, que no nos sorprende que los estudios más primitivos sobre membranas fueran indirectos y no dependieron de algún tipo de microscopía. Un buen punto de partida para el estudio histórico de las membranas celulares es el trabajo pionero de Charles E. Overton en la década de 1890. Overton pensó que todas las células parecían estar envueltas en algún tipo de barrera permeable selectiva que permitía el intercambio de algunas sustancias mientras que otras no. El razonó que la habilidad de una sustancia para cruzar la membrana debía estar relacionada de alguna manera con su afinidad química por la membrana. Trabajando con células vegetales y raíces, Overton encontró que las sustancias liposolubles penetraban fácilmente en las células, mientras que las sustancias hidrosolubles en general no lo hacían. De hecho, él encontró una buena correlación entre la naturaleza lipofílica de las sustancias y la capacidad que tenían las mismas para penetrar dentro de una célula. Overton concluyó que las propiedades de solubilidad de la membrana celular se aproximaban a las de un ácido graso, y sugirió que la membrana celular estaba compuesta probablemente de una mezcla de colesterol y lecitina. El próximo avance importante surgió una década después, a través del trabajo de Irving Langmuir, quien estudio el comportamiento de lípidos como los ácidos grasos de doble cadena, depositando los mismos como una capa delgada en una superficie de agua, la cual después sería llamada balanza de Langmuir. Los lípidos fueron primero

disueltos en benceno y muestras de soluciones de lípidos disueltos en benceno fueron depositados sobre la superficie del agua. Cuando el benceno se evaporaba, las moléculas del lípido quedaban sobre la superficie del agua formando una monocapa. La orientación que presentaban las moléculas era con las cabezas hidrofílicas en el agua, y la región hidrofóbica en contacto con el aire. La monocapa lipídica se convirtió en la base para las investigaciones futuras sobre la estructura de la membrana celular (Becker y Deamer, 1991)

### **II.8.2. Gorter y Grendel: la bicapa lipídica**

El próximo evento mayor, vino en 1925 cuando los fisiólogos Gorter y Grendel leyeron los artículos de Langmuir y pensaron que las monocapas podrían ayudar a responder algunas preguntas sobre el recubrimiento superficial de los glóbulos rojos. ¿Cuántas capas de lípidos podría haber en el recubrimiento? Gorter y Grendel podían observar en su microscopio que el glóbulo rojo se asemejaba a una esfera aplanada de alrededor de 7  $\mu\text{m}$  de diámetro. Por lo tanto, el área de superficie de un volumen conocido de glóbulos rojos podría ser estimado contando las células y multiplicándolas por  $100 \mu\text{m}^2$ , la cual era la aproximación más acertada que pudieron hacer sobre el área de un glóbulo rojo humano, calculado a partir del diámetro observado. Ellos decidieron extraer los lípidos de los glóbulos, esparcirlos sobre la balanza de Langmuir para formar una monocapa y comparar el área con el área combinada de los glóbulos rojos. Si los lípidos estuviesen presentes en los glóbulos rojos como una monocapa, el área resultante en la balanza sería semejante a la calculada del volumen de los glóbulos. Una bicapa, representaría el doble del área y así sucesivamente. Cuando el experimento concluyó, encontraron que el área de la monocapa del lípido en el agua era aproximadamente el doble del área total estimada para las células. Gorter y Grendel concluyeron que el recubrimiento de los glóbulos rojos consistía en una barrera bimolecular, es decir, una bicapa lipídica (Becker y Deamer, 1991).

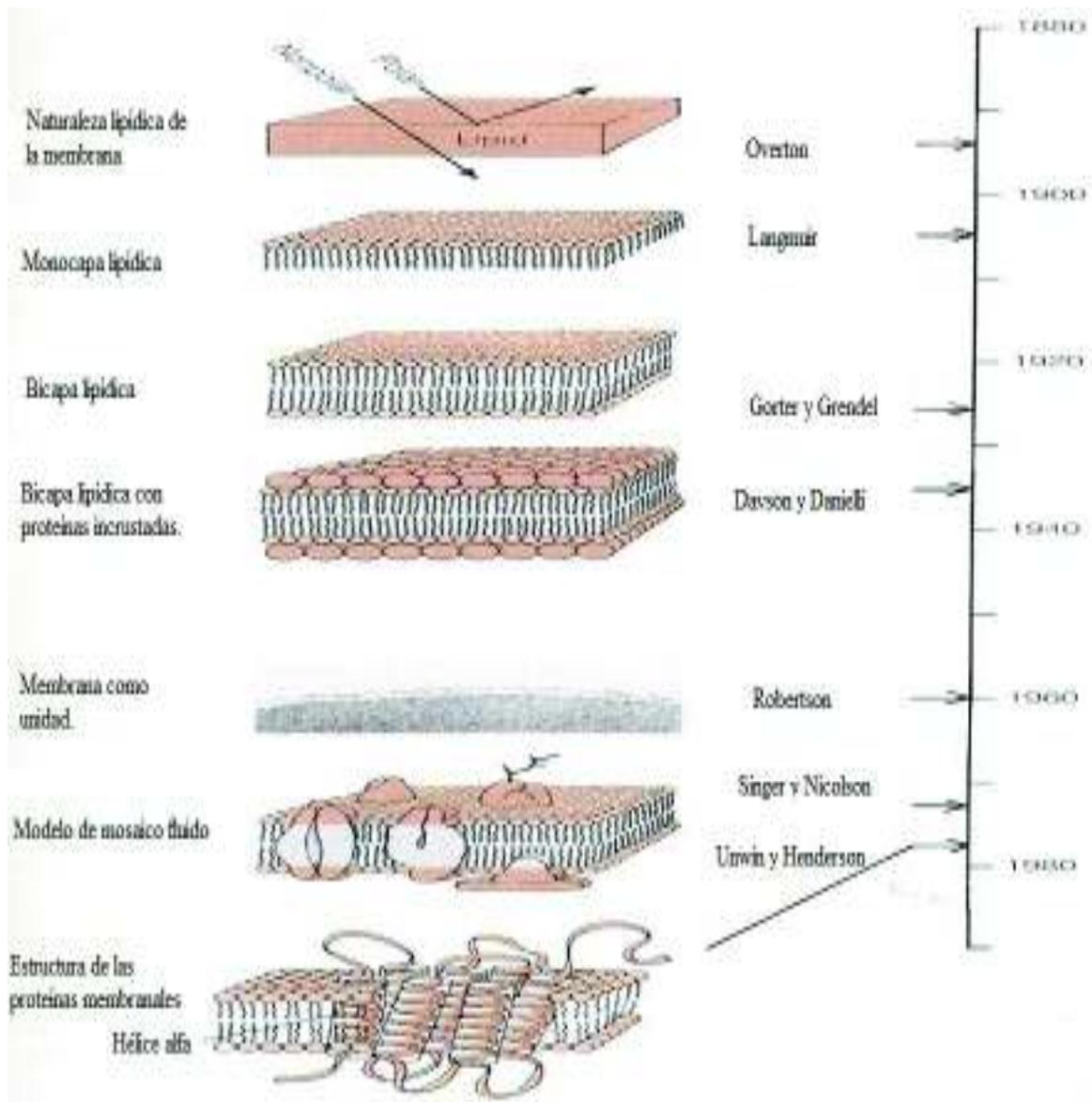


Figura 7. Línea del tiempo sobre el desarrollo de la estructura de la membrana

## **II.9. Monocapas de Langmuir como Modelos de Membranas Biológicas**

Para el estudio de la interacción de compuestos bioactivos y membranas celulares existen algunas posibilidades. Se puede trabajar con células vivas *in situ*, experimentar con ellas y ver qué pasa, o se pueden aislar membranas celulares. Existen también otros métodos como la formación de vesículas o liposomas, pero presentan algunas desventajas. De cualquier forma una membrana celular posee proteínas incrustadas en la misma, y por medio de vesículas o liposomas quedan muchos factores sobre los cuales no se puede tener ningún control, de tal forma que solo permiten investigar fenómenos de forma global. Por otro lado, con un sistema de monocapas, se pueden controlar parámetros como la naturaleza y el empaquetamiento de los fosfolípidos, la composición de la subfase y la temperatura. El interés en las monocapas como modelos de membrana biológica reside también en su homogeneidad, su estabilidad y geometría donde las moléculas lipídicas poseen una orientación específica (Maget-Dana, 1999).

## **II.10. Balanza de Langmuir**

Las fuerzas cohesivas entre las moléculas de un líquido son las responsables del fenómeno conocido como tensión superficial. Las moléculas en la superficie de un líquido no poseen otras moléculas adjuntas en todos sus lados y consecuentemente sufren una cohesión más fuerte con otras moléculas directamente asociadas en la superficie. La superficie de un líquido se comporta como si estuviera cubierta por una membrana elástica. La diferencia entre la tensión superficial en un líquido puro y la tensión superficial de la interfase en presencia de una monocapa de moléculas anfifílicas evaluada al tiempo en que se mide, se conoce como presión superficial. Esta se mide con las mismas unidades de la tensión superficial. A las gráficas que relacionan la presión superficial con el área ocupada por las moléculas anfifílicas en varios estados de compresión se les conoce como isoterma de presión superficial. Se utilizan para caracterizar los cambios conformacionales que sufren las moléculas bajo una compresión bidimensional (Adamson, 2004).

La balanza de Langmuir generalmente consiste de una tina rectangular de teflón con barreras móviles de teflón para delimitar el área de superficie, así como algún medio para monitorear la tensión superficial de algún líquido, usualmente una delicada balanza que cuantifica la fuerza que actúa sobre un trozo de cristal o un aro de metal inmerso en la superficie del líquido. La película interfacial puede ser formada de dos maneras y estas son parcialmente dependientes de la solubilidad del material de interés. Primeramente, depositando por goteo la solución sobre la superficie del líquido; esta técnica se conoce como deposición. Alternativamente, para algunas moléculas solubles activas en la interfase como las proteínas, la película interfacial puede ser formada sencillamente llenando la balanza con una solución de la muestra y permitiendo que las moléculas se adsorban hacia la interfase por autoensamblaje; esta técnica se conoce como adsorción (Morris, 2001).

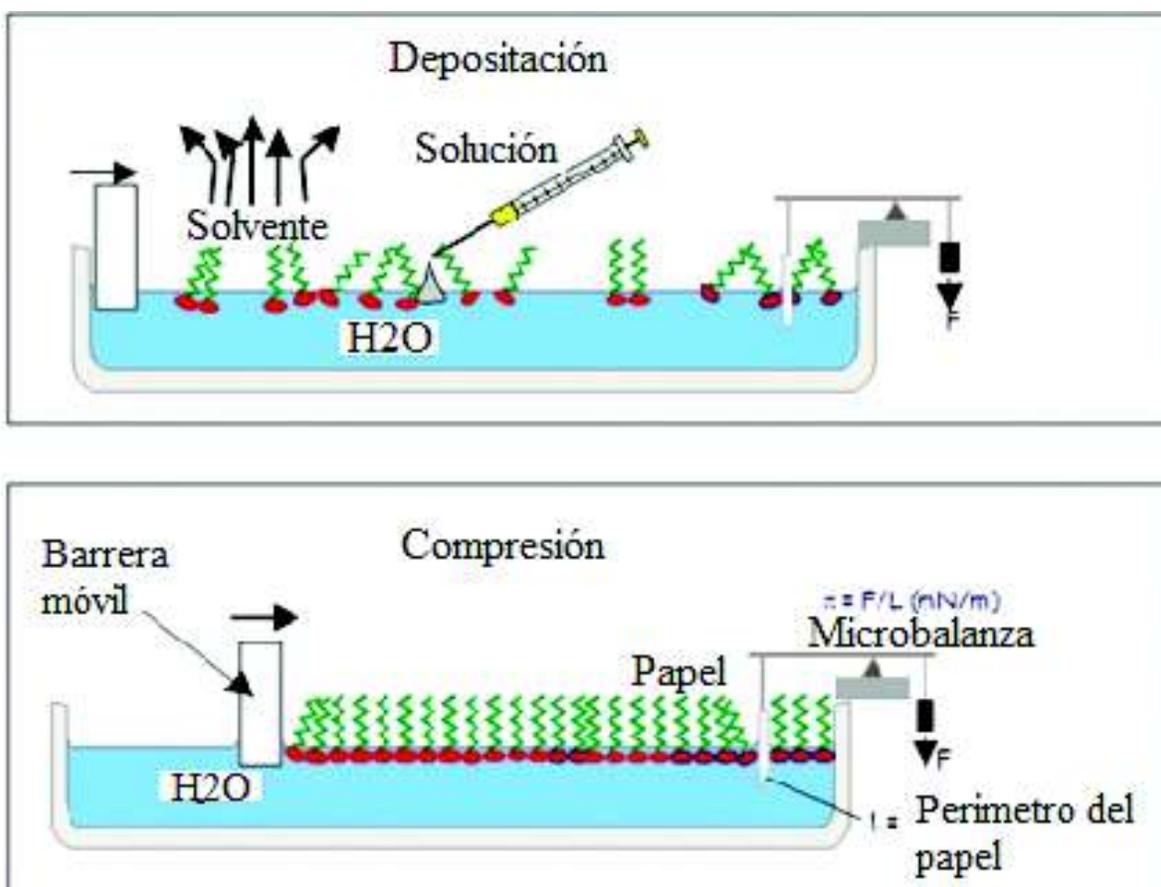


Figura 8. Técnica de deposición.

La presión de superficie define la tendencia de una superficie a esparcirse de forma análoga a la de un gas, pero esta confinada a un área de dos dimensiones a diferencia de un volumen tridimensional. La presión de superficie se define como la diferencia entre la tensión superficial de una superficie desnuda ( $\gamma_0$ ) y la tensión superficial de una película interfacial ( $\gamma_1$ ) y está dada por:

$$\Pi = (\gamma_0) - (\gamma_1)$$

Debido a que existe una relación directa entre la tensión superficial y la presión superficial se puede apreciar que entre mayor número de moléculas se encuentren en una película interfacial, mayor será la presión de superficie. Esto refuerza la analogía con los gases, queriendo decir que la presión de superficie es un concepto muy útil porque puede describir el estado de empaquetamiento de las moléculas en una película interfacial. Por esta razón, se menciona presión superficial y no tensión superficial. En la imagen se muestra como la presión superficial versus el área interfacial define los diferentes estados de una película interfacial.

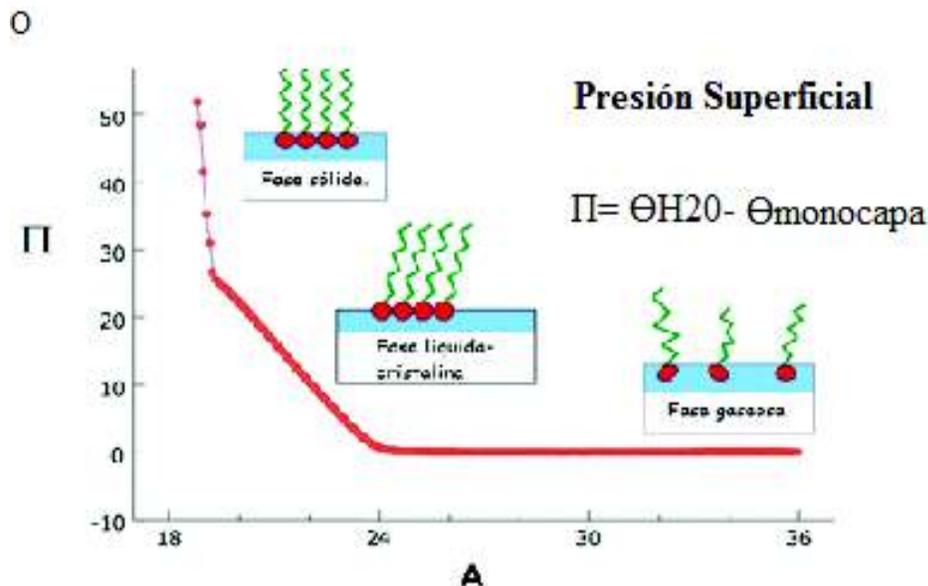


Figura 9. Típica isoterma para un fosfolípido, en la cual se muestran las diferentes fases de una monocapa.

A una baja presión superficial la monocapa está compuesta de una muy baja densidad de moléculas anfifílicas y por ejemplo, una monocapa de fosfolípidos podría ser descrita como una monocapa en la fase de gas expandido, y así como en cualquier gas las moléculas se difunden libremente en la superficie. La densidad de empaquetamiento puede ser incrementada aumentando la cantidad de moléculas en la superficie, o como más comúnmente se logra, reduciendo el área de superficie al mover las barreras móviles de la balanza de Langmuir. En cualquier caso, las moléculas son forzadas a empaquetarse y la monocapa alcanza la fase líquida; las moléculas se pueden difundir en este estado, aunque se encuentran más confinadas. Si el área continúa reduciéndose, las moléculas continúan empaquetándose alcanzando así lo que se conoce como el estado sólido o gel. Finalmente, si el área continúa reduciéndose más allá de este punto, la monocapa será repentinamente forzada al colapso. Esto quiere decir que las moléculas fueron forzadas a abandonar la superficie y se sumergieron en la subfase (Morris, 2001).

## II.11. Medición de la Presión de Superficie

Para medir la presión de superficie en la balanza de Langmuir se utiliza la placa de Wilhelmy. La placa de Wilhelmy es un trozo de papel cromatográfico el cual, cuando está suspendido en la interfase aire-agua. Es jalado hacia abajo en el bulto de la subfase por la tensión superficial del agua. Las fuerzas que actúan sobre la placa son la gravedad, la tensión superficial actuando hacia abajo en la subfase y el empuje hidrostático debido al desplazamiento de agua actuando hacia arriba. Si el plato tiene dimensiones  $lwt$  (longitud, anchura, grosor), una densidad  $\rho$ , y es inmerso en el agua a una profundidad  $h$ , entonces la fuerza de empuje hacia abajo  $F$ , está dada por la siguiente ecuación:

$$\text{Fuerza} = (\rho plwt)g - (\rho Lhwt)g + 2(w+t) (ST)(\cos\theta)$$

Fuerza= peso – empuje hacia arriba+ tensión superficial en dirección vertical

Donde,  $\rho_p$  es la densidad de la placa,  $\rho_L$  es la densidad del líquido,  $ST$  es la tensión superficial del líquido,  $\theta$  es el ángulo de contacto entre la placa y el líquido y  $g$  es la aceleración debido a la gravedad. Antes de realizar cualquier medición la lectura de presión se establece en cero. Por lo tanto se elimina el peso de la ecuación 1.

$$\text{Fuerza} = -(\rho_L h w t)g + 2(w+t) (ST)(\cos\theta)$$

$$\text{Fuerza} = - \text{empuje hacia arriba} + \text{tensión superficial.}$$

El empuje hacia arriba es eliminado de la ecuación 2 debido a que la placa siempre se mantiene a un nivel constante por la balanza, sin importar la tensión superficial.

$$\text{Fuerza} = 2(w+t) (ST)(\cos\theta)$$

Finalmente el uso de platos de papel asegura que el ángulo de contacto es igual a  $0^\circ$  y la expresión se reduce a:

$$\text{Fuerza} = 2(w+t) (ST)$$

Por lo tanto, para un plato la tensión superficial es:

$$ST_p = \text{Fuerza} / 2 (w+T)$$

Donde, la tensión superficial esta en mN/m, la fuerza en mN (milinewtons) y el perímetro en metros. Por lo tanto, para un papel de 10.25mm de ancho, .25mm de grosor y 100mg de peso, la lectura para el agua será de 46.7 mN/M.

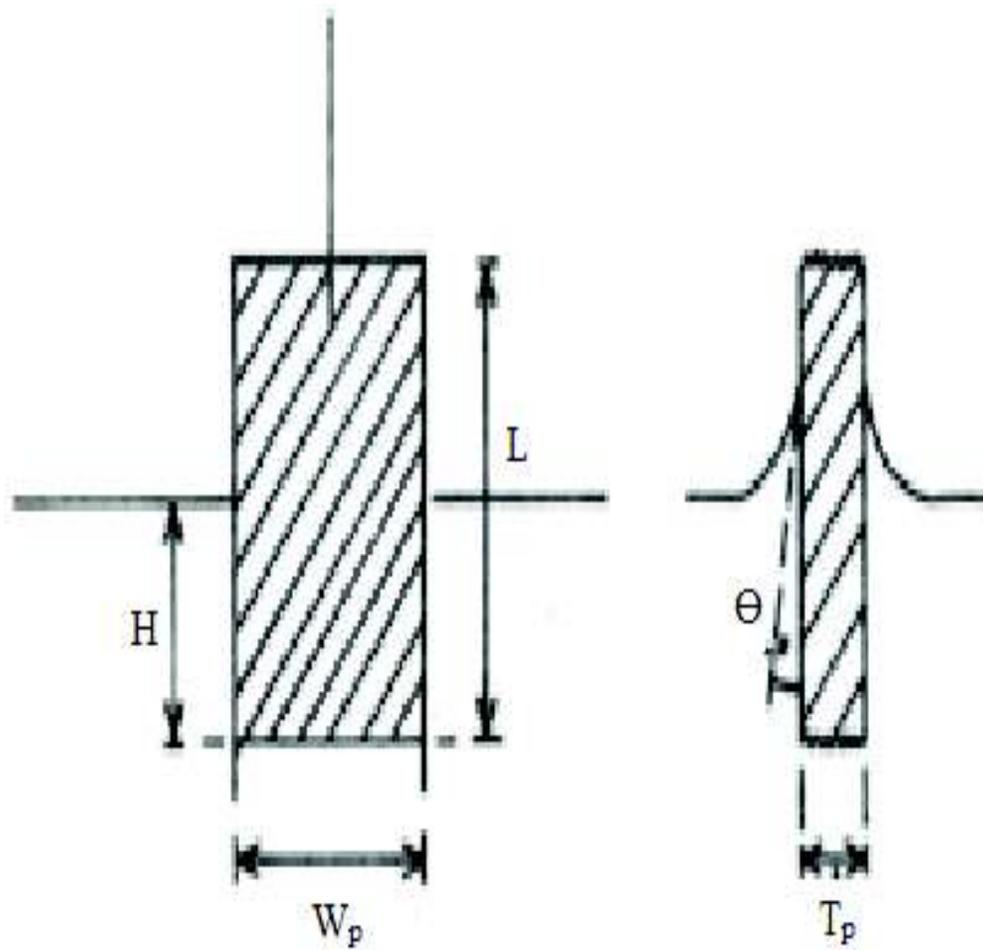


Figura 10. Plato de Wilhelmy

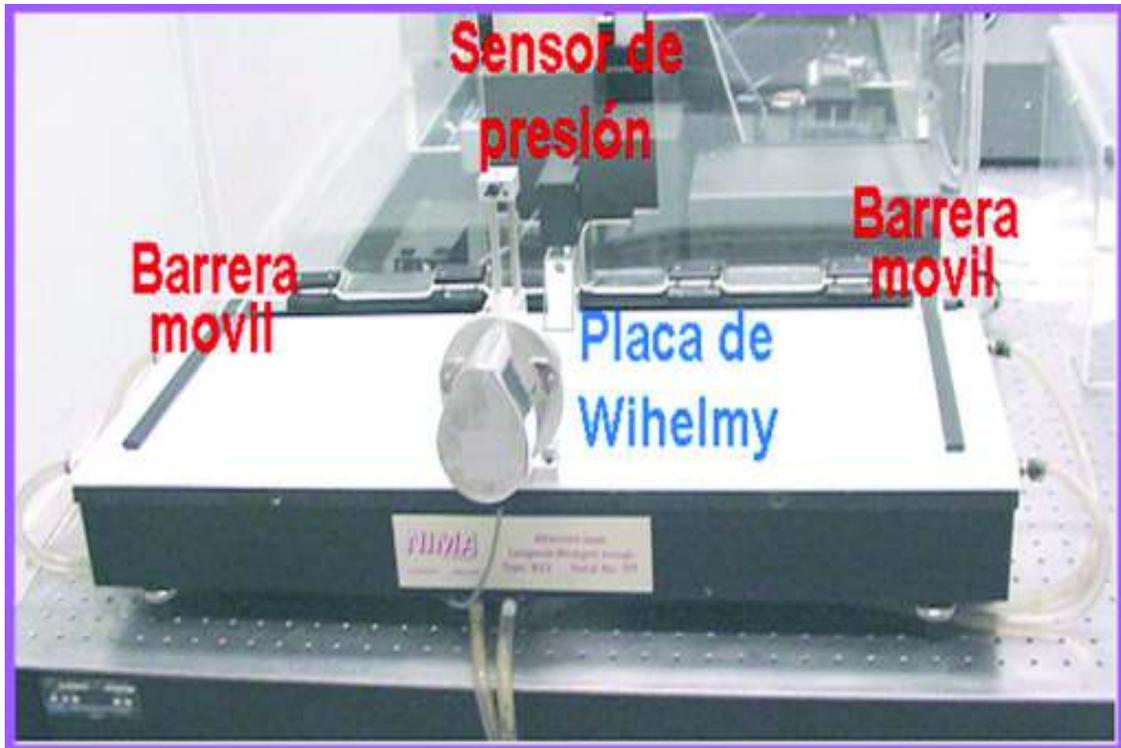


Figura 11. Imagen de la balanza de Langmuir.

## II.12. Isotermas Presión Superficial / Área

El indicador más importante de las propiedades de una monocapa de moléculas anfifílicas se obtiene midiendo la presión de superficie en función del área de superficie que es correspondiente a cada molécula. Esto se lleva a cabo a temperatura constante y se conoce como isoterma presión superficial/área, o simplemente isoterma. Usualmente una isoterma es obtenida comprimiendo la monocapa (reduciendo el área por medio de las barreras) a una velocidad constante mientras la presión de superficie es monitoreada. Dependiendo del material de estudio, repetidas compresiones pueden ser necesarias para lograr un evento reproducible (Gaines, 1966 y Roberts, 1990).

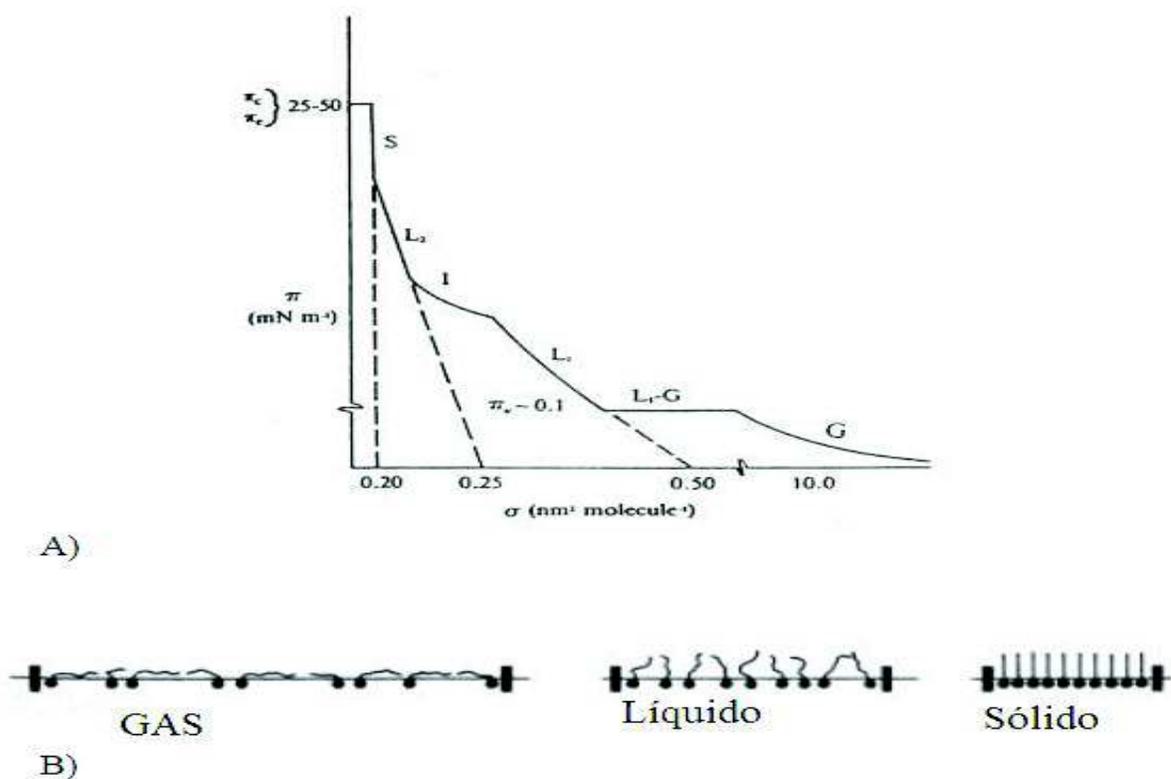


Figura 12. A) Isotherma esquemática y B) Orientación de las moléculas en distintas fases (Roberts, 1990).

Varias regiones distintas son inmediatamente aparentes al examinar una isoterma. Estas regiones son llamadas fases. Como se puede observar cuando una monocapa es comprimida, se puede pasar por diferentes fases las cuales son identificadas por medio de discontinuidades en una isoterma. El comportamiento de fase de una monocapa es principalmente determinado por las propiedades físicas y químicas de las moléculas anfifílicas y la temperatura y composición de la subfase (Gaines, 1966 y Roberts, 1990).

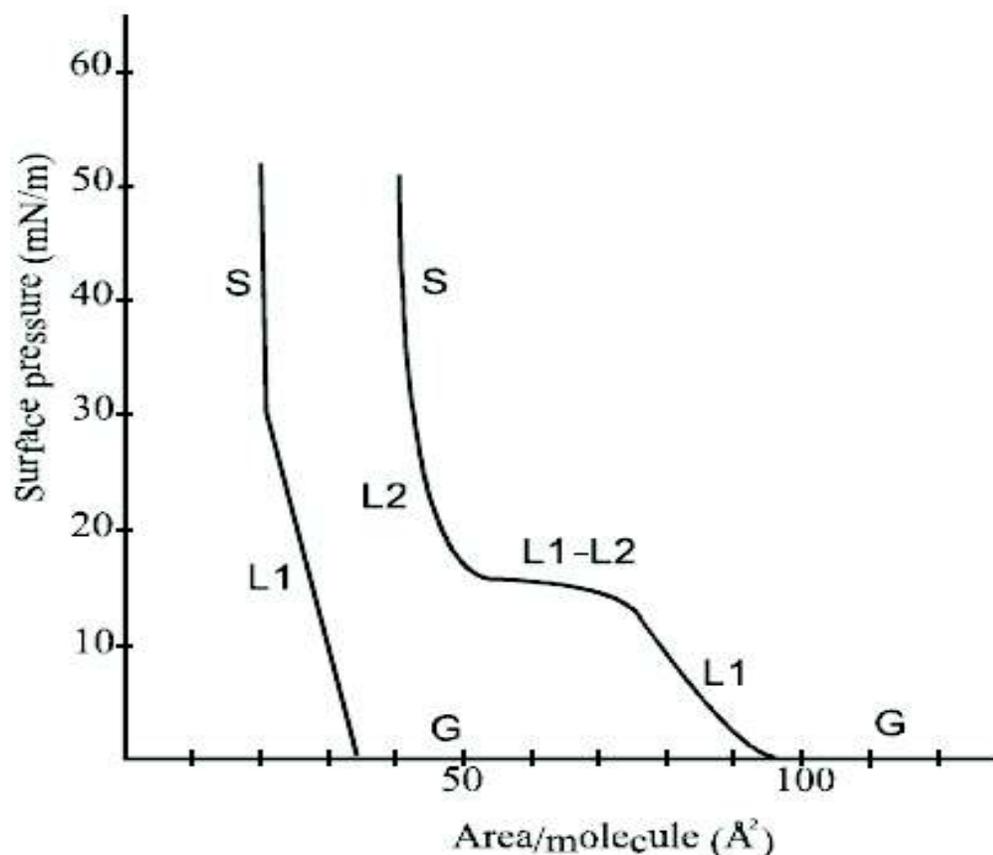


Figura 13. Isoterma típica de un ácido graso y un fosfolípido (Roberts, 1990).

Para calibrar un sistema de Langmuir se emplea comúnmente el ácido esteárico ya que este ácido graso se ha estudiado bastante y se conocen muy bien las transiciones de fase que presenta, esto es a  $21 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$  donde cambia a la fase líquido-comprimido (LC), donde se da la transición de la cadena hidrocarbonada. A partir de los datos obtenidos, se hace una comparación del área por molécula ocupada por el ácido graso y a partir de los

valores de peso molecular y concentración de la sustancia que se va a medir se obtiene el valor del área en  $\text{Å}^2/\text{molécula}$  (Gaines, 1966 y Roberts, 1990).

### **II.13. Observación de las Monocapas**

Las observaciones microscópicas de la textura en las monocapas de Langmuir se hizo posible hace solo unos pocos años, primero por medio de microscopía fluorescente y más recientemente por las técnicas de microscopía elipsométrica y microscopía de ángulo de Brewster (BAM) (Degen et al., 2005). En años recientes, la microscopía de ángulo de Brewster (BAM) se ha convertido en la técnica más utilizada para la observación in situ de monocapas. No requiere la presencia de aditamentos como sondas fluorescentes, por lo tanto, la monocapa permanece sin alteraciones (Miñones Jr et al., 2004). En el presente, BAM es el método más informativo para el análisis estructural de las monocapas. La existencia del ángulo de Brewster ( $53^\circ$ ) es una peculiaridad de la luz polarizada. El coeficiente de reflectividad se desvanece en el ángulo de Brewster, por lo tanto, la luz no es reflejada en dicho ángulo. Una monocapa en la interfase aire-agua permite una cierta cantidad de reflexión, la cual es suficiente para producir una imagen. Esta técnica es superior a la microscopía de fluorescencia puesto que no se requieren etiquetas moleculares, las cuales podrían tener un impacto indeseable en el sistema. En un sistema de Langmuir, cuando no exista presencia de una monocapa en la interfase, el haz de luz en el ángulo de Brewster no presentará reflexión, en cambio cuando una monocapa esté presente, habrá una cantidad de reflexión la cual podrá ser interpretada como una imagen. En el estudio de películas Langmuir-Blodgett, comúnmente también es utilizada la microscopía de fuerza atómica (AFM). Después de que una monocapa es formada en la balanza de Langmuir y habiendo esta sido transferida a un sustrato sólido, puede ser observada en microscopía de fuerza atómica. Por ejemplo, recientemente se han realizado estudios termodinámicos y estructurales de proteínas básicas de mielina en membranas modelo, en microscopio de fuerza atómica como una de las principales herramientas (Rispoli, 2007).

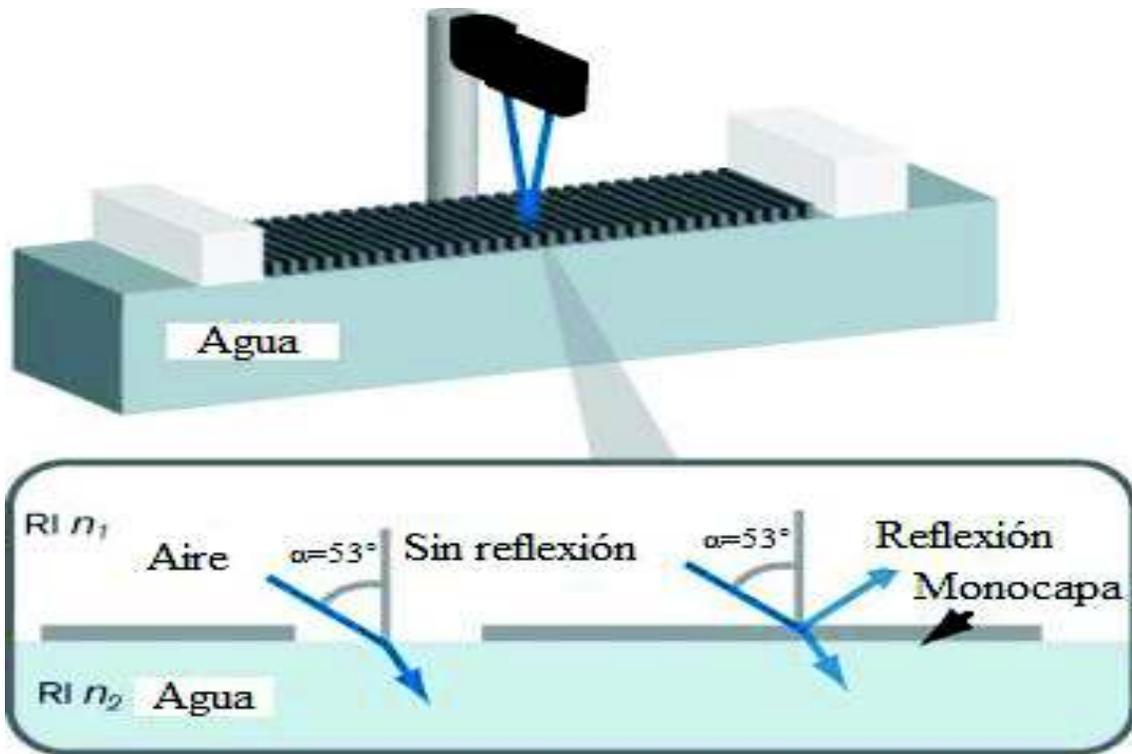


Figura 14. Esquema de microscopía de ángulo de Brewster (BAM)

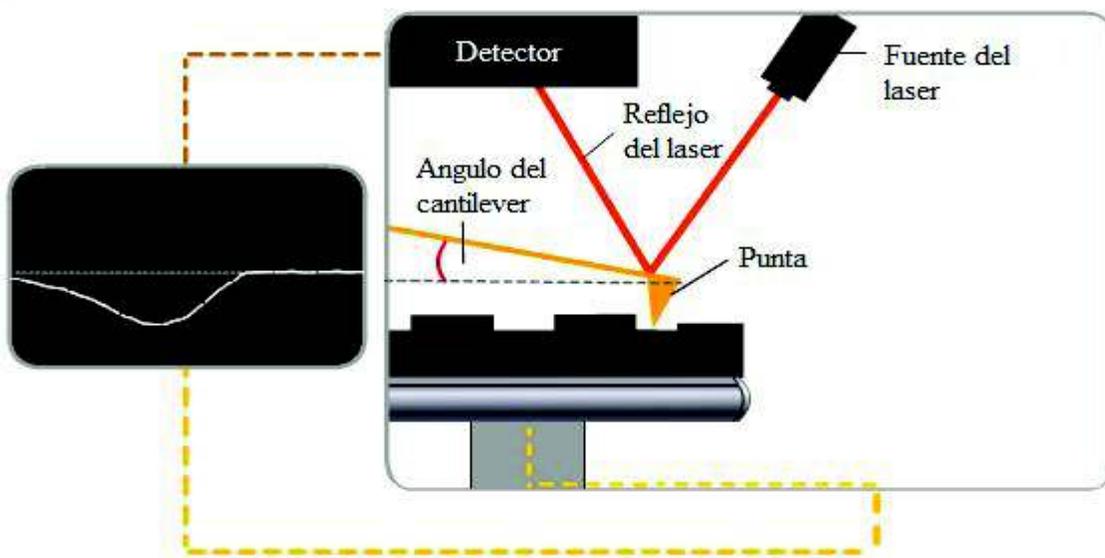


Figura 15. Esquema de microscopía de fuerza atómica.

### III. JUSTIFICACION

Los flavonoides, de los cuales la quercetina es uno de los más abundantes en la naturaleza, han sido exhaustivamente estudiados. Se conoce su estructura química, su capacidad antioxidante, y se han observado efectos benéficos a nivel celular en experimentos *in vivo*. Sin embargo los estudios enfocados a dilucidar los mecanismos de acción de dichas biomoléculas son muy escasos. Por otro lado, la membrana celular se considera uno de los órganos más importantes de la célula. Estudiar la interacción entre un flavonoide como la quercetina y una membrana modelo, genera información útil para conocer los mecanismos bajo los que opera la quercetina a nivel celular, y como se llevan a cabo los efectos que causa la quercetina en la supresión de tumores, cambios estructurales de las membranas y actividad antioxidante.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Debido a su carácter parcialmente hidrofóbico, la quercetina en su forma libre de azúcares, penetra en las membranas celulares, las cuales poseen como componente mayoritario fosfatidilcolinas.

## **V. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la interacción entre el antioxidante quercetina y el fosfolípido dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) utilizando monocapas de Langmuir como modelo para biomimetizar membranas celulares.

## **VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar isotermas para el DPPC, y complejos DPPC-Quercetina a diferentes proporciones:

50%-50% DPPC-Quercetina, 70%-30% DPPC-Quercetina, 90%-10% DPPC-Quercetina, respectivamente.

Caracterizar incrementos de presión en una monocapa de DPPC después de inyectar quercetina a diferentes presiones iniciales.

Realizar ciclos de compresión y expansión en monocapas de DPPC y DPPC-quercetina a diferentes proporciones.

## VII. METODOLOGÍA

### VII.1. Isotermas y Películas Langmuir-Blodgett

Las soluciones madre de DPPC y de Quercetina fueron hechas a una concentración de 1mg/ml en cloroformo y etanol respectivamente, en un volumen total de 5 ml. cada una. Para la preparación de las muestras se utilizó 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina, (DPPC) de la marca Avanti Polar Lipids y cloroformo grado HPLC. La quercetina fue disuelta en etanol grado HPLC. A partir de dichas soluciones, se prepararon soluciones DPPC-Quercetina a diferentes proporciones: 90-10%DPPC-Quercetina, 70-30% DPPC-Quercetina y 50-50%-Quercetina las cuales fueron inyectadas en un volumen de 50microlitros para generar las isotermas. Las isotermas de DPPC, quercetina y DPPC-Quercetina fueron obtenidas en una balanza Langmuir-Blodgett modelo 601 Nima Technologies, Ltd., Coventry, England. La presión superficial fue medida utilizando el método de la placa de Wilhelmy. La presión superficial y el área molecular fueron obtenidas a una velocidad de compresión de 20 cm<sup>2</sup>/min. Todos los experimentos se realizaron controlando la temperatura a 20° C utilizando un circulador de agua (Cole-Palmer, 1268-24, USA). El proceso de deposición del DPPC y de las soluciones DPPC-Quercetina en la interfase aire/agua fue llevado a cabo utilizando una microjeringa Hamilton. Sobre la subfase acuosa se inyectaron 50 µL de DPPC y DPPC-Quercetina con una concentración de 1 mg/mL. Después de 15 minutos de depositar la solución se llevó a cabo la compresión de las barreras. Los ciclos de compresión y expansión de las monocapas de DPPC y complejos DPPC-Quercetina a diferentes concentraciones fueron realizadas 15 minutos después de la deposición de la quercetina sobre la subfase. El análisis cuantitativo de la estabilidad de la monocapa fue obtenido mediante la integración de las curvas de los ciclos. Los experimentos de cambio de presión como función de diferentes presiones iniciales, manteniendo el área constante, fueron realizados 15 minutos después de depositar las soluciones de DPPC y DPPC-Quercetina. Las monocapas fueron comprimidas hasta alcanzar una presión constante de 10 mN/m, 15 mN/m, 17.5 mN/m, 20 mN/m, 25 mN/m, y el cambio de presión fue medido durante 5 minutos para cada monocapa formada en la subfase. Las películas de Langmuir-Blodgett de DPPC fueron obtenidas sobre mica

recién descubierta. Las monocapas de DPPC fueron obtenidas manteniendo la mica sumergida en la balanza. Después de 15 minutos, la superficie fue comprimida hasta alcanzar una presión de 25 mN/m, la transferencia de la monocapa se realizó a una velocidad de 1 mm/min. El agua utilizada en todos los experimentos para la subfase fue agua ultrapura de 18.3 M $\Omega$ . Un microscopio de ángulo de Brewster MiniBam fue utilizado para obtener las imágenes de DPPC y los complejos DPPC-Quercetina a diferentes proporciones y los datos fueron almacenados en una computadora. Todas las imágenes fueron obtenidas a 20° C. Una vez realizada la isoterma, se eligió la presión superficial de 25 mN/m para transferir la monocapa de Langmuir a un sustrato sólido (mica). La transferencia de la monocapa se realizó a una velocidad de 1mm/min. Las monocapas de Langmuir-Blodgett se analizaron en un AFM marca JEOL, modelo JSPM 4210, utilizando el modo de no contacto.



Figura 16. AFM marca JEOL, modelo JSPM 4210

## VII.2. Diagrama General para la Metodología

En la figura 17 se muestra un diagrama general de la metodología, donde se incluye la formación de las monocapas para la obtención de las isothermas, la microscopía de ángulo de Brewster, la obtención de películas Langmuir-Blodgett para el análisis en AFM y los incrementos de presión.

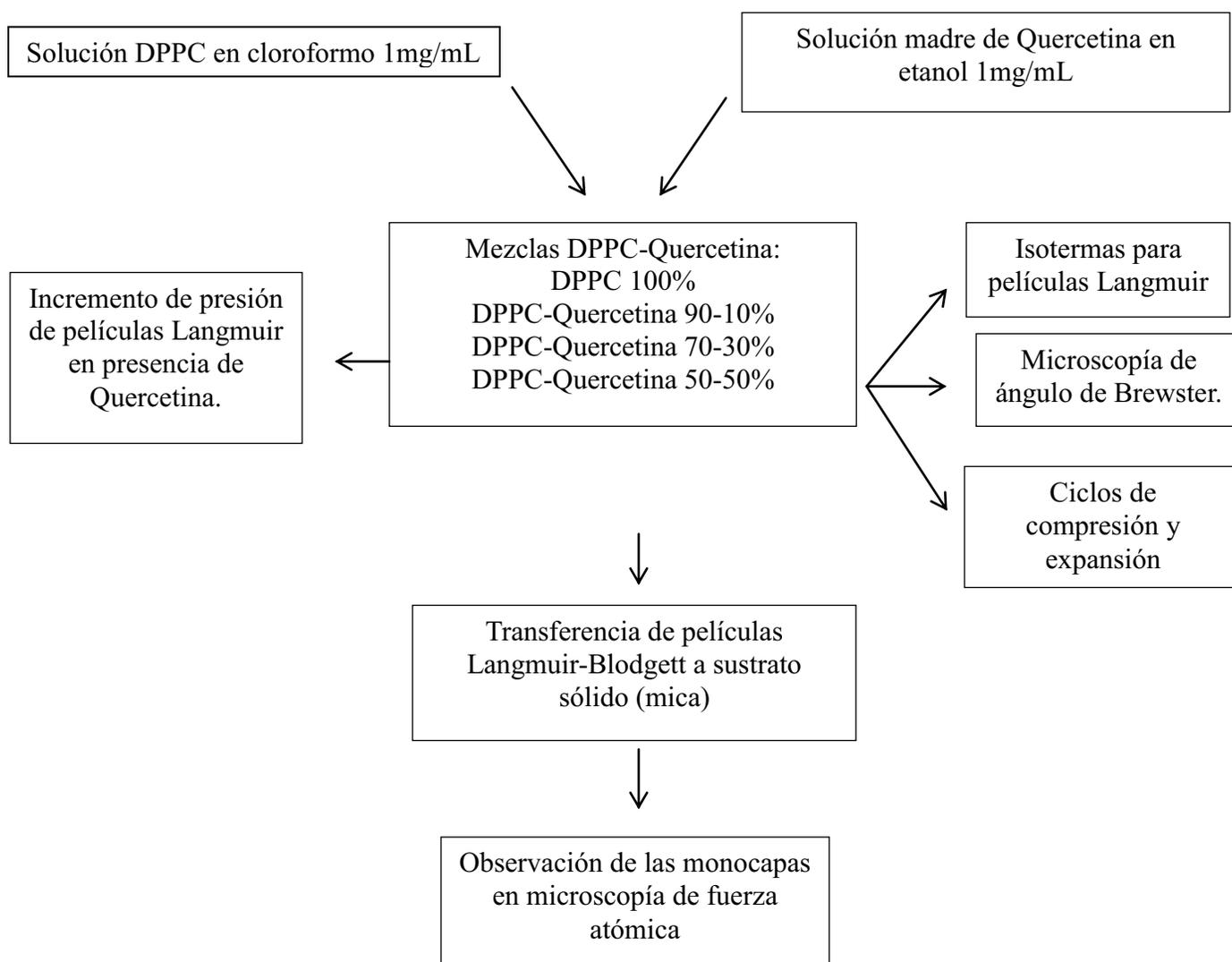


Figura17. Diagrama general de la metodología.

### VII. 3. Diagrama de Flujo para la Obtención de Isotermas a Diferentes Proporciones de DPPC – Quercetina

En la Figura 18, la misma dinámica es utilizada para la obtención de películas de Langmuir-Blodgett para su observación en microscopio de fuerza atómica.

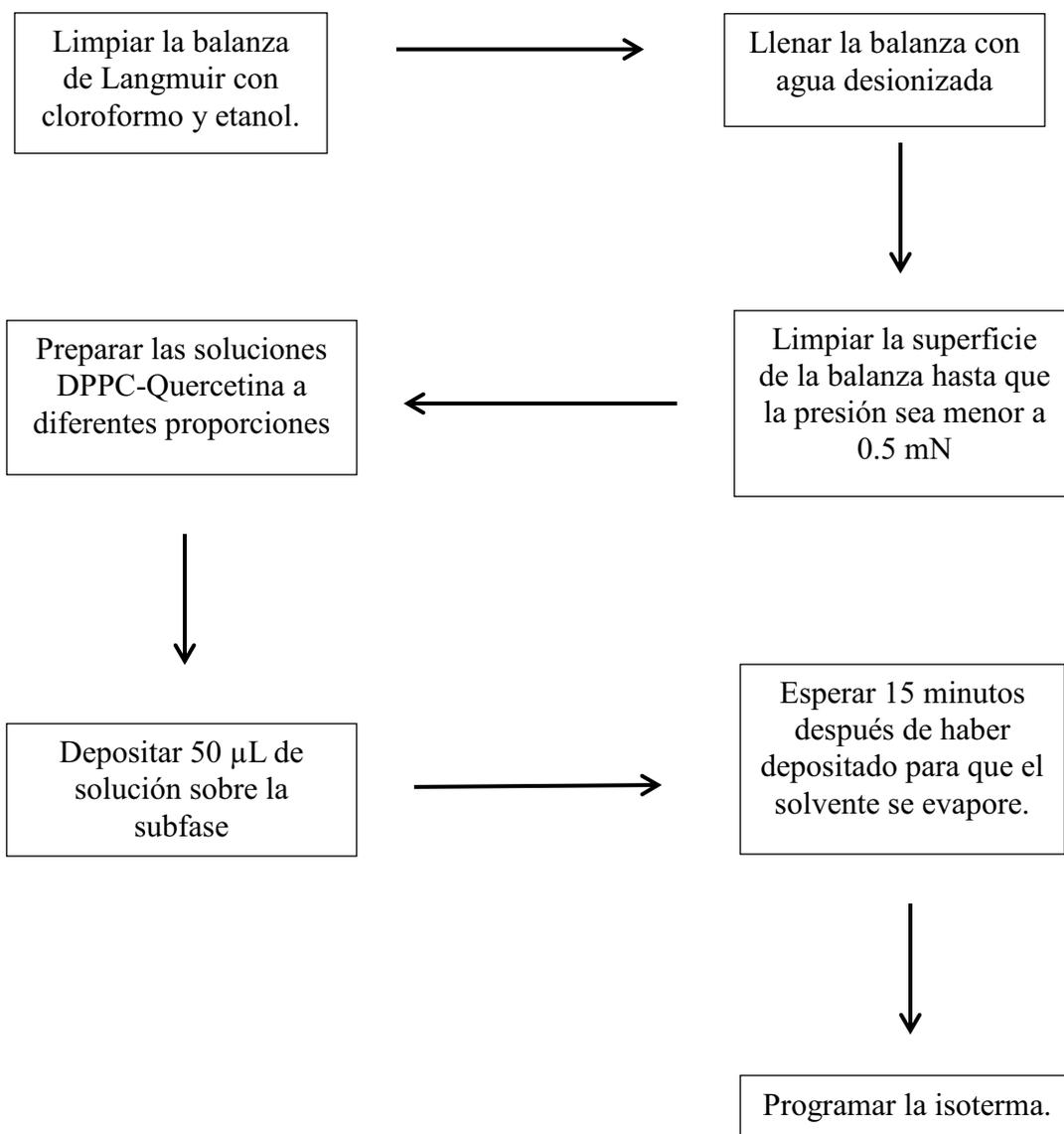


Figura 18. Diagrama para la obtención de películas Langmuir-Blodgett.

#### VII.4. Diagrama de Flujo para la Realización de Ciclos Compresión-Expansión

En la Figura 19 se muestra el diagrama de flujo para la realización de ciclos de expansión y compresión. Los ciclos de expansión y compresión se realizaron al formar una monocapa y programar en la interfase 10 ciclos de expansión y compresión de la misma.

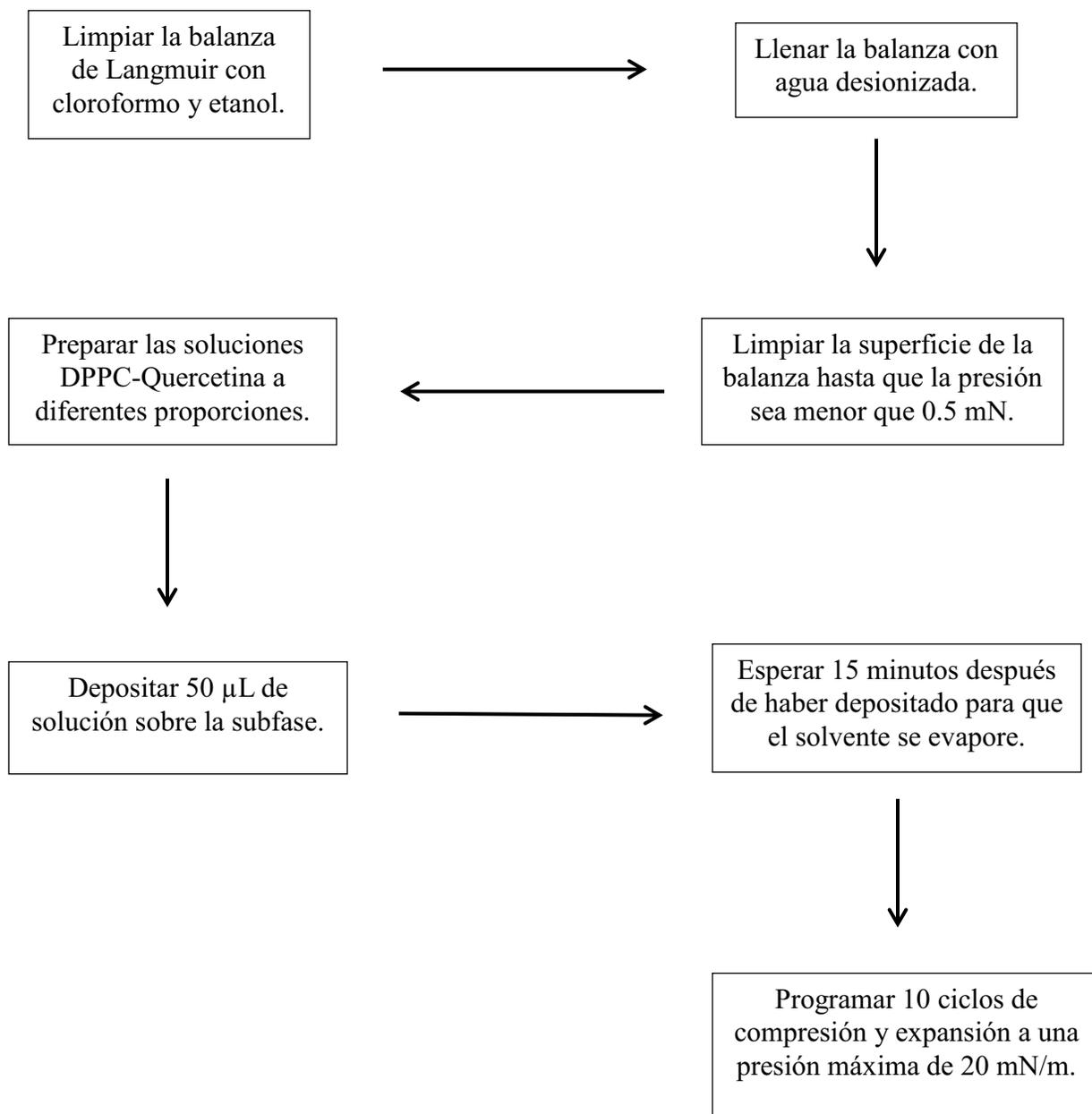
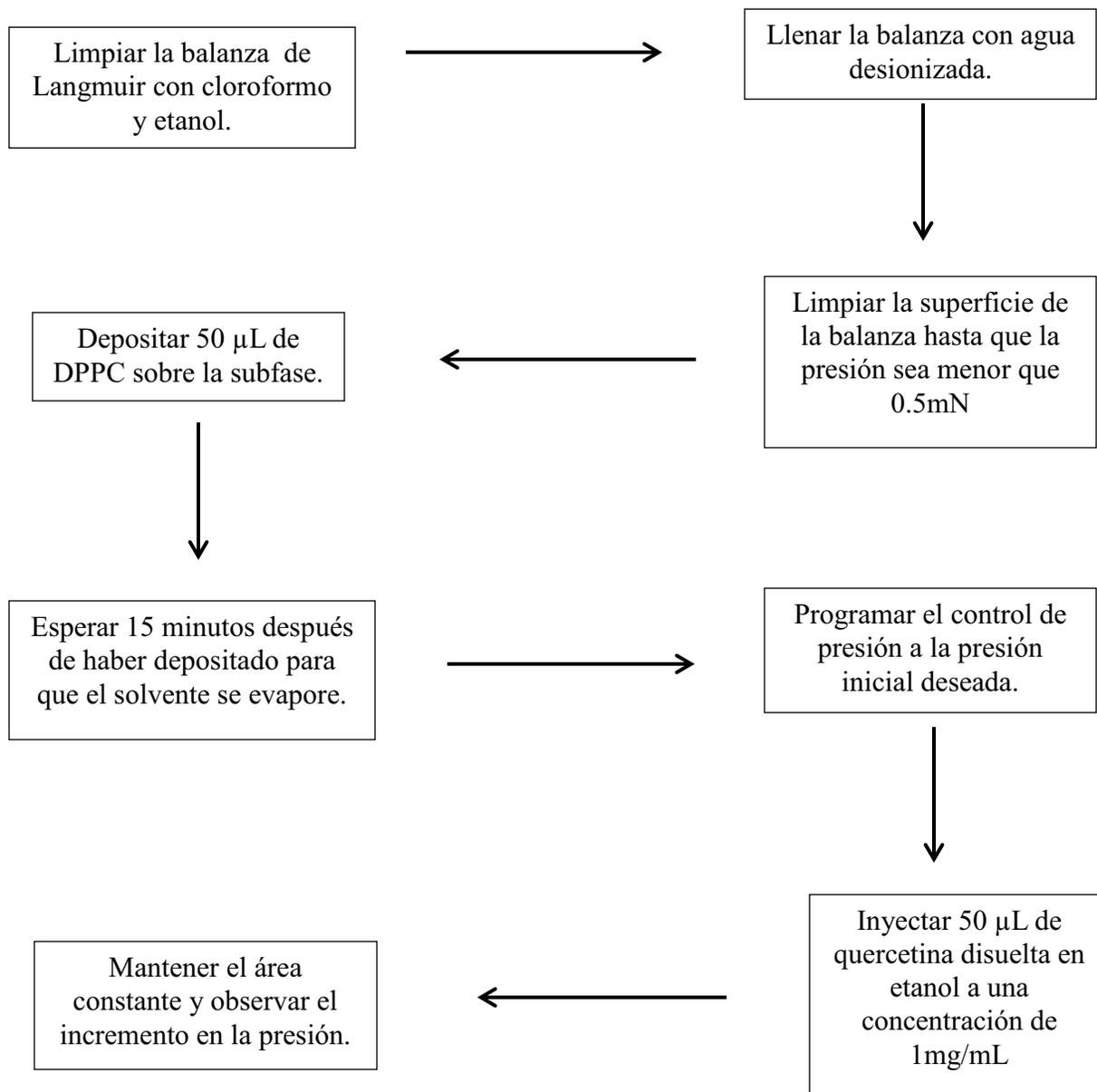


Figura 19. Diagrama para la realización de ciclos de expansión y compresión.

## VII.5 Diagrama de Flujo para los Incrementos de Presión

En la Figura 20, se muestra el diagrama para la realización del experimento de incrementos de presión. Este experimento consistió en la formación de monocapas a distintas presiones iniciales, posteriormente se inyecta con la microjeringa Hamilton quercetina, atravesando la monocapa. Durante un lapso de 5 minutos se registró el incremento de presión ejercido por la quercetina sobre la monocapa.



Figuran 20. Diagramas para los incrementos de presión.

## VIII. RESULTADOS

### VIII.1. Isotermas

En la tabla I se muestra en línea continua a la isoterma característica del DPPC, la aparición de la fase de transición principal se encuentra aproximadamente en  $100 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ . Las isotermas que contienen distintas proporciones de quercetina aparecen corridas hacia áreas mayores mostrando una evidente interacción entre la quercetina y las moléculas de DPPC.

La proporción menor de DPPC-quercetina (90-10%) en la interfase presenta un corrimiento hacia áreas y presiones mayores comparadas con la isoterma de DPPC puro, esto indica que existe una intercalación de las moléculas del flavonoide en los grupos cabeza del fosfolípido, haciendo que se modifique la fase líquido expandido-líquido comprimido. La proporción intermedia de quercetina en la interfase muestra una isoterma muy parecida a la del DPPC puro en la fase líquido-expandido (LE), modificando la forma del plateau de transición mayor, pero a presiones y áreas menores que las observadas para el sistema DPPC-quercetina 90-10%. La proporción de DPPC-Quercetina 50-50 % demuestra en la fase LE una isoterma con un corrimiento hacia áreas mayores más no el observado en la proporción DPPC-quercetina 90-10% y una modificación del plateau muy similar a la que ocurre con la isoterma DPPC-quercetina 70-30%. Lo anterior indica que a medida que se incrementa la concentración de quercetina en la interfase existe una saturación, lo que provoca que haya una liberación de moléculas de quercetina hacia la subfase. En la menor proporción de quercetina la isoterma alcanza mayores presiones de superficie lo cual puede deberse a que el DPPC tiene intercalados en su estructura a las moléculas de flavonoide con lo cual no existe una saturación de estos en la interfase. Lo anterior se corrobora con las imágenes de AFM obtenidas mediante la técnica de Langmuir-Blodgett, donde se observa la modificación de la monocapa en función de la cantidad de quercetina.

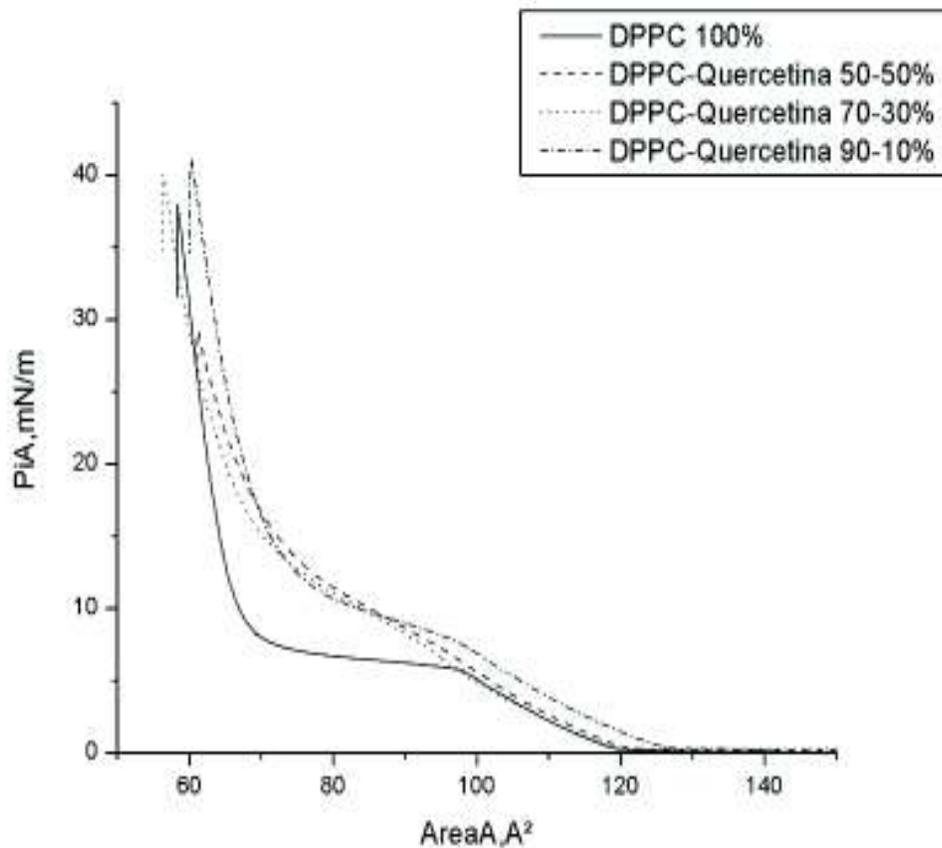


Figura 21. Isothermas a diferentes proporciones de DPPC-Quercetina.

Quercetina en %	DPPC en %	Área en $\text{Å}^2$	$\Delta$ de área en $\text{Å}^2$
0	100	65.54 61.30	4.24
10	90	75.45 65.65	9.8
30	70	65.54 61.82	3.72
50	50	77.82 63.55	14.27

Tabla 1. Efecto de quercetina en función de la proporción de flavonoide en las isothermas de DPPC. Las presiones de referencia son 12 y 25 mN/m respectivamente tomando como área de referencia  $65 \text{ Å}^2$ .

Si la quercetina en menor proporción en la interfase se mueve hacia áreas mayores indica que esta al encontrarse saturando más a la monocapa de DPPC tiende a migrar hacia la subfase solubilizándose en el agua. Debido a la interacción entre los grupos cabeza del fosfolípido y las moléculas del flavonoide se logra una saturación en la interfase, esto se ha estudiado empelando micelas y bicapas de fosfolípido (Afanas'eva et al, 2005), donde ellos proponen que al incrementar la concentración de quercetina se disminuyen los sitios de unión por que las moléculas de flavonoide se entrelazan dentro de las micelas de fosfolípido, por lo que en un sistema de Langmuir los sitios de unión pueden ser saturados por la presencia de la quercetina provocando la solubilización.

La diferencia de área entre el DPPC y el DPPC con quercetina muestra que efectivamente existe una similitud entre las isothermas obtenidas mediante la técnica de Langmuir. La presencia del flavonoide muestra una diferencia de área significativa a medida que se incrementa su proporción en el sistema. En base a esto se puede inferir que con la menor proporción de quercetina hay una mayor retención de moléculas de quercetina en la interfase.

## **VIII.2. Microscopía de Ángulo de Brewster**

Mediante imágenes de microscopía de ángulo de Brewster fue posible observar agregados formados por la interacción entre el DPPC y la quercetina. Nuevamente, como se mostró anteriormente en las isothermas de DPPC y quercetina a diferentes proporciones, es posible apreciar el comportamiento que tiene la quercetina en la interfase a ciertas concentraciones críticas. La formación de agregados es más abundante y homogénea donde la concentración de quercetina es menor. Tal es el caso de la Figura 21<sup>a</sup>, donde la quercetina se encuentra a una proporción 90%-10% respecto al DPPC. Esto nos indica que si la concentración de quercetina es muy elevada en proporción al fosfolípido, la quercetina tiende a perderse en la subfase, como se observa en la imagen de la izquierda.

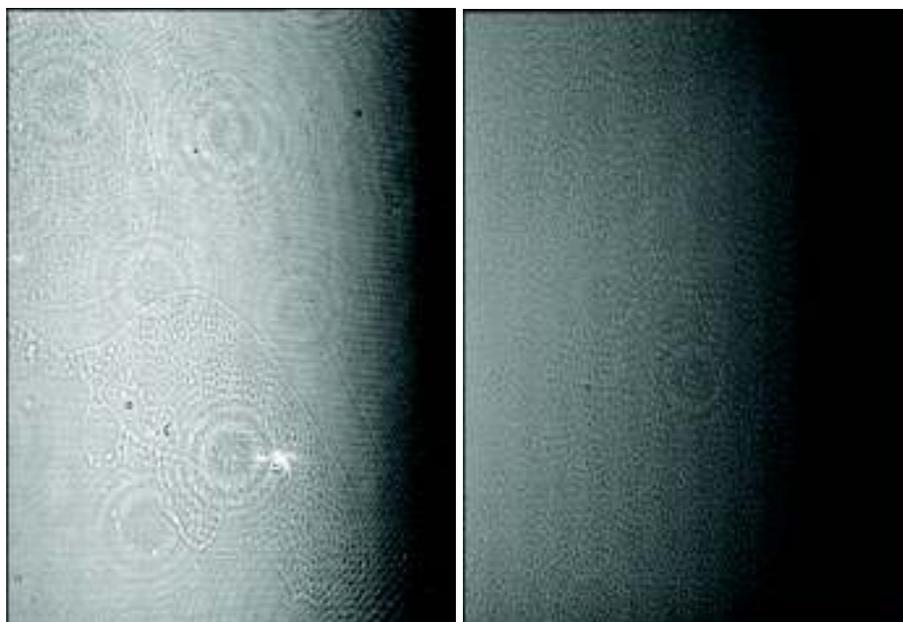


Fig 22<sup>a</sup>

Fig. 22<sup>b</sup>

Figura 22. Imágenes de microscopía de ángulo de Brewster a diferentes concentraciones de DPPC-Quercetina. 50%-50% DPPC-Quercetina respectivamente en la Figura 22<sup>a</sup> y 90%-10% DPPC-Quercetina en la Figura 22<sup>b</sup>.

### VIII.3. Incrementos de Presión

En este trabajo, tal como lo muestra la Figura 22, para conocer la capacidad que tiene la quercetina de penetrar una membrana, se experimentó inyectando quercetina en una monocapa de fosfolípidos a diferentes presiones iniciales durante un intervalo de tiempo de 5 minutos. Posteriormente se registró el cambio o incremento en la presión que ejerció la presencia de quercetina en la monocapa. Bajo el supuesto de que en una célula viva la presión en la membrana no es homogénea, se utilizaron presiones iniciales de 10 mN/m, 15 mN/m, 17.5 mN/m, 20 mN/m y 25 mN/m respectivamente. Como era de esperarse, la penetración de la quercetina en la membrana disminuyó en función de la presión inicial. Este experimento comprueba que la quercetina tiende a penetrar la membrana celular aumentando así la presión de dicha barrera celular. Nos indica también que entre menor sea la presión en una región dada, más fácil será la penetración de la quercetina en la

monocapa.

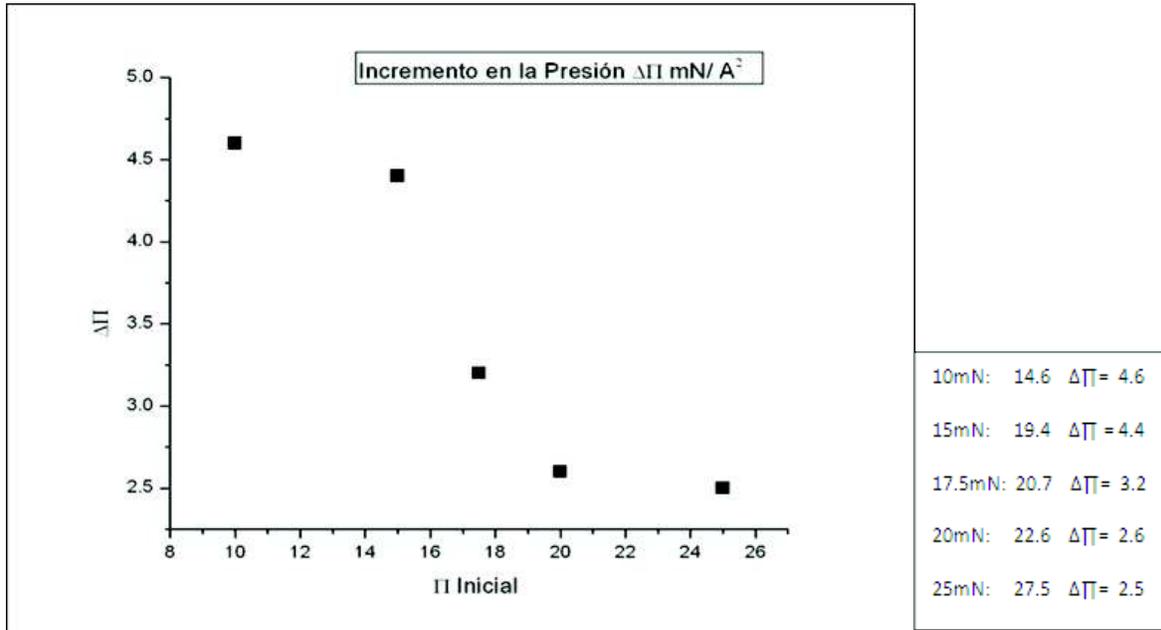


Figura 23. Incrementos de presión en una monocapa al inyectar quercetina a diferentes presiones iniciales.

#### VIII.4. Módulos Elásticos

En la figura 24 se muestra que a medida que se incrementa la concentración de quercetina en el sistema, las monocapas se muestran menos rígidas en el módulo de elasticidad. En la fase LE todas las proporciones utilizadas muestran una elasticidad similar y a medida que se incrementa la presión de superficie esta va cambiando, hasta llegar a una fase de coexistencia LE-LC, en la cual se observa que la concentración menor de quercetina en la interfase provoca que se haga menos rígida la monocapa. En la fase LC se mantiene el mismo comportamiento en función de la elasticidad. La proporción 50-50% (v/v) se observa a presiones bajas con un módulo de elasticidad similar al de la proporción 70-30% (v/v) sin embargo a medida que se incrementa la presión de superficie la proporción mayor muestra un máximo alcanzado en aproximadamente en 31 mN/m. La proporción 90-10%

(v/v) muestra un máximo en 35 mN/m, el cual es superior a los encontrados para las mezclas de DPPC-flavonoide, sin embargo, ningunas de las proporciones utilizadas muestran un módulo de elasticidad superior al del DPPC puro, lo cual significa que a medida que se disminuye la cantidad de moléculas de DPPC en la interfase y se agregan moléculas de flavonoide la rigidez de la membrana se hace menor.

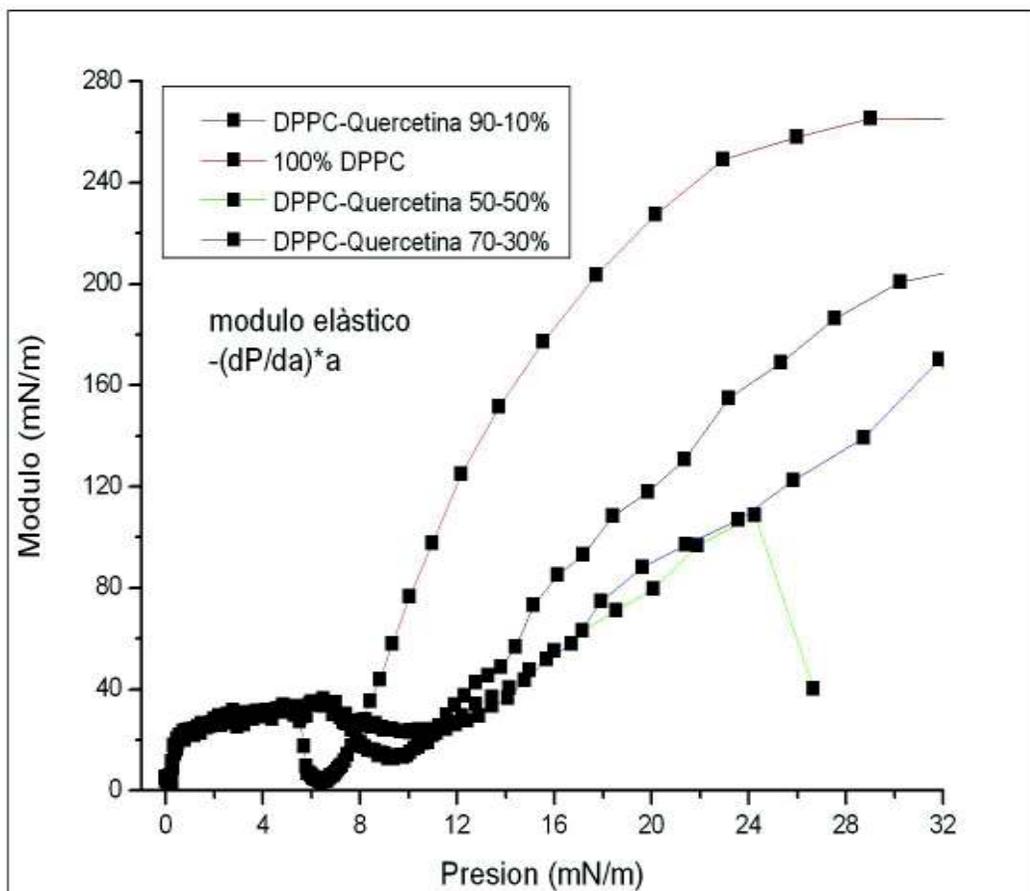


Figura 24. Módulos elásticos.

### VIII.5. Ciclos de Expansión y Compresión

En las figuras 25, 26 y 27 se muestran isothermas para monocapas en las que se realizaron 10 ciclos de expansión y compresión. En la isoterma de la Figura 25 se depositó DPPC puro, mientras que en la isoterma de la Figura 26 se depositó una mezcla de DPPC y quercetina a una proporción de 70-30% respectivamente. Mediante los ciclos de expansión y compresión se demuestra una mayor estabilidad de la membrana en presencia de la quercetina. En la Figura 25, donde no hay quercetina presente, existe un corrimiento de la isoterma hacia la izquierda en cada ciclo. Esto se debe a que la monocapa va perdiendo estabilidad al paso de cada ciclo y esto se traduce en la migración de fosfolípidos hacia la subfase. En la Figura 26, donde existe una proporción de 70-30% DPPC-Querretina, el corrimiento de la isoterma hacia la izquierda durante cada ciclo es mucho menor. Esto demuestra que al paso de cada ciclo la monocapa se mantiene estable, permitiendo que los fosfolípidos permanezcan en la interfase.

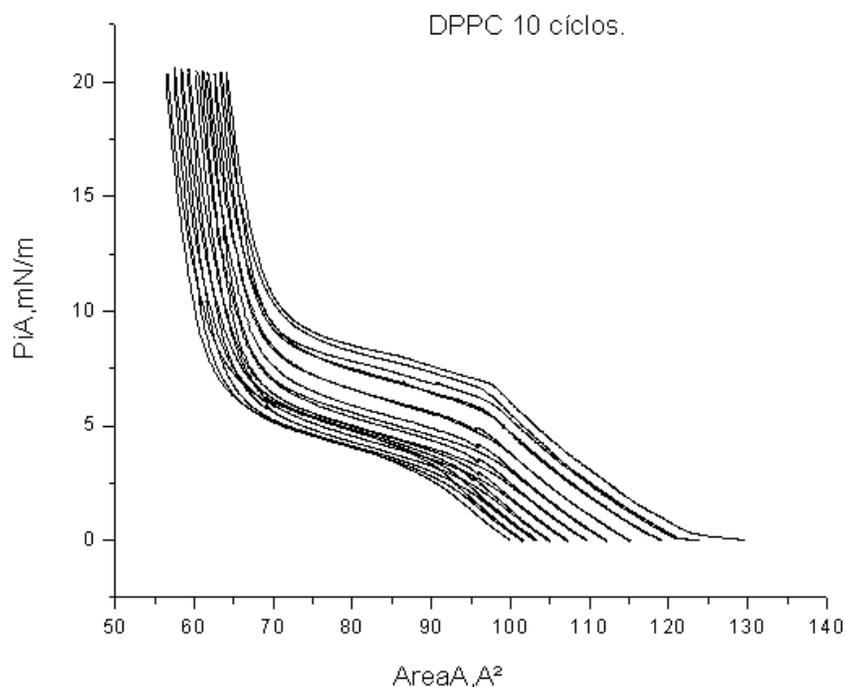


Figura 25. Ciclos de expansión y compresión para de una monocapa de 100% DPPC.

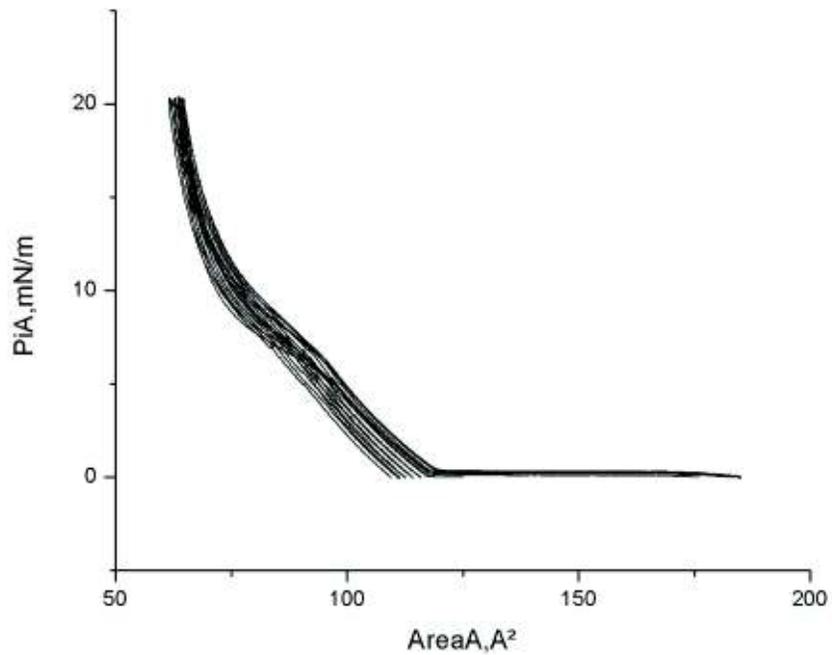


Figura 26. Ciclos de expansión y compresión para de una monocapa de 70-30% DPPC-quercetina.

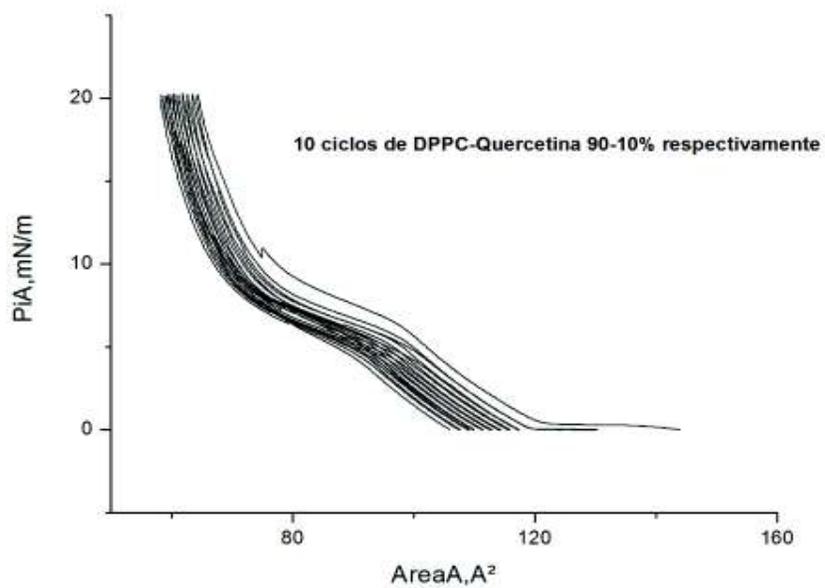


Figura 27. Ciclos de expansión y compresión para de una monocapa de 90-10% DPPC-quercetina.

La gráfica de diferencia de áreas (Figura 28) se obtuvo mediante la integración de las curvas de los ciclos de compresión-expansión. Esta gráfica nos indica de manera cuantitativa la diferencia de áreas de cada ciclo para cada concentración. Como en las isotermas y en los módulos elásticos, la concentración de 90-10% DPPC-Quercetina respectivamente fue las más diferenciada en referencia a la proporción 70-30% DPPC-Quercetina respectivamente y a la de 100% DPPC.

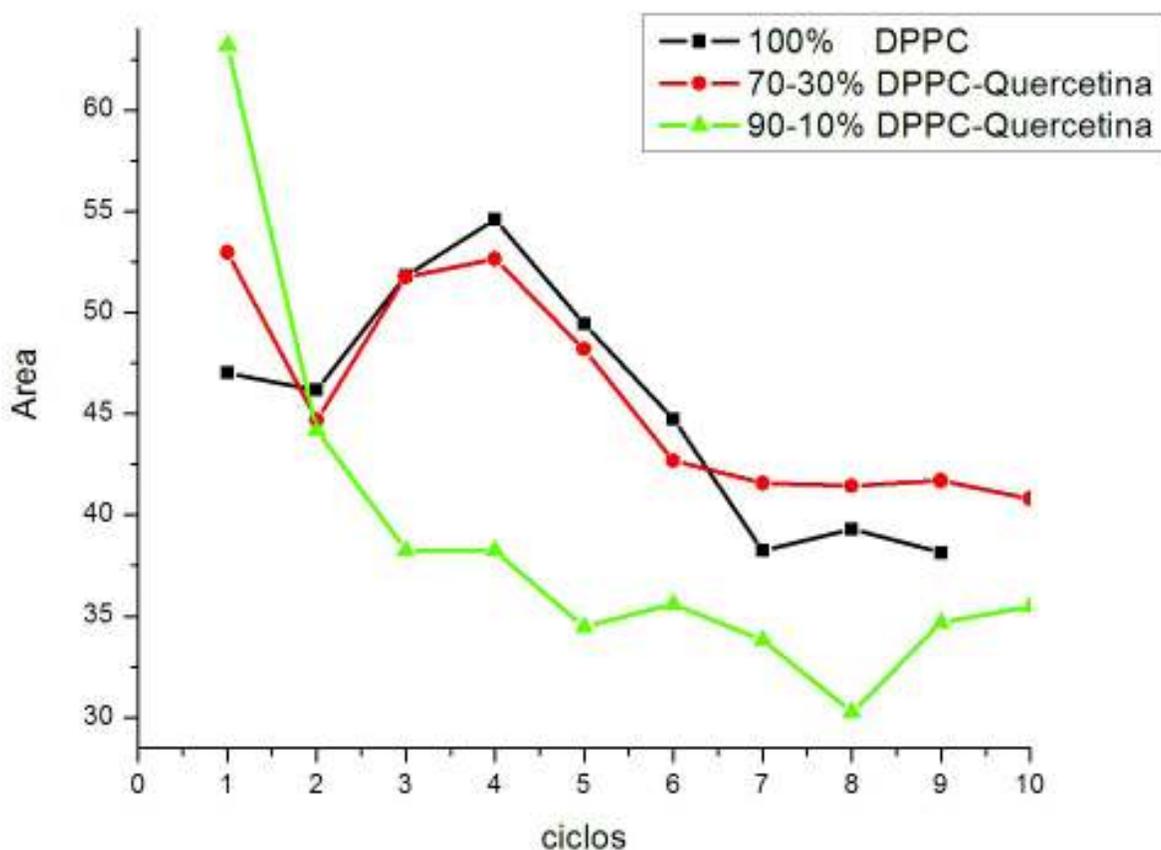


Figura 28. Diferencia de áreas en cada ciclo, para monocapas a diferentes proporciones de DPPC-Quercetina.

## VIII.6. Microscopía de Fuerza Atómica

En la Figura 30 se muestra una monocapa de 100 % DPPC transferida en mica y observada al microscopio de fuerza atómica, en ella se muestra que existe un empaquetamiento de los fosfolípidos a la presión de 25 mN/m. La imagen de microscopía de fuerza atómica mostrada en la en la Figura 30, rectifica que lo obtenido en la película Langmuir-Blodgett, fue efectivamente una monocapa. Esto se infiere a partir de la homogeneidad de la imagen y el valor cuantitativo para el eje espacial Z. Dicho eje, muestra alturas entre .06 y 1.2 nanómetros. Si bien el espesor de la membrana en una célula viva se encuentra en el orden de 7 nanómetros (tomando en cuenta que una célula viva posee una bicapa lipídica), corresponderían longitudes de 3.5 nanómetros para las colas hidrocarbonadas en una monocapa. En el análisis de la Figura 31 de microscopía de fuerza atómica se obtienen valores inferiores a la cifra teórica. Esto se explica a que la imagen se obtuvo a partir de una monocapa a una presión de 25 mN/m, por lo tanto, la monocapa presenta suficiente libertad para que la orientación específica de las moléculas permita un acomodo moderadamente ordenado, dando como resultado un valor para el eje de Z relativamente menor al esperado. En la Figura 31 se muestra la coexistencia de fases para el sistema DPPC-quercetina 70-30. En ella se observa una separación entre los dominios. La altura alcanzada por la fase LC se encuentra alrededor de 1.5 nm aproximadamente y una fase LE don valores cercanos a 0.6 nm aproximadamente. La fase LC no se observa completamente plana como con la imagen de DPPC puro ya que muestra espacios de LE en ella. En la Figura 32 se observa que los espacios vacíos entre las fases distintas son más abiertos. En el análisis en Z es claro la diferencia de alturas donde se pueden apreciar alturas de la fase LC hasta los 2 nm y otro patrón de alturas cercano en la fase LE alrededor de 1 nm. Se observan también agregados que tienden a empaquetar a los fosfolípidos en pequeñas islas o dominios en una coexistencia de fase LC-LE. Al igual que en las isothermas y las imágenes de microscopia de ángulo de Brewster la proporción 90%-10% DPPC-Quercetina respectivamente, es la que modifica mayormente el comportamiento y las características de la monocapa. En la Figura 33 es posible apreciar que a esa proporción de DPPC-Quercetina, el flavonoide no se retiene en la interfase. Esta imagen es muy similar a la obtenida depositando DPPC puro en la interfase. Se muestra una imagen de una

monocapa plana con poca aparición de fase LE, aun y cuando las alturas son menores que para la observadas con DPPC puro.

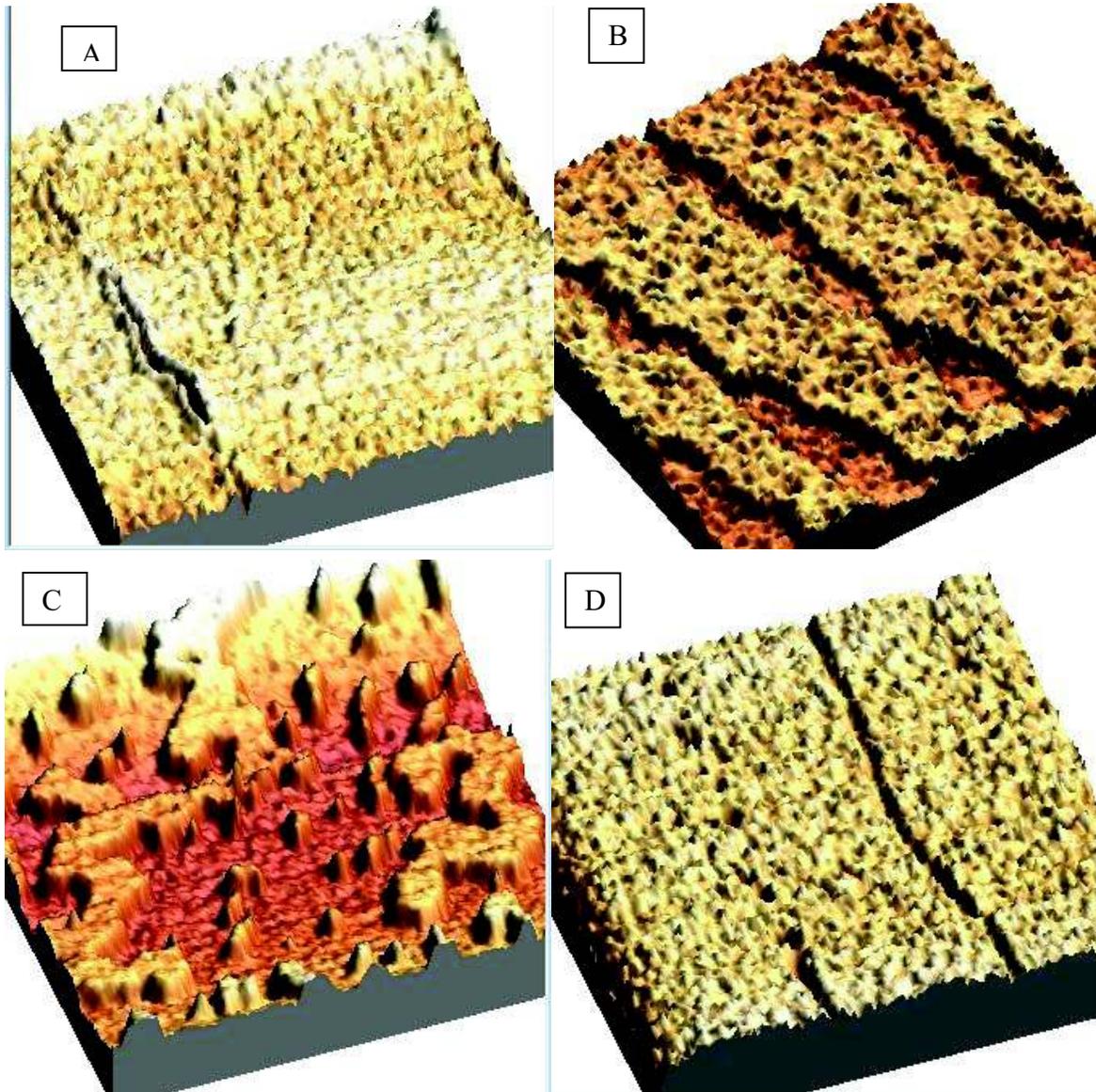


Figura 29. Imágenes de las monocapas a diferentes concentraciones, procesadas en tercera dimensión a partir del análisis de alturas en Z mediante el software WSxM 5.0 Develop. A= 100%DPPC. B=70-30%DPPC-Quercetina. C=90-10%DPPC-Quercetina.D=95-05%DPPC-Quercetina.

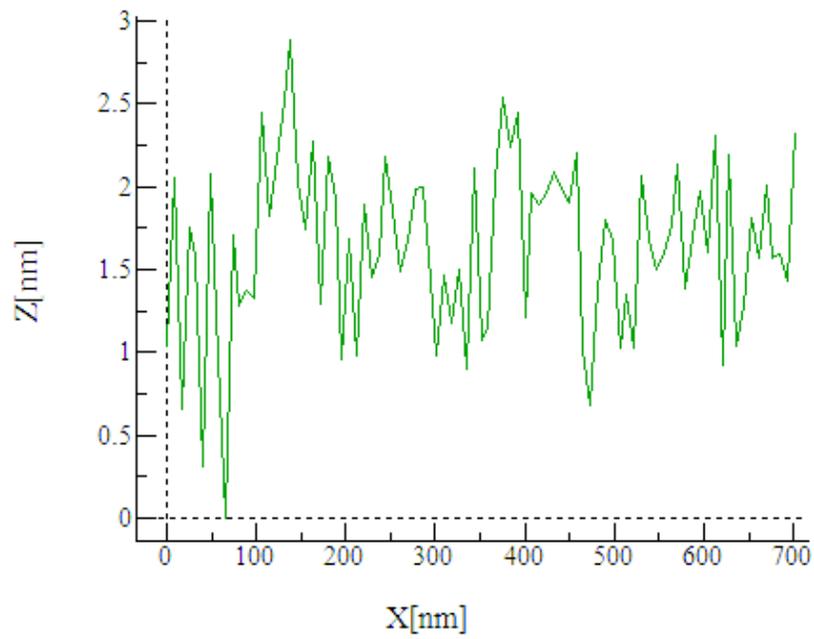
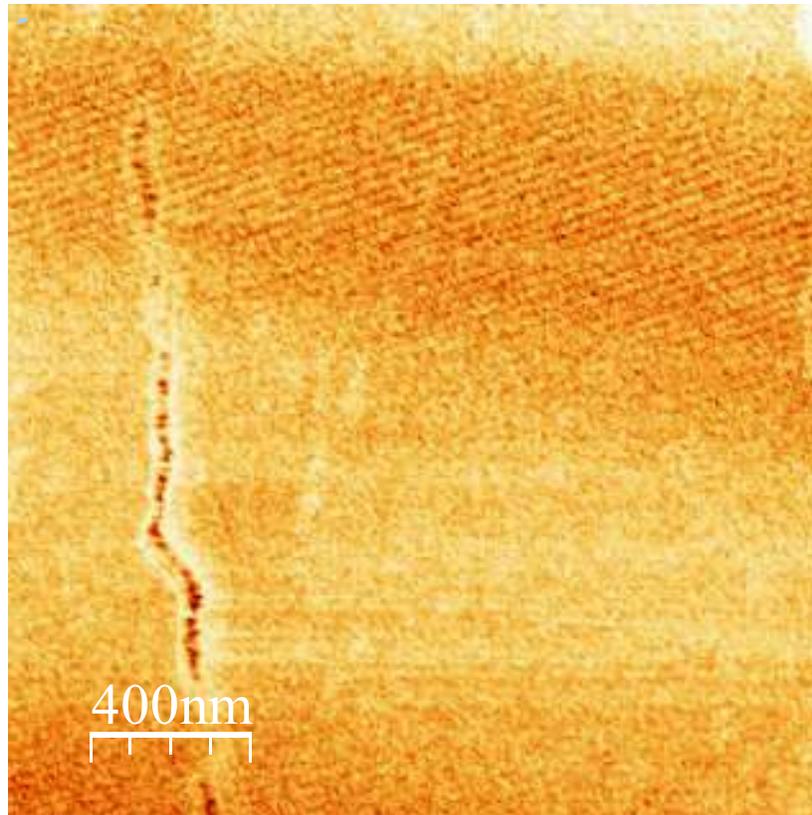


Figura 30. Monocapa de 100% transferida en mica a una presión de 25 mN/m, con su respectivo análisis de altura para el eje Z.

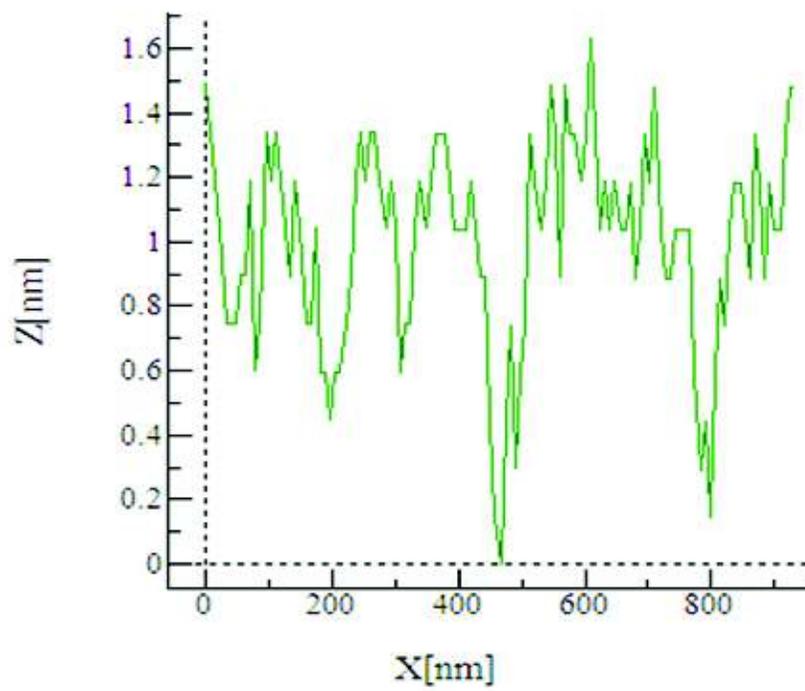
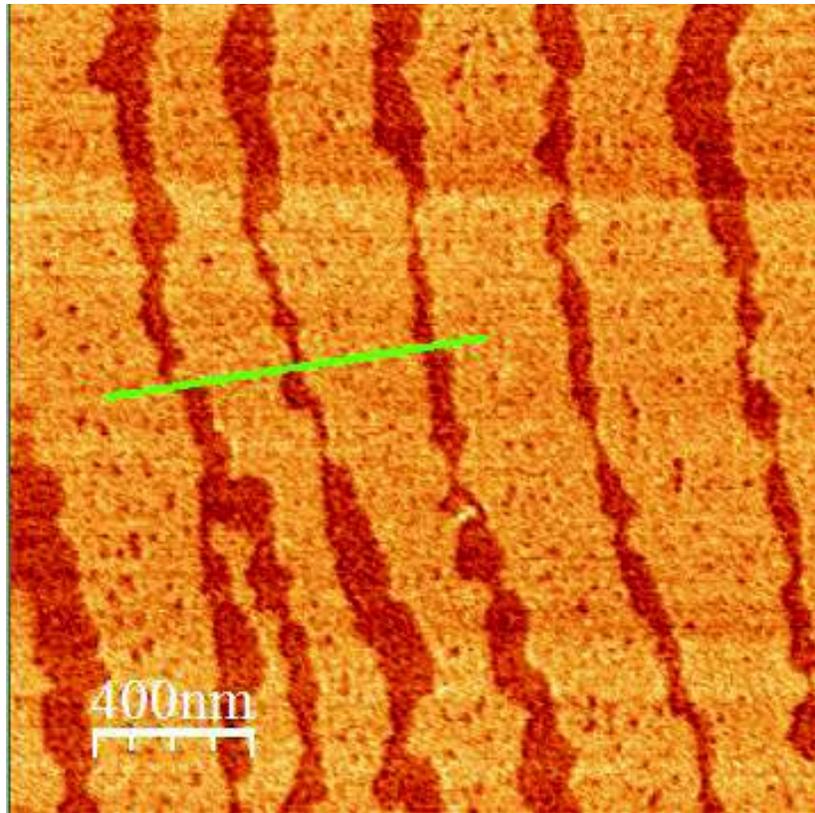


Figura 31. Monocapa de 70-30% DPPC-quercetina transferida en mica a una presión de 25 mN/m

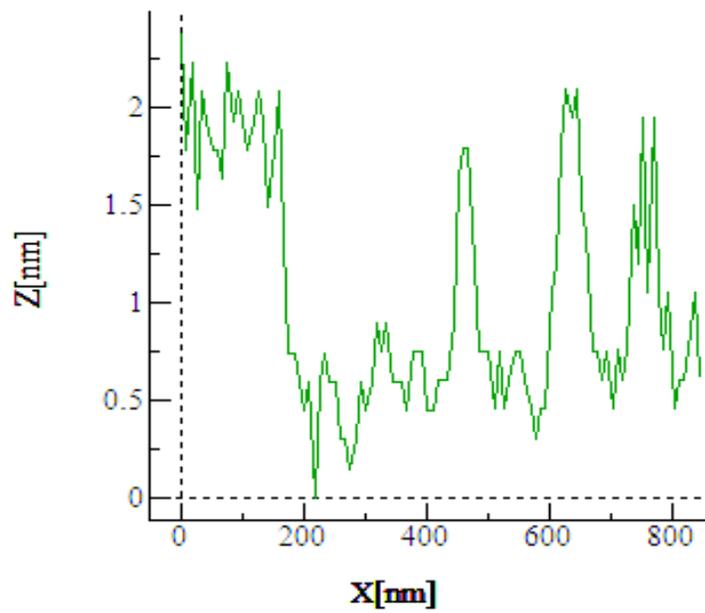
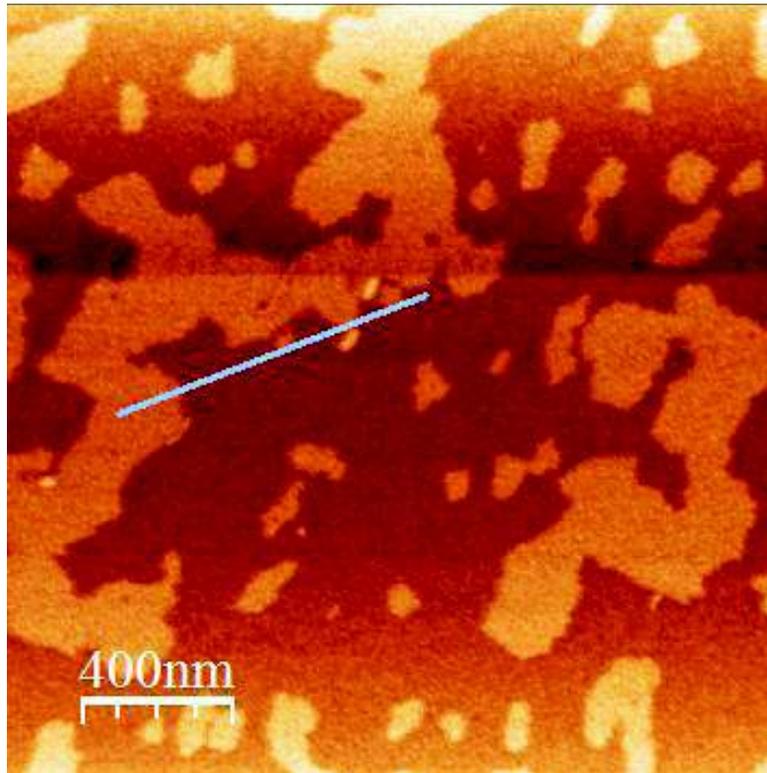


Figura 32. Monocapa de 90-10% DPPC-quercetina transferida en mica a una presión de 25 mN/m. con su respectivo análisis de alturas para el eje Z.

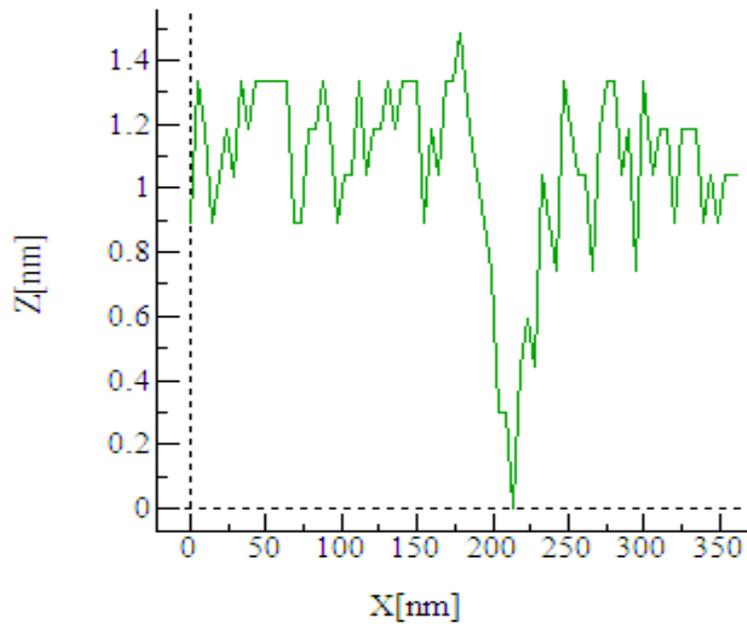
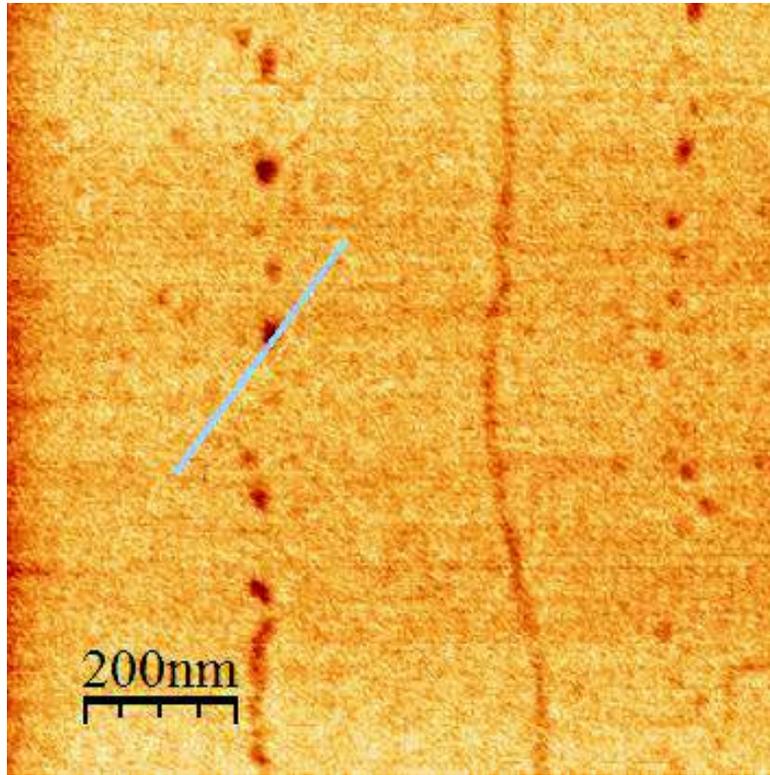


Figura 33. Monocapa de 95-05% DPPC-quercetina transferida en mica a una presión de 25 mN/m con su respectivo análisis de alturas para el eje Z.

## IX. DISCUSIÓN

El resultado de las isotermas sugiere una intercalación de las moléculas de quercetina en la monocapa. La interacción entre la quercetina con las cabezas polares de las moléculas de DPPC provoca que las isotermas presenten un corrimiento hacia áreas mayores, lo cual se explica con la incorporación de la quercetina en la monocapa. Se hace evidente también, la modificación de las fases de transición del DPPC. Tal como describen (Oteiza et al, 2005) que ciertos flavonoides como la naringenina y la genisteina pueden interactuar con las cabezas polares de los fosfolípidos en la bicapa lipídica y proteger a la célula de la agresión de moléculas dañinas como los radicales libres (Afanas'eva et al., 2007). Mediante un estudio de interacción entre liposomas con ciertos flavonoides, proponen que la quercetina a altas concentraciones, tiene de saturar los sitios de enlace con un modelo de membrana y, por lo cual, la interacción entre un fosfolípido y la quercetina disminuye a altas concentraciones del flavonoide. Al observar las diferentes isotermas generadas para diferentes concentraciones de DPPC-Quercetina, es evidente que las modificaciones corresponden a una concentración crítica, en la cual a pesar de la cantidad de quercetina, no existen efectos mayores sobre la monocapa. Esto se explica por una sobresaturación de moléculas de quercetina en la interfase, lo cual provoca una solubilización de las mismas en la subfase, recordando el carácter parcialmente hidrofóbico de la quercetina. Las implicaciones biológicas que puede tener este resultado es que debido a la capacidad antioxidante de la quercetina, esta puede tener la función de atrapar radicales libres posicionándose en la región polar de la membrana celular. Como es posible inferir, una membrana celular no posee presiones homogéneas. Una célula viva posee regiones de mayor o menor presión dependiendo de factores como proteínas incrustadas, la interacción con células vecinas, el tipo de célula, etcétera. El experimento de incrementos de presión en el cual se inyectó quercetina debajo de monocapas de DPPC formadas a diferentes presiones iniciales, simulando un ambiente extracelular saturado en quercetina, demuestra que la quercetina, tiene a tener una mayor penetración en la membrana en zonas donde la presión es menor. Por lo tanto, penetra selectivamente en zonas de la membrana donde la presión es menor.

Hoy en día es aceptado que las funciones celulares están directamente determinadas por su estructura. A diferentes niveles de jerarquía la organización estructural de la célula esta caracterizada por ciertas propiedades mecánicas. Es obvio que la estructura de una célula debe diferir, en procesos fisiológicos como diferenciación, crecimiento, adhesión, etcétera, a una célula bajo patogénesis, como por ejemplo, estrés oxidativo, ataque contra virus, parásitos (Kuznetsova et al, 2007). Tal como se demostró en el cálculo de los módulos elásticos, la quercetina le confiere una mayor elasticidad al modelo de membrana. El modulo elástico se redujo en función de la cantidad de quercetina, haciendo la misma menos rígida. Las implicaciones biológicas que esto tiene, son por ejemplo, que a mayor elasticidad de una membrana se favorecen los procesos de división celular, así como la exocitosis y endocitosis. Los modelos actuales de la bicapa lipídica definen a la misma como un mosaico fluido con proteínas embebidas. Una de las ventajas de una célula sana es la fluidez en la membrana. Esto permite que las proteínas embebidas en la misma tengan una mejor movilidad dentro de la membrana. Estas proteínas pueden ser receptores o proteínas de señalización importantes para la regulación de procesos celulares tales como la división celular y la apoptosis (Oteiza et al., 2005). Una mayor rigidez en la membrana puede modificar la funcionalidad de dichas moléculas. Los surfactantes pulmonares es la superficie activa del alveolo y consiste aproximadamente de 90% lípidos y entre 5-10% proteínas. De los surfactantes pulmonares entre 80-90% son fosfatidilcolinas, de las cuales más de la mitad son dipalmitoilfosfatidilcolinas (DPPC). El DPPC no solo es el componente primario de los surfactantes pulmonares, también se cree que es el responsable de la reducción de la tensión superficial casi a cero en los pulmones (Duncan y Larson, 2008). En algunos tipos de células como los alveolos pulmonares o las células cardíacas, donde se presentan ciclos de expansión y compresión, es decir, donde la membrana se deforma para después regresar a su estado inicial cíclicamente, es importante que la membrana permanezca estable. El experimento de los ciclos de expansión y compresión demostró que la presencia de la quercetina le confiere mayor estabilidad al modelo de membrana. Esto se tradujo en mayor retención del fosfolípido en la interfase durante cada ciclo. Al igual que en las isothermas y los módulos, la proporción 90-10% DPPC-quercetina fue la que presentó una mayor estabilidad sobre las demás proporciones. Para corroborar los resultados se empleó microscopia de ángulo de Brewster y microscopia de fuerza

atómica. Las imágenes de microscopia de ángulo de Brewster prueban que hay una mayor retención de quercetina en la interfase cuando la proporción de la misma es menor en relación al DPPC. Del mismo modo las imágenes de microscopia de fuerza atómica hacen evidente que la modificación de la monocapa está directamente afectada por la cantidad de quercetina hasta llegar a un punto crítico en el cual la quercetina no surte mayor efecto. El punto máximo de modificación se logró con una proporción 90-10% DPPC- quercetina en ambas pruebas de microscopia. Los datos indican que la proporción 90-10% DPPC- Quercetina es la que mayor efecto tuvo sobre las monocapas. Esto sugiere que los cambios responden a una proporción crítica donde, una mayor concentración provoca una saturación inmediata de los puntos de unión, lo cual permite una migración mediante la solubilización de los excedentes de quercetina hacia la subfase.

## X. CONCLUSIONES

Con este trabajo se concluye que queda demostrada la interacción entre la quercetina y un modelo de membrana de DPPC.

En este trabajo se generó información sobre el comportamiento de la quercetina en un sistema de Langmuir en la interfase aire-agua.

Mediante las isotermas fue posible corroborar la presencia de la quercetina en forma intercalada en la región polar de la fosfatidilcolina.

Se conocieron las modificaciones en los cambios de fases del DPPC en presencia de la quercetina en la interfase.

Mediante los incrementos en presiones iniciales, se obtuvieron datos cuantitativos sobre la penetración de la quercetina en un modelo de membrana a diferentes presiones iniciales.

Los módulos elásticos evidenciaron que la cantidad quercetina presente en la interfase afecta directamente la rigidez del modelo de membrana.

Los ciclos de expansión y compresión demuestran una mayor estabilidad de la monocapa conferida por la presencia de la quercetina en el sistema.

Las imágenes de AFM y de microscopia de ángulo de Brewster, apoyan los datos obtenidos por las isotermas, los módulos y los ciclos, así como también indican que para efectos a nivel celular, es más importante la naturaleza química y afinidad con la membrana celular lo que determina su adsorción en la misma, dejando esto en un plano secundario la cantidad de flavonoides que se incorporen a un sistema.

Como perspectivas futuras para este trabajo se sugiere un análisis de

espectroscopia Raman para conocer el sitio de enlace entre el DPPC y la quercetina, así como la variación en el pH de la subfase, o la presencia de iones en la misma. También la utilización de mezclas de fosfolípidos y ácidos grasos en el modelo. Esto con la intención de ajustar más el modelo a condiciones fisiológicas.

## XI. REFERENCIAS

- Adamson, A. W. 2004. *Physical Chemistry of Surfaces*. Wiley- Interscience. 76-89 pp.
- Afanas'eva, Y. G., Fakhretdinova, E. R., Spirikhin, L. V. y Nasibullin, R. S. 2007. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 41 (7):354-356
- Becker and Deamer. 1991. *The World of the Cell - 2nd edition*. Benjamin/Cummings Publishing Company Inc. 68-96 pp.
- Bijal Patel, Sattwik das, Ravi Prakash, Mohammad Yasir. 2010. Natural Bioactive Compound with Anticancer Potential. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences* 1:32-41.
- Cody, V. 1986. Plant Flavonoids in Biology and Medicine. *Prog. Clin. Biol. Res.* 213:154-167.
- Csokay, B., Prajda, N., Weber G. y Olah, E. 1997. Molecular mechanisms in the antiproliferative action of quercetin. *Life Sci.* 60(24):2157–2163.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C. y Masella, R. 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super Sanita* 43:348-361.
- Degen, P., Rehage, H., Klarner, F. G. y Polkowska, J. 2005. Characterization of Langmuir-monolayers of molecular clips by means of Brewster-angle-microscopy. *J.Colloid Polym. Sci.* 284:44–50.
- Duncan, S. L. y Larson, R.G. 2008. Comparing experimental and simulated pressure-area isotherms for DPPC. *Biophysical Journal* 94:2965-2986.
- Edwards, R. L., Lyon, T., Litwin, S. E., Rabovsky, A., Symons, J. D. y Jalili, T. 2007. Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. *J. Nutr.* 137 (11): 2405–11
- Gaines, G. L. 1966. *Insoluble Monolayers at the Liquid-Gas Interface*, Wiley-Interscience, New York. 236:43-95
- Hann, R. H. 1990. Molecules for Langmuir-Blodgett film formation. *J. Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 330:141-150.
- Hardy, W. B. 1939. *Collected Scientific Papers*. Cambridge University Press. 17:508-550 pp.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. y Bobilya, D. J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry,

- metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem* 13:572-584.
- Hendrich, A. 2006. Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacologica Sinica* 27:27-40.
- Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H. y Katan M. B. 1992. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the netherlands. *J Agric Food Chem.* 40(12):2379-2383
- Holst, B. y Williamson, G. 2008. 1, 2 Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Curr. Opin. Biotechnol* 19:73–82.
- Hu, M. 2007. Commentary: Bioavailability of Flavonoids and Polyphenols: Call to Arms. *Mol. Pharm.* 4:803–806.
- Maget-Dana, R. 1999. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *J. Biochimica et Biophysica Acta* 1462:109-140.
- Morris, V. J., Kirby, A. R. y Gunning, A. P. 2001. *Atomic Force Micsocopy for Biologist.* Imperial College Press. London. 78-96 pp.
- JuQun, X. I., Rong, G. 2005. Studies on molecular interactions between puerarinand PC liposomes. *J. Chinese Science Bulletin.* 52(19):2612-2617.
- Kuznetsova, T. G., Starodubsteva, M. N., Yegorenkov, N. I., Chizhik, S.A. y Zhdanov, R. I. 2007. *Microm* 38:824-833.
- Middleton, E., Jr, K. C. y Theoharides, T. C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* 52(4):673–751.
- Miñones, Jr. J., Dynarowicz- Latka, P. R., Seoane, E., Iribarnegaray, M. C. 2004. Brewster angle microscopy studies of the morphology in dipalmitoyl phosphatidyl glycerol monolayers spread on subphases of different pH. *J. Progr Colloid Polym Sci.* 123:160–163.
- Ollila, F., Halling, K., Vourela, P., Vuorela, H. y Slotte, J. P. 2002. Characterization of flavonoid-biomembrane interactions. 399:103-108.
- Oteiza. P. I., Erlejman. A.G., Verstraeten. S.V., Keen, C. L. y Fraga. C. G. 2005. *Clinical and developmental Immunology* 12(1):19-25.

- Rispoli, P., Carzino, R., Svaldo-Lanero, T., Relini, A., Cavalleri, O., Fasano, A., Liuzzi, G. M., Carlone, G., Riccio, P., Gliozzi, A., Rolandi, R. A. 2007. A Thermodynamic and Structural Study of Myelin Basic Protein in Lipid Membrane Models. *Biophysical Journal* 93(6):1999–2010.
- Roberts, G. Ed. 1990. *Langmuir-Blodgett Films*, Plenum Press. New York, Estados Unidos de América. 153-356 pp.
- Saija, A., Bonina, F. y Trometla, D., et al. 1995. Flavonoid-biomembrane interactions: a calorimetric study on dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles. *Int J Pharm.* 124(1):1-8.
- Shirataki, Y., Motohashi, N. 2009. Flavonoids in Sophora Species. *J. Top Heterocycl Chem.* 16:41-91.
- Wei, Y. Q., Zhao, X., Kariya, Y., Fukata, H., Teshigawara, K. y Uchida, A. 1994. Induction of apoptosis by quercetin: Involvement of heat shock protein. *Cancer Res.* 54(18):4952-4957.
- Winkel-Shirley, B. 2003. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *J. Plant Physiology* 126:485-493.
- Wimley, W. C. 2001. The Fluid Mosaic Model of Biological Membranes. Estados Unidos. 563-586.
- Whaley, W. L., Rummel, J. D. y Kastropeli, N. 2006. Interactions of genistein and related isoflavones with lipid micelles. *Langmuir* 22(17):7175-7184.
- Paliwal, S., Sundaram, J. y Mitragotri, S. 2005. Induction of cancer-specific cytotoxicity towards human prostate and skin cells using quercetin and ultrasound. *British Journal of Cancer* 92(3):499-502.