

## ASPECTOS MOLECULARES Y TERMODINAMICOS DE LA VEHICULIZACION DE ANTIMICROBIANOS NATURALES EN NANOCOMPLEJOS PROTEICOS

Gorostiague Martín

Instituto de Tecnología de Alimentos ITA-FIQ-UNL

Área: Ciencias Exactas

Sub-Área: Química

Grupo: X

Palabras clave: Carvacrol, Timol, Ovoalbúmina

### INTRODUCCIÓN

La investigación sobre nuevos compuestos antimicrobianos de origen natural constituye un campo de creciente interés científico. El reino vegetal ofrece una amplia variedad de estos compuestos los que, por lo general, se producen a partir del metabolismo secundario de plantas bajo respuesta a diversos factores medioambientales. Debido a sus características hidrofóbicas, estos compuestos se encuentran en aceites esenciales (a nivel de trazas) y sus propiedades antimicrobianas son atribuidas a la acción individual y/o combinada de sólo unos pocos compuestos bioactivos. Actualmente, los compuestos fenólicos, carvacrol (Car: 5-isopropil-2-metilfenol) y timol (Thy: 2-isopropil-5-metilfenol), obtenidos a partir de los aceites esenciales de orégano y tomillo, han despertado interés debido a sus potentes acciones contra bacterias, levaduras, hongos y virus. Como puede apreciarse en la Fig. 1, ambos compuestos son isómeros que defieren en la posición del grupo –OH, el cual se conoce es responsable de la actividad antimicrobiana (Tajkarimi y col. 2010). Sin embargo, el empleo de los mismos es restringido por su escasa solubilidad acuosa y elevada volatilidad.

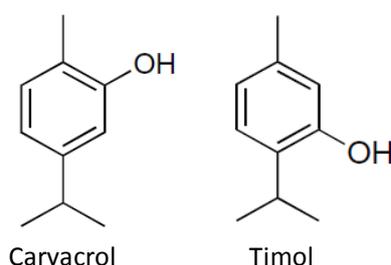


Figura 1: Estructura química de los compuestos carvacrol (izq.) y timol (der.).

Estos compuestos fenólicos podrían encontrar mayor número de aplicaciones si de alguna manera son convenientemente vehiculizados. Una estrategia para incrementar su solubilidad y retención en medios acuosos podría hacer uso de la capacidad intrínseca de unir ligandos hidrofóbicos que presentan algunas proteínas globulares,

**Proyecto:** PIO-CONICET-146-201401-00025-CO: "Incorporación de nanopartículas biopoliméricas con actividad antimicrobiana en películas biodegradables"

**Director del proyecto:** Dr. Adrián A. Perez

**Director del tesinista:** Dr. Adrián A. Perez, **Co-director del tesinista:** MSc. Liliana G. Santiago

entre ellas, las albúminas (Perez y col. 2014). Sin embargo, hasta el presente, se dispone de un conocimiento limitado sobre los aspectos moleculares y termodinámicos que rigen la vehiculización de los compuestos fenólicos, Car y Thy, bajo la forma de nanocomplejos proteicos. Por lo tanto, el objetivo de la presente contribución es brindar información sobre estos aspectos.

## METODOLOGÍA

### Materiales

Ovoalbúmina (OVA, pureza 98%), carvacrol (Car) y timol (Thy) (ambos de pureza  $\geq 95.0\%$ ) fueron adquiridos de Sigma Aldrich (USA). La sonda fluorescente ácido 1,8 anilino-naftalen sulfónico (ANS) fue comprada en Fluka Chemie AG (Suiza).

### Formación de nanocomplejos

La vehiculización de Car y Thy bajo la forma de complejos con OVA fue monitoreada por espectroscopía de fluorescencia intrínseca. Para ello se realizó la titulación de una solución de OVA 1  $\mu\text{M}$  (buffer fosfato 50 mM pH 7,0) con concentraciones crecientes de Car y Thy (0-200  $\mu\text{M}$ ). Los espectros de emisión se obtuvieron a una longitud de onda de excitación de 295 nm (debido a Trp). Los datos experimentales fueron ajustados al modelo de Scatchard modificado para la obtención de la estequiometría de unión o número de moléculas de Car y Thy unidas por unidad monomérica de OVA ( $n$ ) y la constante de asociación ( $K_a$ ), de acuerdo al siguiente par de ecuaciones:

$$[P] \cdot (1 - f_i) = \frac{[L]}{n'} \cdot \left( \frac{1}{f_i} - 1 \right) - \frac{1}{K_a \cdot n'} \quad ; \quad f_i = \frac{F - F_0}{F_{\max} - F_0} \quad (1)$$

donde  $P_{\text{total}}$  es la concentración total de OVA,  $[L]$  es la concentración total de ligando (Car o Thy),  $n$  es el número de moléculas de ligando unidas a OVA en la saturación,  $K_a$  es la constante de afinidad,  $f_i$  es la fracción de sitios ocupados por el ligando. Para su mejor interpretación los datos de fluorescencia fueron expresados en términos de intensidad de fluorescencia relativa,  $\text{IFR}_{\text{Trp}} = \text{IF}/\text{IF}_0$ , donde  $\text{IF}$  es la intensidad de fluorescencia a una dada concentración de ligando e  $\text{IF}_0$  es la intensidad de fluorescencia de OVA pura. Los ensayos intrínsecos se realizaron en el rango de temperatura comprendido entre 15 y 45  $^{\circ}\text{C}$  a fin de calcular los parámetros termodinámicos involucrados en la vehiculización. Para ello se aplicó el siguiente par de ecuaciones (Sponton y col. 2016):

$$\ln K_0 = \frac{\Delta S^0}{R} - \frac{\Delta H^0}{RT} \quad ; \quad \Delta G^0 = -T \cdot \Delta S^0 + \Delta H^0 \quad (2)$$

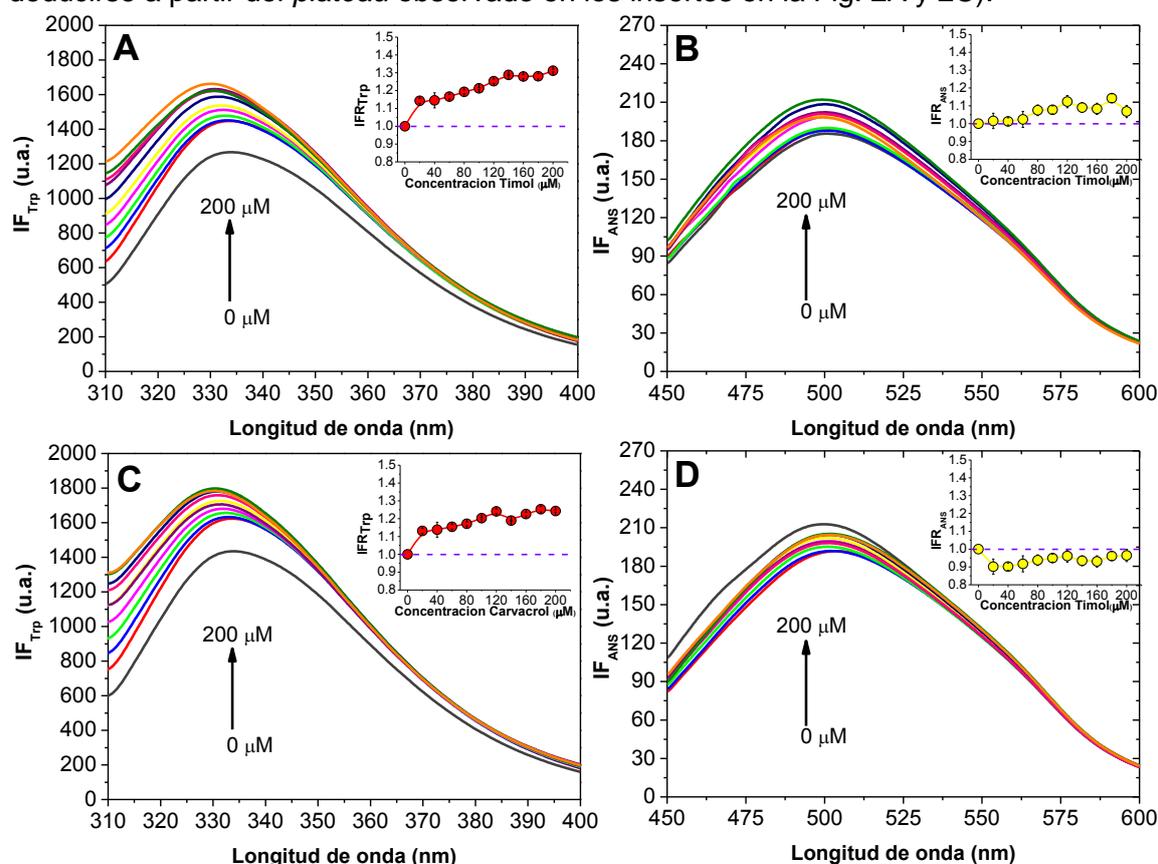
Por otro lado, con el objeto de conocer el modo de unión de Car y Thy a OVA se realizaron ensayos de fluorescencia extrínseca usando la zona fluorescente, ácido 1,8 anilino-naftalen sulfónico (ANS). Para ello, posteriormente a los ensayos intrínsecos, se adicionaron 9  $\mu\text{l}$  de ANS 15 mM a cada tubo y se determinaron los espectros de emisión a una longitud de onda de excitación de 390 nm (Hitachi F2000, Japón). Además, los resultados fueron expresados en términos relativos como  $\text{IFR}_{\text{ANS}} = \text{IF}_{\text{ANS}}/\text{IF}_{0\text{ANS}}$ , siendo  $\text{IF}_{\text{ANS}}$  la intensidad de fluorescencia extrínseca a una dada concentración de ligando e  $\text{IF}_{0\text{ANS}}$  es la intensidad de fluorescencia extrínseca de OVA pura (Perez y col. 2014). Las determinaciones extrínsecas se realizaron a 25 $^{\circ}\text{C}$  al menos por triplicado.

Por último, la distribución de tamaño de partícula (PSD) de OVA y de los complejos

OVA-Car y OVA-Thy fue determinada en un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, UK). Las determinaciones se realizaron al menos por triplicado.

### Propiedades fluorescentes de complejos OVA-Thy y OVA-Car

La Fig. 1 presenta el efecto de la concentración de los compuestos fenólicos antimicrobianos, Thy y Car, sobre la intensidad de emisión de fluorescencia intrínseca ( $IF_{TTP}$ ) y extrínseca ( $IF_{ANS}$ ) de OVA. Se observó que el aumento en la concentración de ambos ligandos produjo un incremento en  $IF_{TTP}$  de OVA (Fig. 2A y 2C), lo que se relacionaría con la formación de complejos macromoleculares en solución acuosa. En el rango de concentraciones evaluado, se observó que la vehiculización de ambos ligandos alcanzó la saturación de sitios de unión disponibles en OVA (como puede deducirse a partir del *plateau* observado en los insertos en la Fig. 2A y 2C).



**Figura 2:** Efecto de la concentración de ligando (0 a 200  $\mu\text{M}$ ) sobre la emisión de fluorescencia intrínseca ( $IF_{TTP}$ ) y extrínseca ( $IF_{ANS}$ ) de Ovoalbúmina: (A) y (B) Corresponden al efecto de Timol, (C) y (D) Corresponden al efecto de Carvacrol. Los insertos refieren a la intensidad de fluorescencia relativa tanto intrínseca ( $IFR_{TTP}$ ) como extrínseca ( $IFR_{ANS}$ ). Temperatura 25°C, pH 7 (buffer fosfato 50 mM), 1  $\mu\text{M}$  OVA.

El ajuste de los datos experimentales al modelo de Scatchard modificado (Ec. 1) rindió en los siguientes valores de  $n$  y  $K_a$ : (i) Complejo OVA-Thy,  $n$ :  $146 \pm 2$  y  $K_a$ :  $(7,2 \pm 0,5) \times 10^5$  M, (ii) Complejo OVA-Car,  $n$ :  $189 \pm 5$  y  $K_a$ :  $(6,0 \pm 0,8) \times 10^5$  M. A partir de estos resultados puede deducirse que la vehiculización de los ligandos se produce a nivel de un único dominio sobre el monómero de OVA, el que puede unir en promedio 146 moléculas de Thy y 189 moléculas de Car, en un orden de afinidad de unión similar ( $10^5$  M). La diferencia en el número de moléculas de ligando vehiculizadas serían atribuidas a la diferente posición del grupo  $-\text{OH}$  en la estructura química de estos

compuestos (Fig. 1). Para el caso de Car, la ubicación del grupo –OH respecto a la posición de los grupos metilo e isopropilo podría promover una mayor carga de ligando a nivel del dominio de unión en OVA.

Por otro lado, como puede apreciarse en las Fig. 2B y 2D, el aumento en la concentración de los compuestos antimicrobianos, Thy y Car, influyó levemente sobre la  $IF_{ANS}$  de OVA. Es bien conocido que ANS se une de manera no covalente a los sitios hidrofóbicos expuestos sobre la superficie de proteínas globulares (Perez y col. 2014). Por lo tanto, a partir de los insertos en las Fig. 2B y 2D pueden deducirse dos comportamientos o modos de unión: (i) ANS desplazaría completamente a los ligandos superficialmente unidos, o (ii) ANS se uniría en un dominio diferente sobre la superficie de OVA. La prevalencia de esta última hipótesis indicaría que la vehiculización de Car y Thy bajo la forma de complejos con OVA implicaría cierto nivel de especificidad molecular. Sin embargo, la comprobación de dicha hipótesis requeriría abordar estudios moleculares complementarios. Por otra parte, el análisis de PSD permitió confirmar la escala de tamaño en la que transcurre la formación de estos complejos. Para ambos sistemas, se obtuvieron tamaños inferiores a 100 nm, por lo que los mismos podrían considerarse nanopartículas, nanocomplejos o nanovehículos (datos no mostrados).

Por último, la aplicación de las ecuaciones (2) permitió la obtención de los parámetros termodinámicos involucrados en la vehiculización de Car y Thy bajo la forma de nanocomplejos con OVA. Para OVA-Thy se obtuvieron:  $\Delta H^0$ :  $82,8 \times 10^3$  J/mol,  $\Delta S^0$ :  $0,4 \times 10^3$  J/mol.K y  $\Delta G^0_{25^\circ C}$ :  $-30,1 \times 10^3$  J/mol. Por otra parte, para OVA-Car se obtuvieron:  $\Delta H^0$ :  $81,5 \times 10^3$  J/mol,  $\Delta S^0$ :  $0,4 \times 10^3$  J/mol.K y  $\Delta G^0_{25^\circ C}$ :  $-34,6 \times 10^3$  J/mol. Debido al signo de los parámetros termodinámicos, podría concluirse que la vehiculización de ambos compuestos antimicrobianos constituye un proceso espontáneo, endotérmico y conducido entrópicamente mediante interacciones hidrofóbicas (Sponton y col. 2016). Un análisis de la magnitud de los mismos sugeriría que la vehiculización de Car constituye un proceso levemente más espontáneo y, por lo tanto, requeriría una menor energía que la vehiculización de Thy. Estas diferencias podrían ser atribuidas al coeficiente de reparto o partición (P) que presentan estos compuestos. El log P (considerado una medida de la hidrofobicidad molecular) de Car (3,52) es levemente superior al de Thy (3,30) (Tajkarimi y col. 2010). Por lo tanto, la magnitud de la hidrofobicidad molecular que manifiestan estos compuestos podría explicar el comportamiento termodinámico de la vehiculización.

En resumen, la vehiculización de los antimicrobianos fenólicos, Car y Thy, bajo la forma de nanocomplejos de OVA, pudo ser descrita en términos moleculares, estequiométricos y termodinámicos. La formación de estos nanocomplejos en solución acuosa supone un incremento de su solubilidad y retención en formulaciones acuosas, lo que amplía sus potenciales aplicaciones. Por último, se tiene que alteraciones en la locación de ciertos grupos funcionales (en este caso -OH) podría promover diferencias en la carga, modo de unión y energía requerida para la construcción de sistemas antimicrobianos innovadores basados en nanocomplejos proteicos.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

**Tajkarimi M.M., Ibrahim S.A., Cliver D.O.**, 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21,1199–1218.

**Sponton O.E., Perez A.A., Carrara C.R., Santiago L.G.**, 2016. Complexes between ovalbumin nanoparticles and linoleic acid: Stoichiometric, kinetic and thermodynamic aspects. *Food Chemistry*, 211, 819-826.

**Perez A.A., Andermatten R.B., Rubiolo A.C., Santiago L.G.**, 2014. Beta-lactoglobulin heat-induced aggregates as carriers of polyunsaturated fatty acids. *Food Chemistry*, 158, 66-72.