

LA INTERFASE LIPÍDICA COMO SITIO DE RECONOCIMIENTO DEL ACIDO CLOROGÉNICO (CGA) Y SU INFLUENCIA EN LA ACTIVIDAD ANTIRADICALARIA

Cejas Jimena. P^{1*}, Rosa Antonio S.¹, Disalvo Edgardo A.¹ y Frías María A.¹

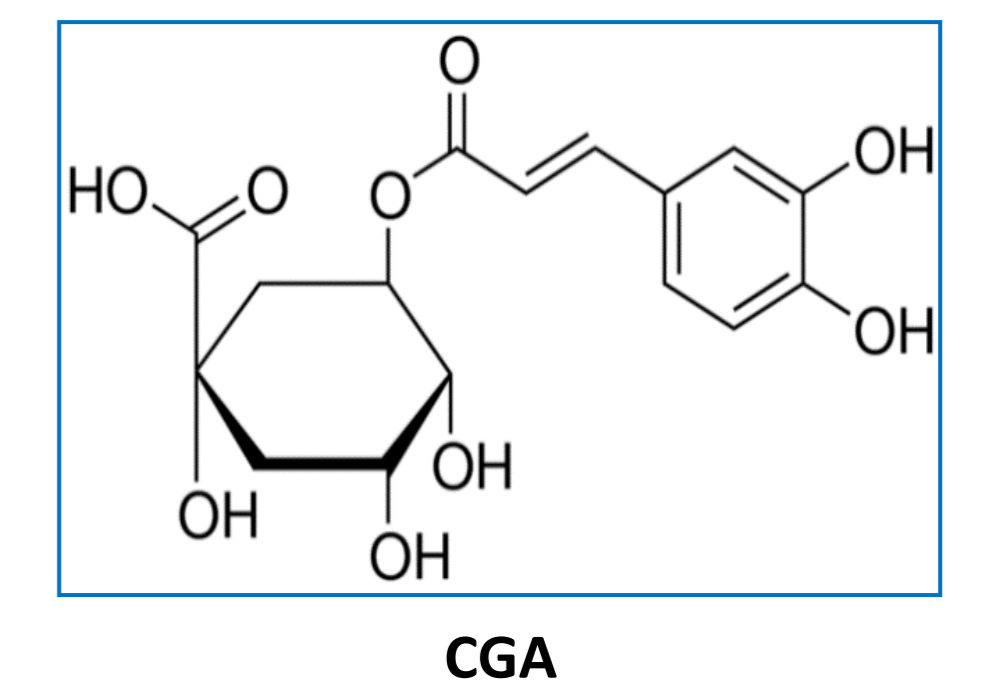
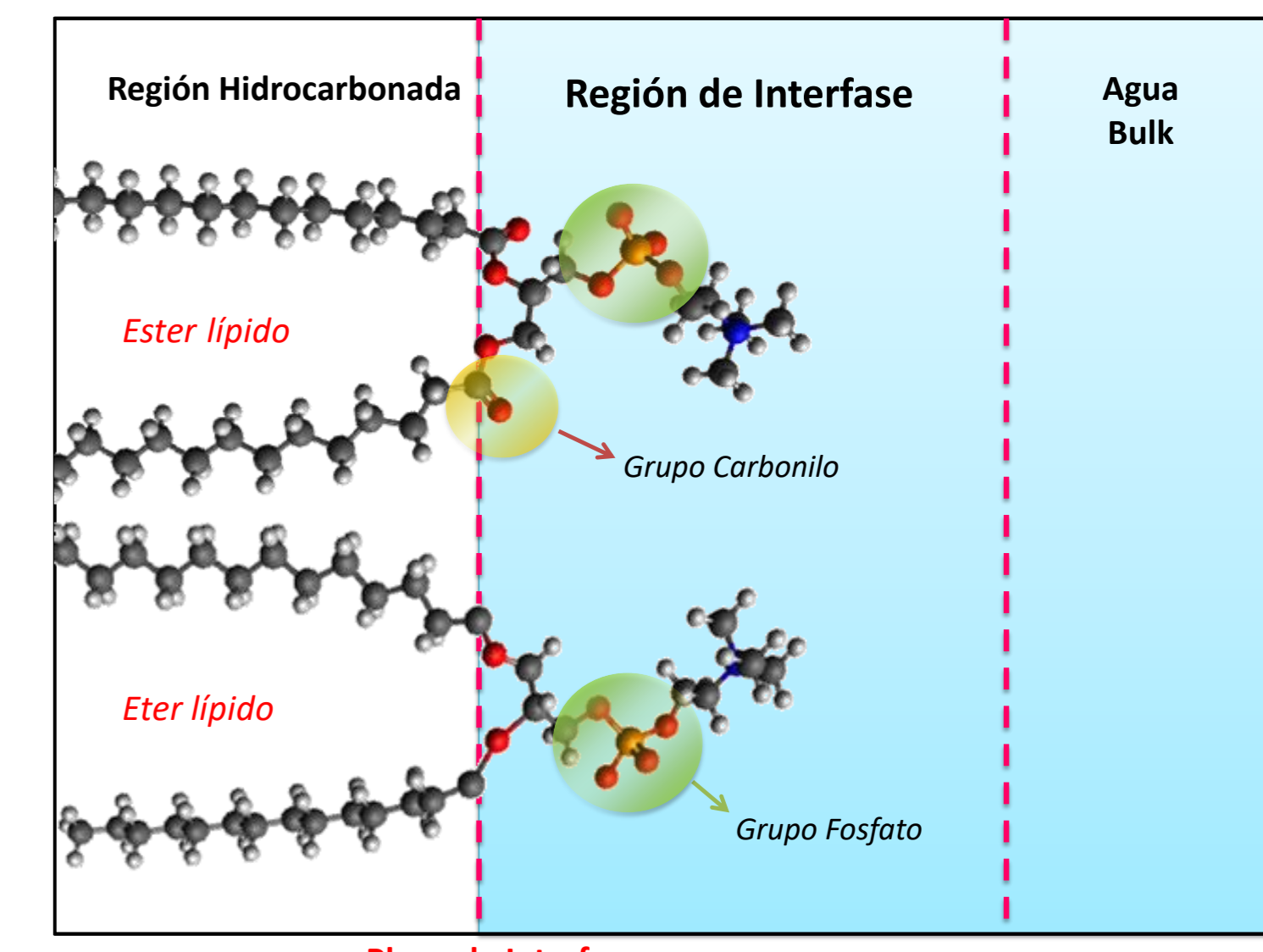
¹ Laboratorio de Biointerfases y Sistemas Biomiméticos, Centro de Investigación en Biofísica Aplicada y Alimentos (CIBAAL).UNSE-CONICET.

*jimena.cejas@yahoo.com.ar

INTRODUCCIÓN:

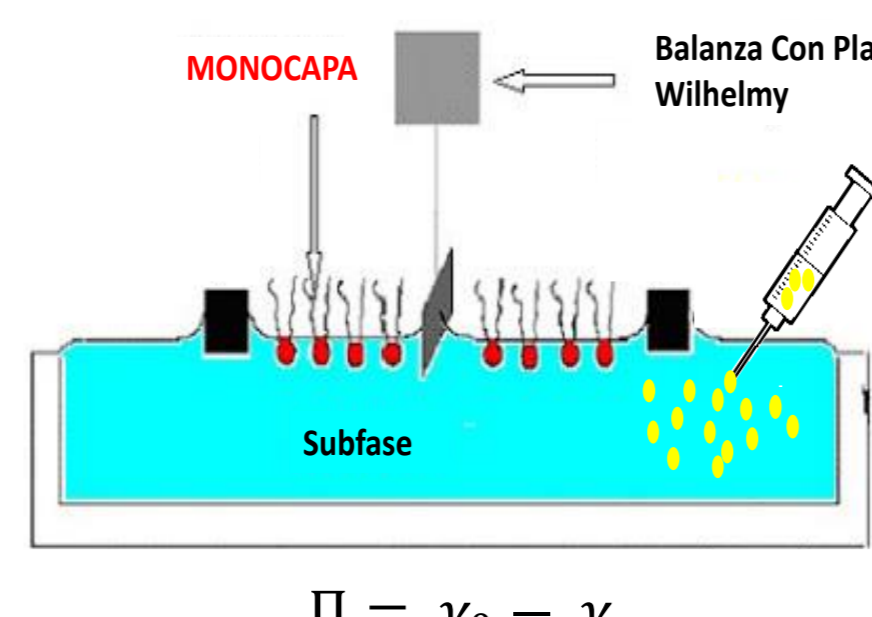
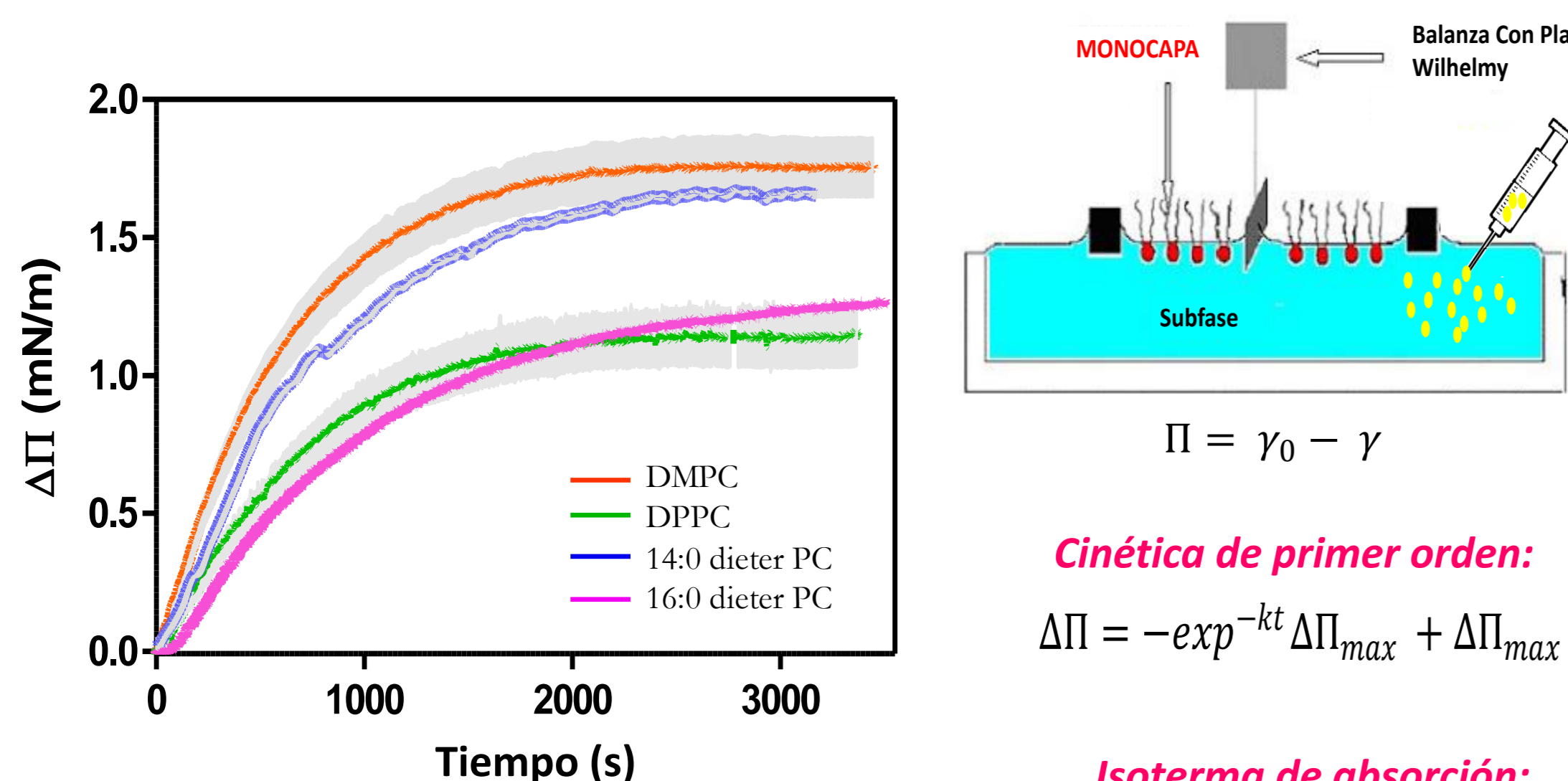
La superficie de una membrana lipídica puede considerarse como una solución bidimensional compuesta por grupos polares hidratados, denominada interfase. El estado de los lípidos en la membrana generan en esa región arreglos moleculares específicos del agua en sitios de hidratación como los grupos carbonilo (CO), que pueden servir de reconocimiento de efectores biológicamente relevantes como el ácido clorogénico (CGA). El CGA es un polifenol antioxidante natural que posee beneficios relacionados a interacciones con membranas de glóbulos rojos. Sin embargo, los detalles sobre su acción en membranas de diferente composición aún no están definidos.

Por esta razón, se estudió la interacción de CGA con membranas lipídicas modelos (monocapas y bicapas) compuestas por éster lípidos (DMPC y DPPC) y éter lípidos (14:0 y 16:0 diéter PC). Se estudió el efecto de CGA sobre la cinética de absorción en monocapas a diferentes presiones superficiales. En particular, se siguió la cinética de la interacción y se relacionó con los cambios estructurales producidos en la interfase correlacionados con interacciones específicas de CGA con grupos funcionales de lípidos mediante el análisis de Reflectancia Total Atenuada (ATR)-FTIR. Asimismo, se evaluó los cambios de presión superficial ($\Delta\Pi$) generados por el CGA a diferentes actividades de agua en la interfase. Se discute la actividad antirradicalaria (ARA) del CGA en vesículas unilamelares, reflejada por la reducción de absorbancia del radical catión ABTS^{•+}, dependiendo del estado de hidratación de la interfase lipídica.



RESULTADOS:

CAMBIOS EN LA PRESIÓN SUPERFICIAL DE LAS MONOCAPAS LIPÍDICAS

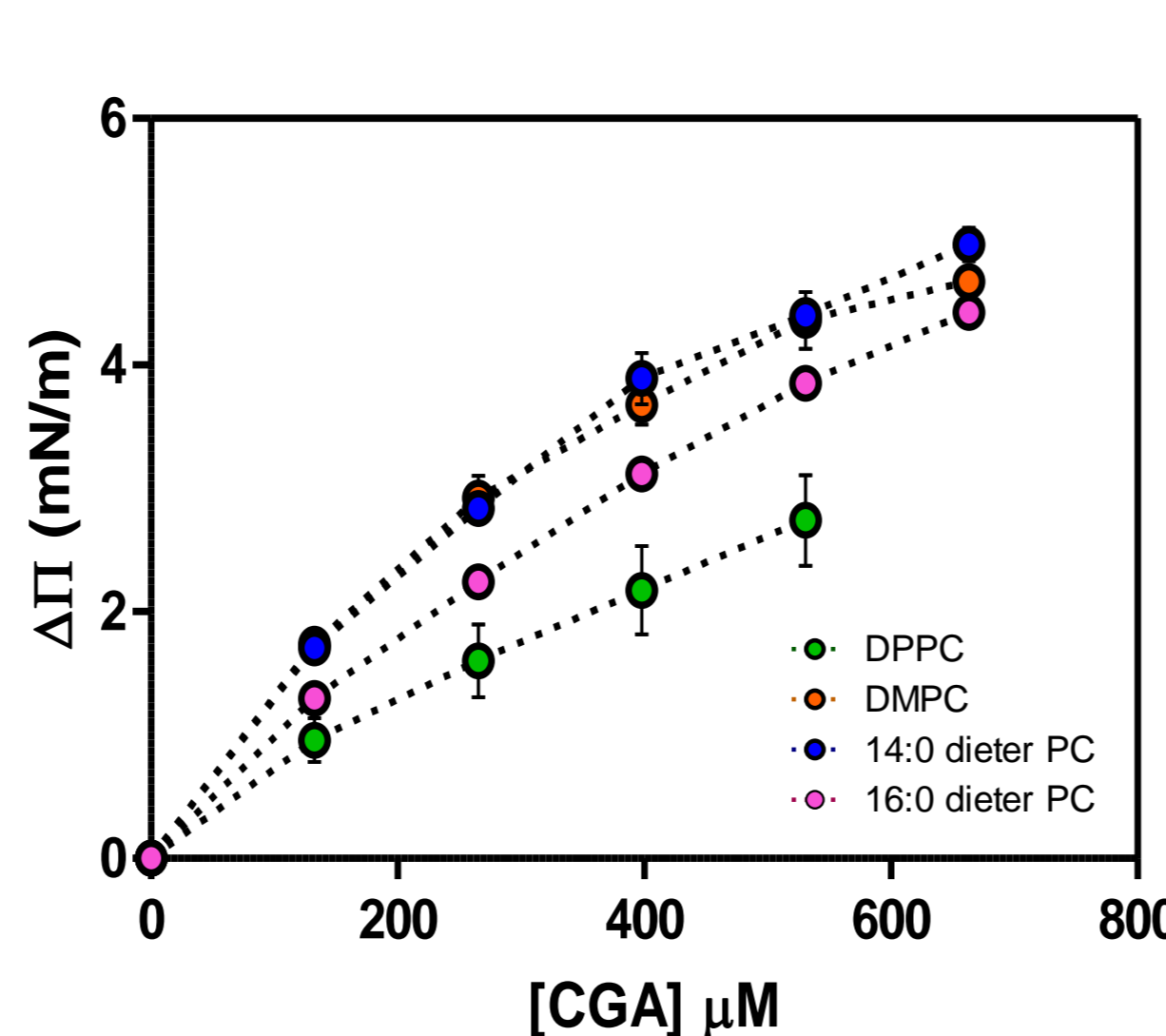


$$\Pi = \gamma_0 - \gamma$$

Cinética de primer orden:
$$\Delta\Pi = -\exp^{-kt} \Delta\Pi_{max} + \Delta\Pi_{max}$$

Isoterma de absorción:

$$\theta = \frac{\Delta\Pi}{\Delta\Pi_{max}} = \frac{[CGA]^r}{K_d + [CGA]^r}$$



Cambios en la presión superficial en función de cantidades crecientes de CGA en la subfase de monocapas a $\Pi_0 = 20 \pm 0.5$ mN/m a 20 °C.

Solución de la ley de Fick:

$$\Pi = \frac{2RTC_b}{\pi^{1/2}} D^{1/2} t^{1/2}$$

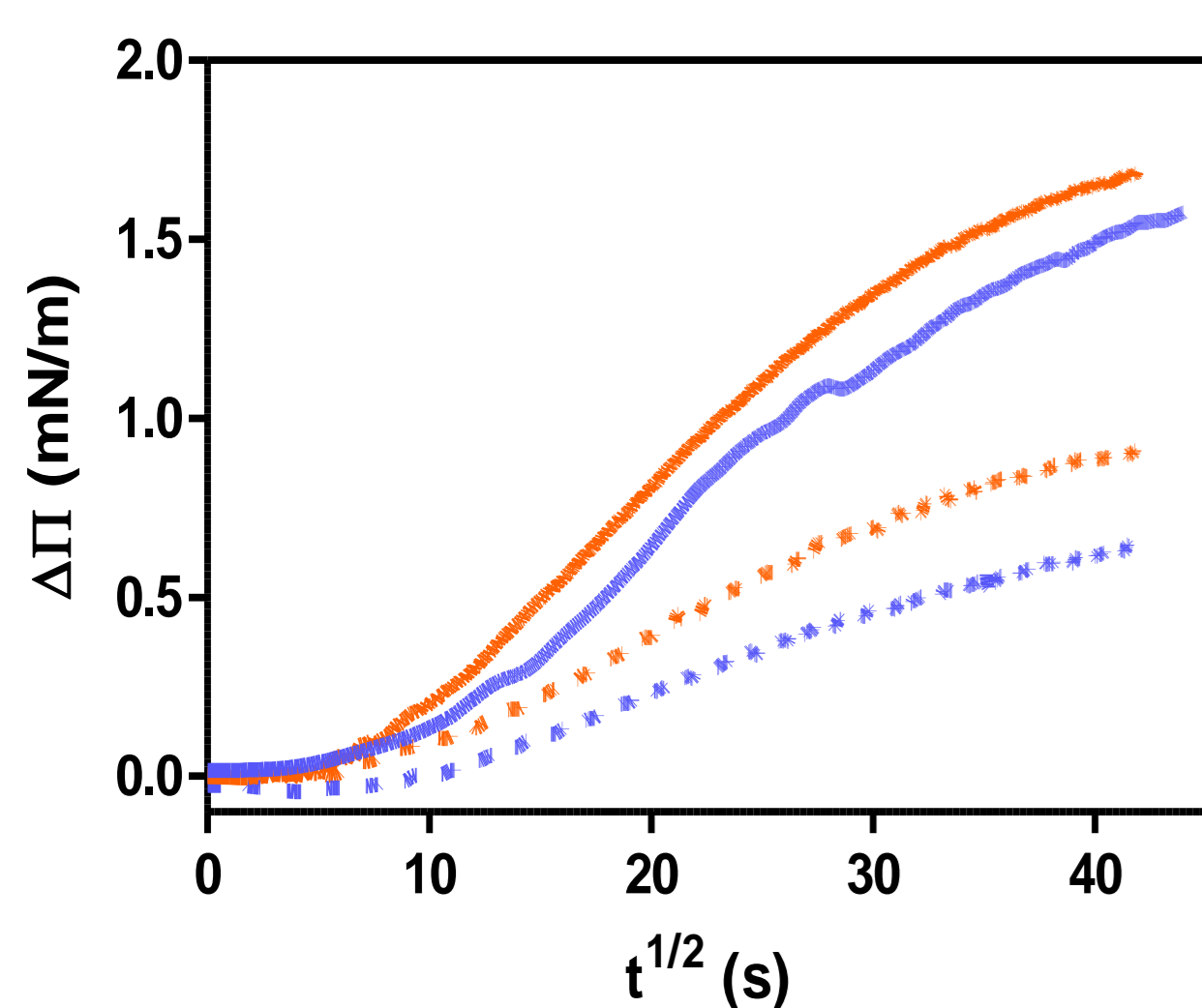
$$\Delta\Pi = C * t^n$$

$$C = 2RTC_b D^{1/2} \pi^{-1/2}$$

n: Coeficiente de relajación.

| Lípido | k x10 ⁻³ (s ⁻¹) | K _d (M ⁻¹) |
|----------------|--|-----------------------------------|
| DMPC | 1.65 ± 0.09 | 480 ± 30 |
| 14:0 diéter PC | 1.22 ± 0.04 | 610 ± 60 |
| DPPC | 1.28 ± 0.06 | 840 ± 90 |
| 16:0 diéter PC | 0.9 ± 0.1 | 1133 ± 70 |

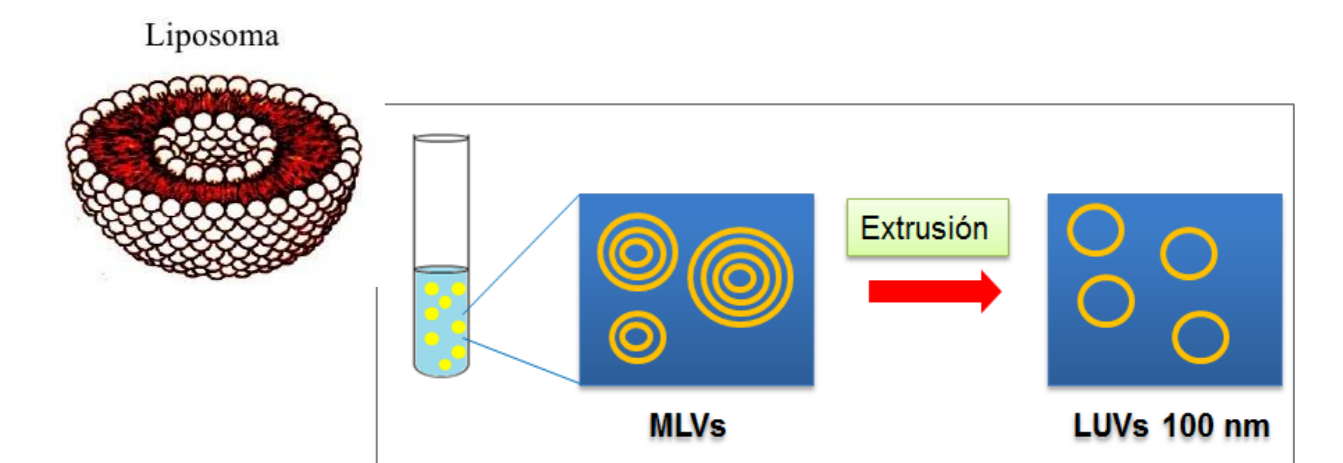
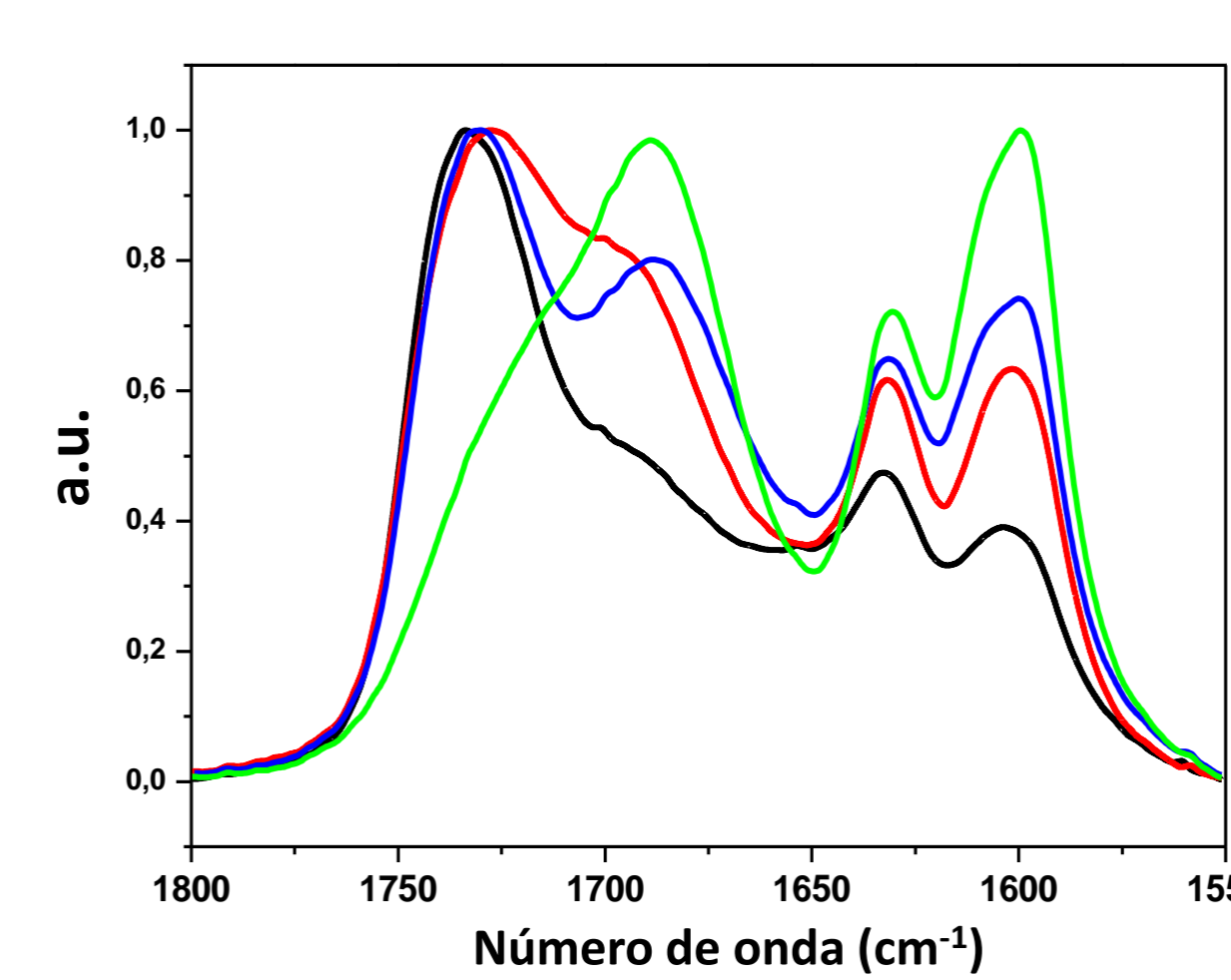
Constante cinética específica (k) y constante de disociación (K_d) para cada composición lipídica.



| Lípido | Π (mN/m) | n |
|-----------|----------|-------------|
| DMPC | 20 | 0.71 ± 0.01 |
| | 30 | 0.58 ± 0.04 |
| 14:0 | 20 | 0.68 ± 0.03 |
| diéter PC | 30 | 0.63 ± 0.03 |

Cambios en la presión superficial en función del tiempo expresado como tiempo^{1/2}, después de la adición de 140 μM CGA a la subfase de monocapas de DMPC (línea naranja) y 14:0 diéter PC (línea azul) a una presión inicial de $\Pi_0 = 20$ mN/m (línea continua) y $\Pi_0 = 30$ mN/m (línea punteada).

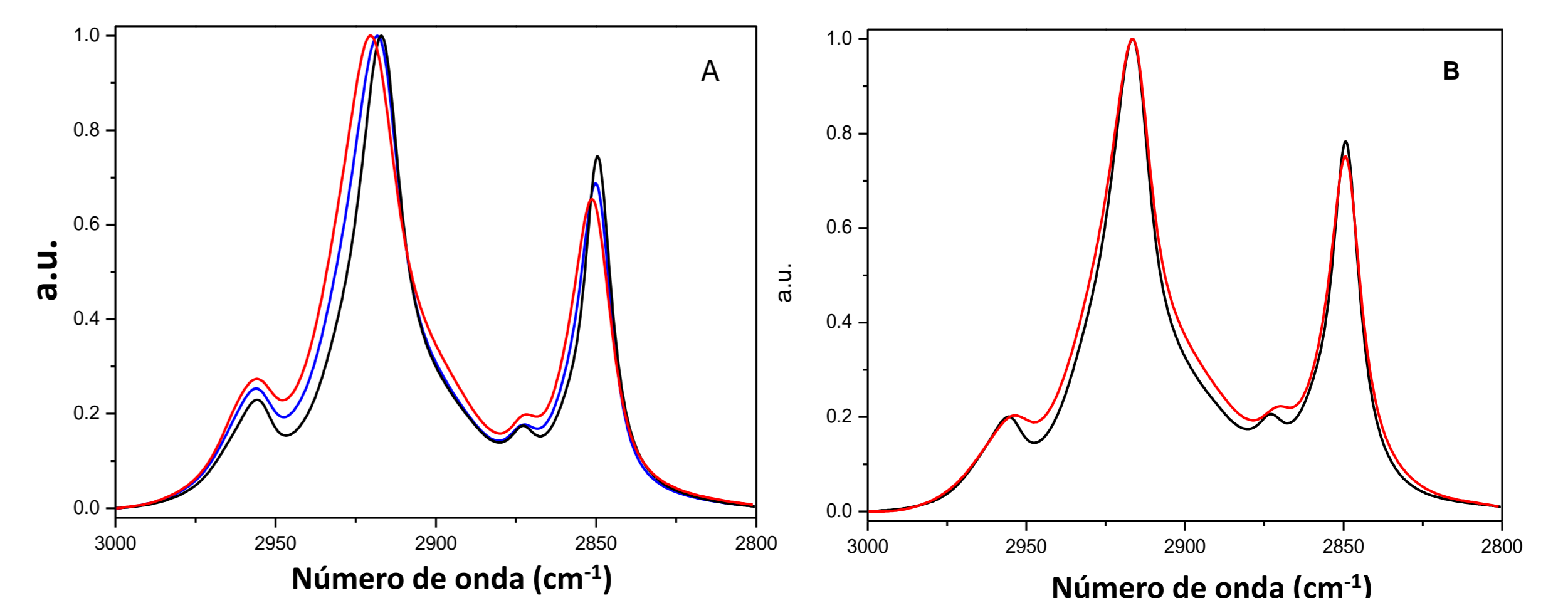
ESPECTROSCOPIA DE REFLECTANCIA TOTAL ATENUADA (ATR)-FTIR



Banda de absorción en la región de grupos carbonilo correspondiente a CGA puro (línea verde); mezcla mecánica de DMPC puro y CGA puro (línea azul); MLVs de DMPC:CGA 2:1 (línea negra) y DMPC:CGA 1:2 (línea roja).

| a _w =1 | v _s PO ₂ ⁻ (cm ⁻¹) | v _a (+) N-(CH ₃) ₃ * (cm ⁻¹) | v _s (+) N-(CH ₃) ₃ * (cm ⁻¹) | R-O-P-O-R* (cm ⁻¹) | P-O* (cm ⁻¹) |
|--------------------------|---|--|--|--------------------------------|--------------------------|
| DMPC | 1086.6 | 970.1 | 925.3 | 1063.8 | 823.0 |
| DMPC:CGA (1:2) | 1082.6 | 970.0 | 925.7 | 1060.6 | 824.0 |
| 14:0 diéter PC | 1085.4 | 970.3 | 925.8 | 1058.7 | 819.9 |
| 14:0 diéter PC:CGA (1:2) | 1081.1 | 970.4 | 925.4 | 1055.0 | 817.1 |

Efecto del CGA sobre grupos PO₂⁻ simétricos, (+) N-(CH₃)₃ simétricos y asimétricos, R-O-P-O-R* y P-O de DMPC y 14:0 diéter PC a a_w=1.



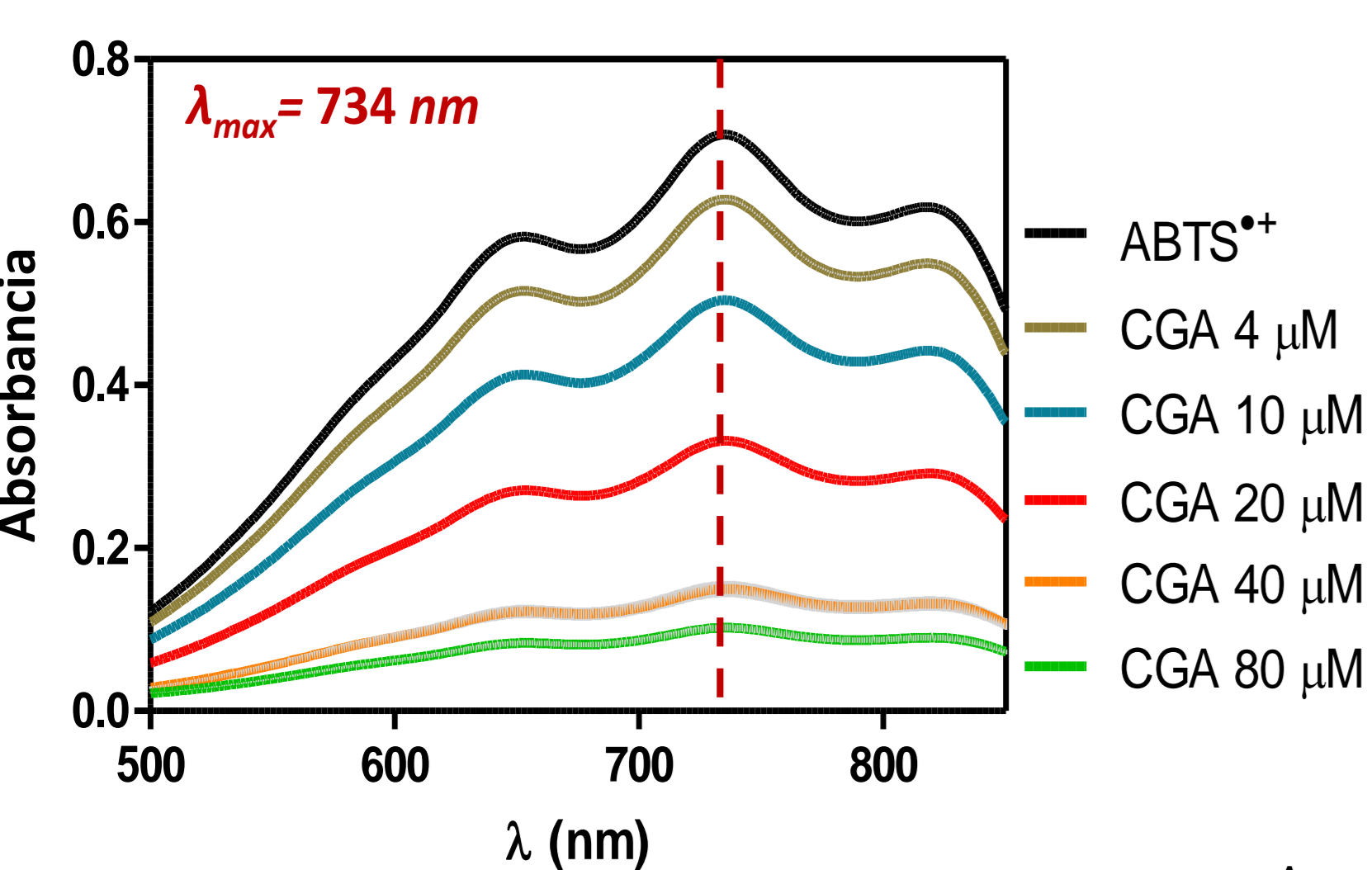
Banda de vibración -CH₂ correspondiente a (A) DMPC puro (línea negra), DMPC:CGA (2:1) (línea azul) y DMPC:CGA (1:2) (línea roja). (B) 14:0 diéter PC (línea negra), 14:0 diéter PC:CGA 1:2 (línea roja). Humedad relativa equilibrada al 100% a 20 °C.

| Actividad de agua (a _w) | 1 | 0.1 |
|---------------------------------------|-----|-----|
| CH ₂ a (cm ⁻¹) | 3.4 | 1.8 |
| CH ₂ s (cm ⁻¹) | 2.7 | 1.2 |

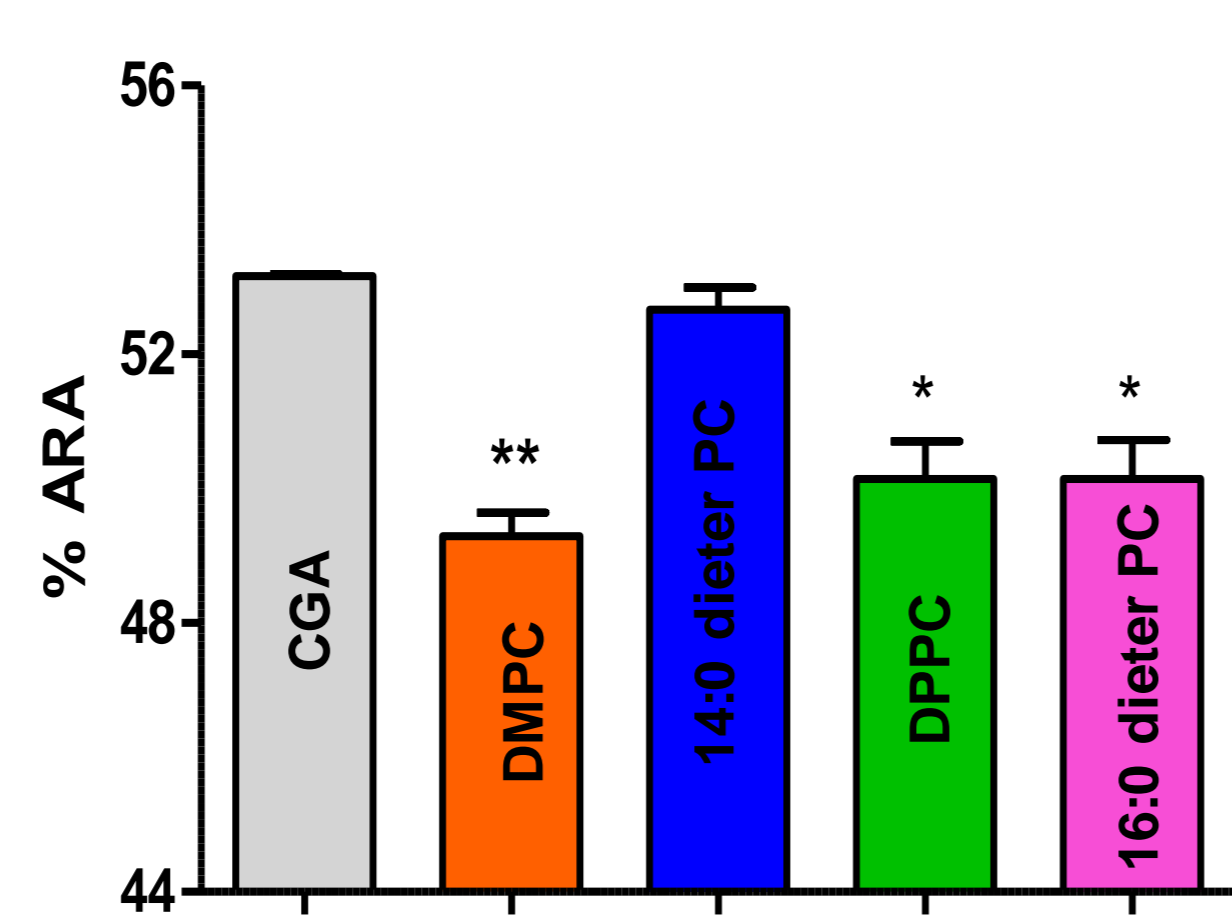
Efecto de CGA sobre los grupos -CH₂ asimétricos y simétricos de DMPC a bajo y alto % de humedad relativa (T = 20 °C).

$$\Delta\nu = \nu_{CH_2}(\text{DMPC:CGA}) - \nu_{CH_2}(\text{DMPC})$$

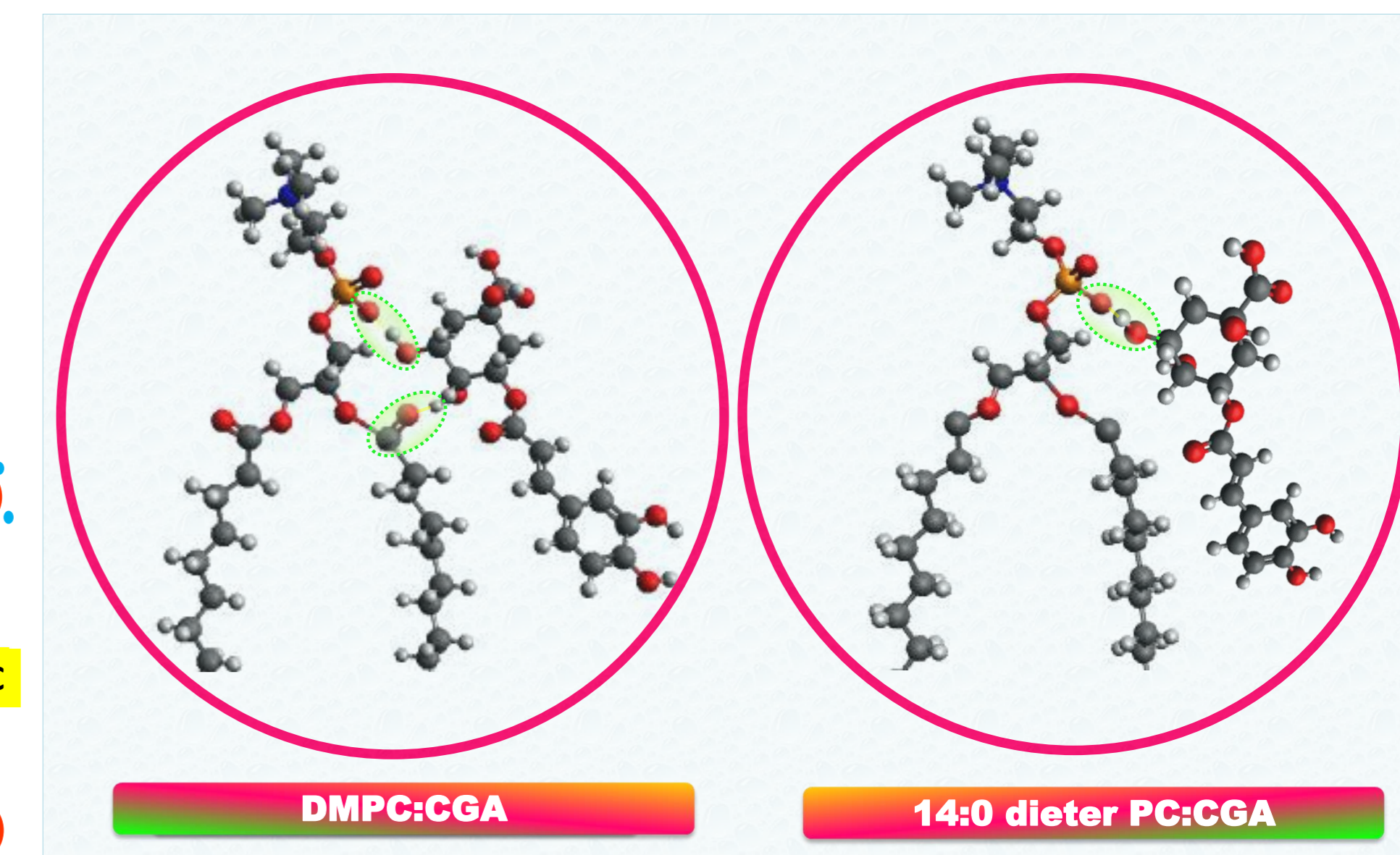
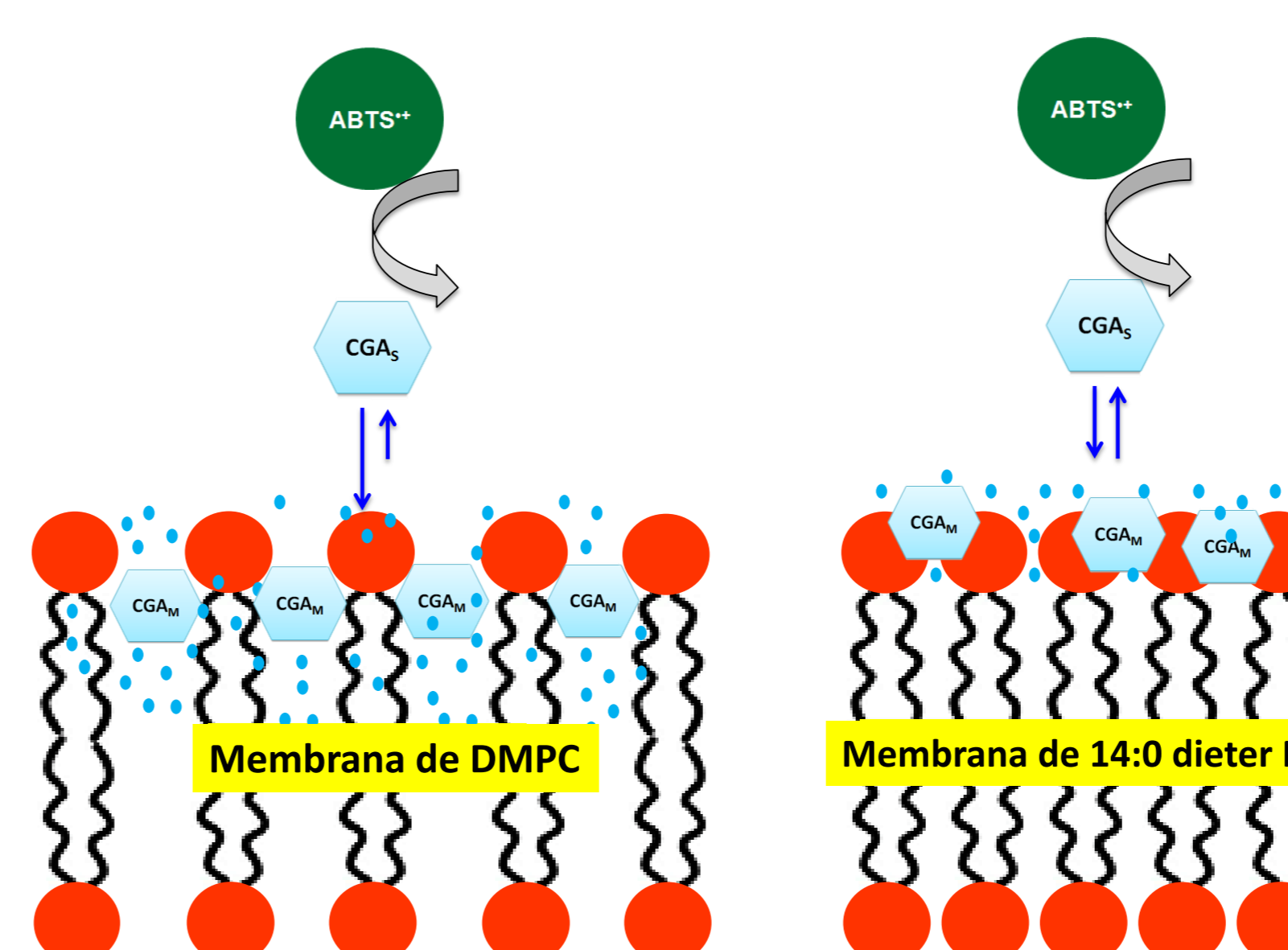
DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIRADICALARIA (ARA)



$$\%ARA = 100 \times \left(1 - \frac{A_{ss}}{A_0}\right)$$



Actividad antirradicalaria (ARA) de CGA 20 μM en diferentes medios. * denota una diferencia significativa de los datos de CGA en ausencia de LUVs (columna gris) (P < 0.05).



CONCLUSIÓN: La afinidad de GGA implica agua en la interfase de la membrana, principalmente alrededor de grupos carbonilo y cadenas acílicas. Esta afinidad afecta a la actividad antiradicalaria. Por lo tanto, la actividad de CGA como un efector antiradicalario puede ser modulada por la presencia de grupos CO en la interfase de membrana. Estos datos pueden tener relevancia en relación a la acción del CGA en membranas de célula sometidas a diferentes estreses en los que los niveles de agua pueden variar por condiciones externas (salinidad, temperatura entre otras).