

Corrales, F.¹, Cozzitorti, M.E.L.⁶, Díaz, S.B.², Zampini, C.³, Isla, M.I.³, Gervasi, C.A.⁴ y Alvarez, P.E.^{1,5}

¹Inst. de Física. Fac. de Bioqca., Qca. y Farm., UNT, Ayacucho 471, Tucumán.

²Inst. de Química Física. Fac. de Bioqca., Qca. y Farm., UNT, Ayacucho 471, Tucumán.

³Fac. de Cs. Naturales e IML, UNT, San Lorenzo 1469. Inst. de Bioprospección y Fisiología Vegetal (CONICET-UNT).

⁴INIFTA-CONICET y Fac. de Cs. Ex. UNLP. Fac. de Ingeniería, UNLP, 1 y 47 La Plata.

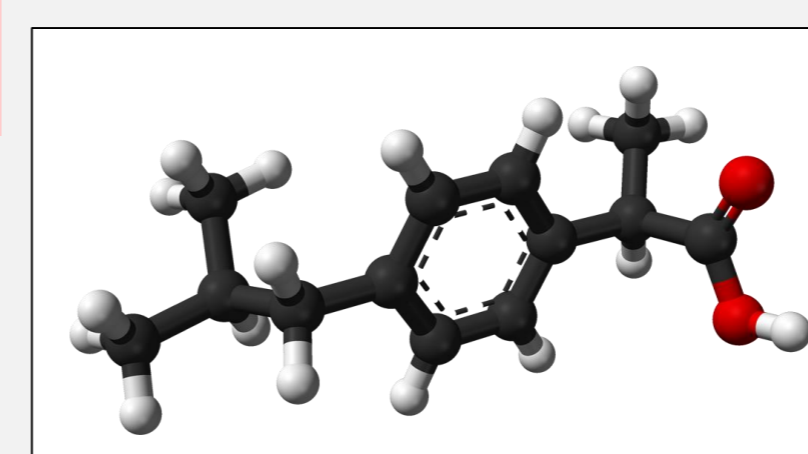
⁵INQUINOA-CONICET.UNT.

⁶Depto de Ing. de Proc. y Gestión Ind. FACET. UNT. Av Independencia 1800. Tucumán.

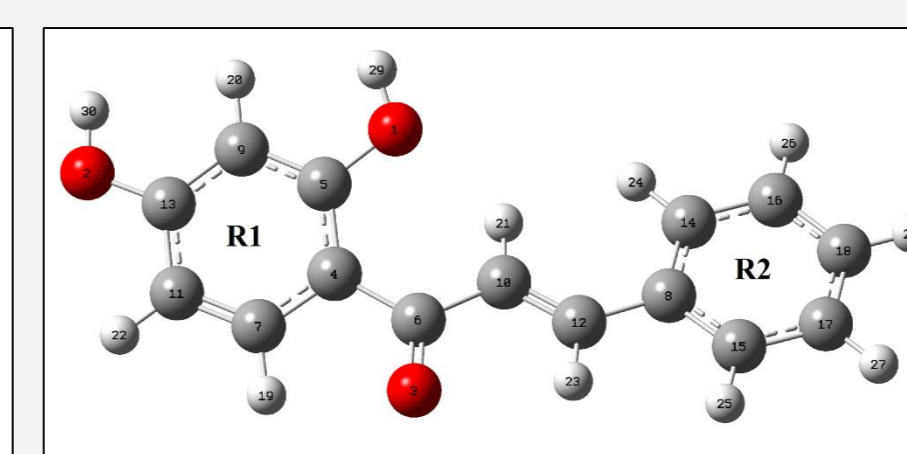
e-mail: fer.corralesch@gmail.com; palvarez@fbqf.unt.edu.ar

Introducción

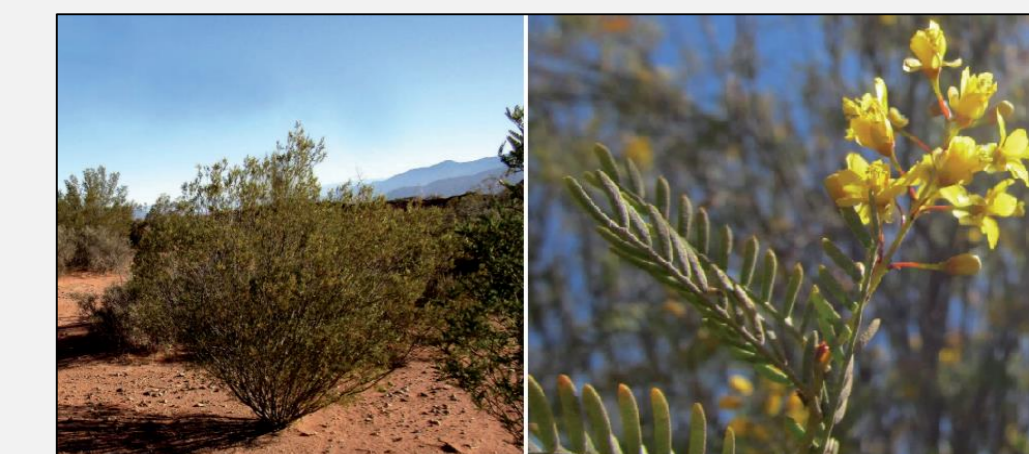
2',4'-dihidroxicalcona (DHC) es un compuesto bioactivo presente en el extracto etanólico de *Zuccagnia punctata*, con actividad anti-inflamatoria, antimicrobiana y antioxidante¹. El ibuprofeno (Ibu) es un fármaco no esteroide, de origen sintético, con actividad antiinflamatoria, antifebril y analgésica de uso generalizado.



Ibuprofeno
(ácido (RS)-2-(4-isobutilfenil)propanoico)



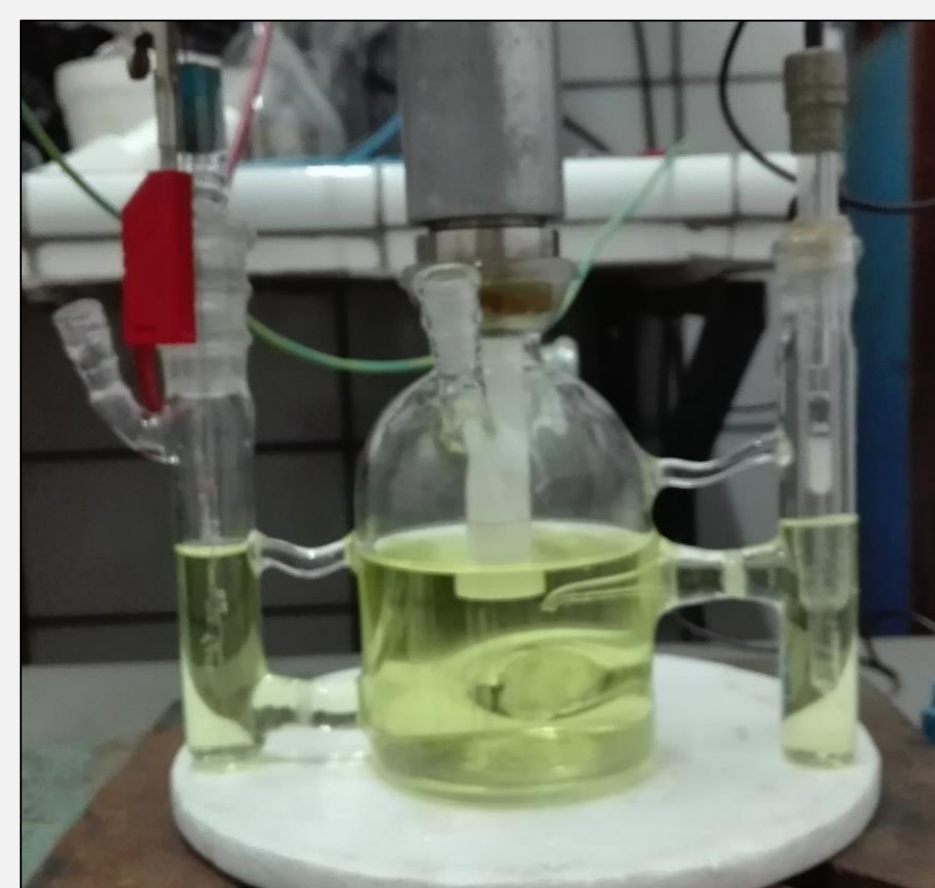
2',4'-dihidroxicalcona



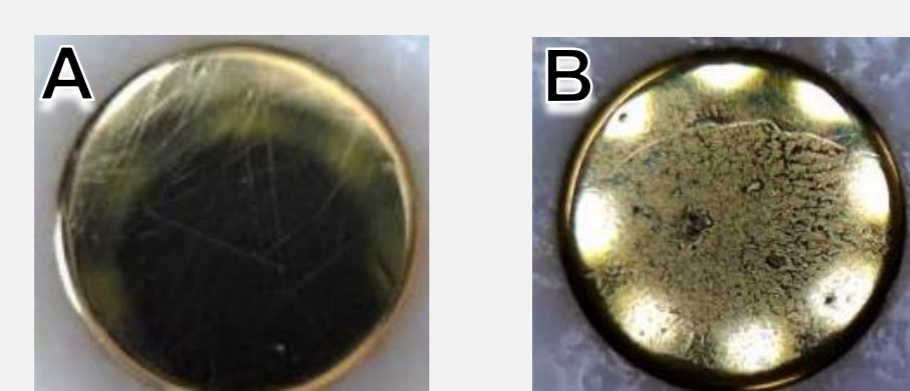
Fotografía: Flores y hojas de *Zuccagnia punctata*

Materiales y Métodos

- Se utilizaron técnicas electroquímicas: Voltamperometría Cíclica (VC) y Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS)², para esclarecer la naturaleza de la interacción entre DHC e Ibu y un sistema de membranas lipídicas soportadas en superficies planas de Au.
- Se empleó una celda convencional de tres electrodos, en donde el Electrodo de trabajo es una superficie de Au modificada con membrana de DMPC (Dimiristoilfosfatidilcolina) y (DMPC+DHC) y Soluciones electrolíticas: buffer TRIS+cupla ferro/ferri y buffer TRIS+cupla ferro/ferri+(Ibu a = 4 mM) ó + (Ibu b = 8 mM) a pH=7,4.
- Se realizaron ajustes paramétricos de la impedancia teórica de un circuito equivalente a los datos experimentales de impedancia usando el método de cuadrados mínimos no lineales y complejos.
- Se efectuaron medidas UV-Vis de vesículas lipídicas de DMPC dopadas con DHC. El espectro obtenido fue analizado comparativamente con el correspondiente a DHC pura.



Fotografía: Celda convencional de 3 electrodos conectada a equipo Zhaner



Fotografías: A. electrodo de Au pulido y B. Modificado con membrana lipídica. Microscopio USB digital Opti-Tekscope (200X - Resol. 1600x1200).

Resultados y Discusión

Voltamperometrías Cíclicas (VC)

- Se aplicó barrido de potencial triangular simple.
- Es,c = - 600 mV hasta Es,a = 800 mV. Velocidad de barrido de 50 mV/s.

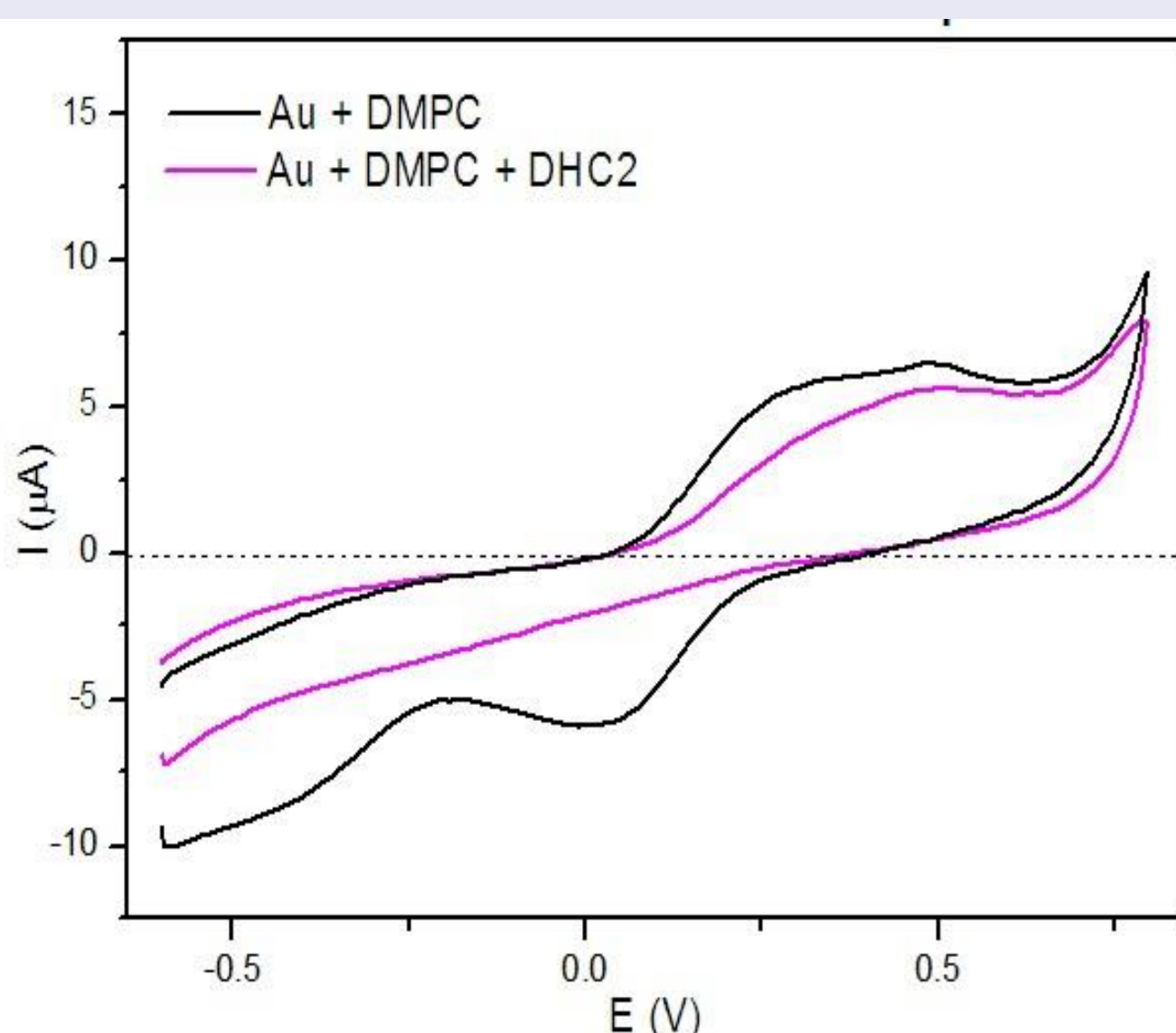


Figura 1: Comparación de VC de Electrodo de Au/membrana de DMPC y Au/membrana de DMP dopada con DHC2, en buffer Tris 10mM + KCl 0,1M + cupla Ferro/Ferri, pH=7,4.

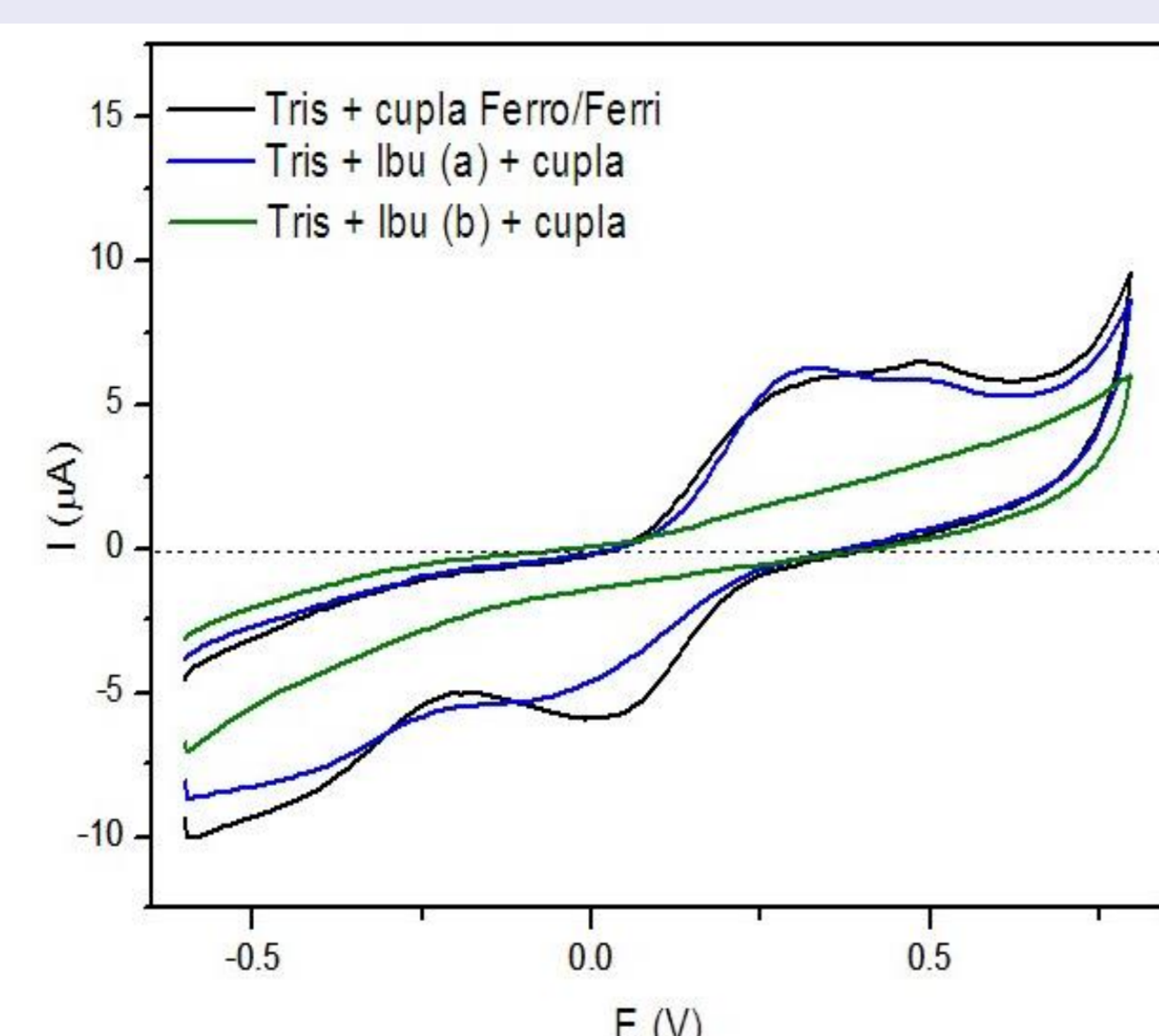
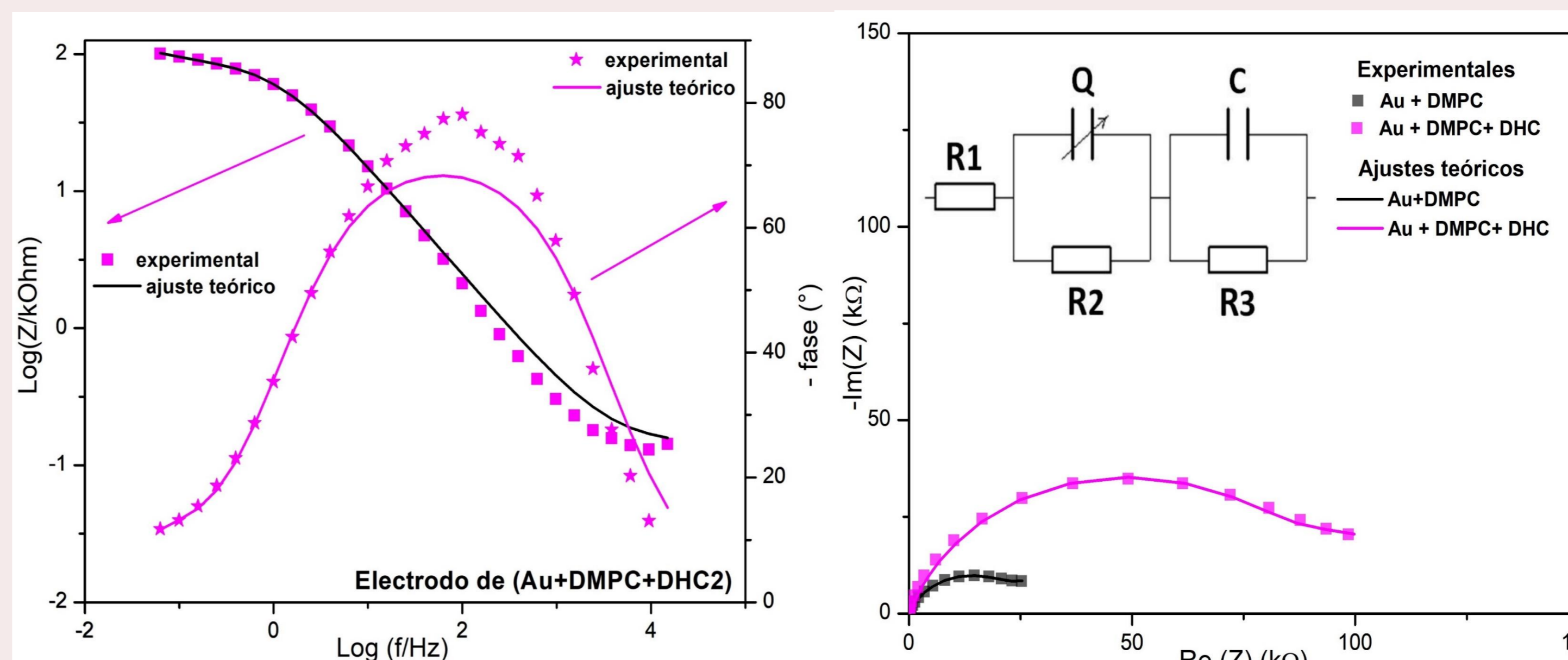


Figura 2: Comparación de VC de Electrodo de Au/membrana de DMPC en buffer Tris 10mM + KCl 0,1M + cupla Ferro/Ferri (negro), + Ibu a = 4 mM (azul) y + Ibu b = 8 mM (verde), a pH=7,4.

Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS)

Potencial alterno en el tiempo. Amplitud: 10 mV. Rango de frecuencias: 15 KHz a 10 mHz.



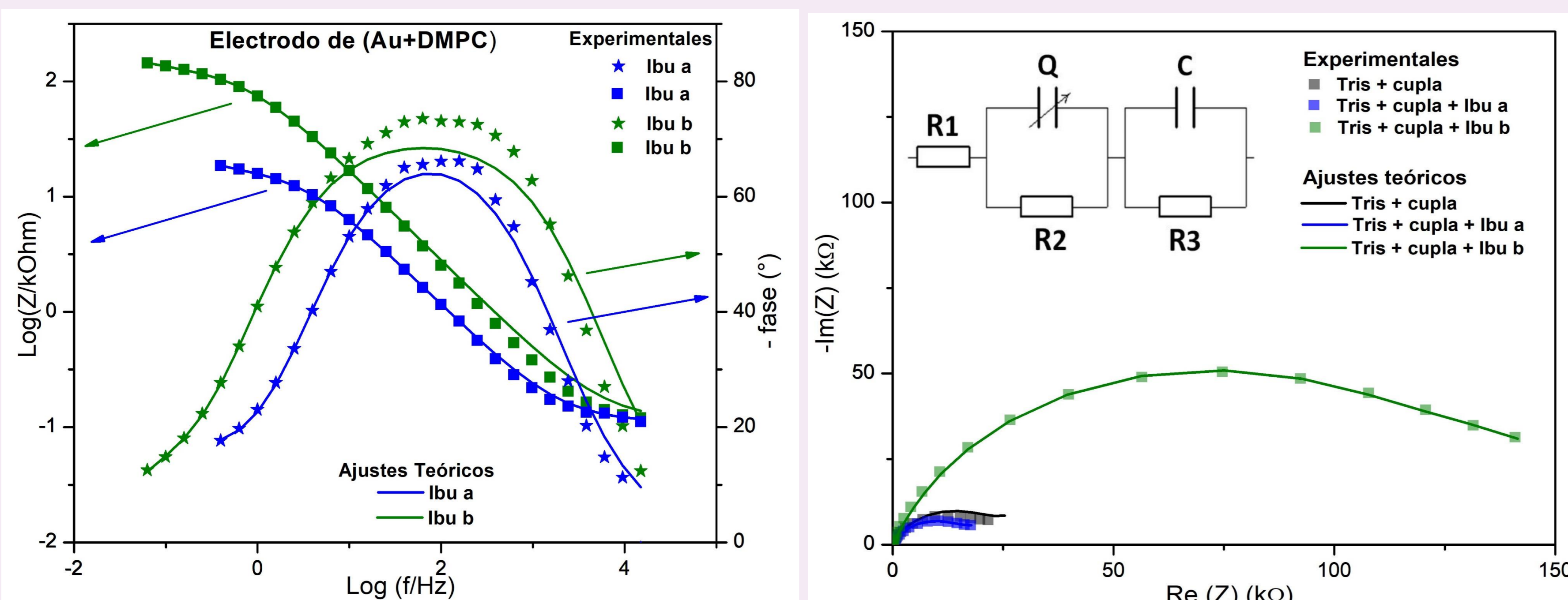
Figuras 3: Diagramas de Bode y de Nyquist, Electrodo de Au + membrana de DMPC + DHC, en buffer tris 10mM + KCl 0,1M + cupla Ferro/Ferri, pH=7,4. Se muestra circuito equivalente usado en el ajuste.

Elementos del circuito equivalente
R₁: resistencia del electrolito
Q (CPE): capacidad extendida del espacio iónico entre la superficie de Au y la membrana
R₂: resistencia de (monocapa autoensamblada + solución electrolítica)
C: capacidad de membrana lipídica
R₃: resistencia de la membrana lipídica

Tris+ cupla	Au+ DMPC	Au+ DMPC+DHC
R ₁ / Ω	1,30.10 ²	1,40.10 ²
Q / F s ⁿ⁻¹	5,09.10 ⁻⁶	2,28.10 ⁻⁶
n	0,80	0,80
R ₂ / Ω	2,50.10 ⁴	9,31.10 ⁴
C / F	1,11.10 ⁻⁴	1,23.10 ⁻⁴
R ₃ / Ω	1,21.10 ⁴	2,49.10 ⁴
A _p / A _e	6,86.10 ⁻¹⁰	3,34.10 ⁻¹⁰

Tabla 1: Electrodo de Au/DMPC y Electrodo de Au/(DMPC+DHC). Valores óptimos de los parámetros del ajuste de los datos utilizando el método de cuadrados mínimos no lineales y complejos.

Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS)



Figuras 4: Diagramas de Bode y de Nyquist, Electrodo de Au + membrana de DMPC, en buffer Tris 10mM + KCl 0,1M + cupla Ferro/Ferri + Ibu a = 4 mM (azul) y + Ibu b = 8 mM (verde), pH=7,4. Se muestra circuito equivalente usado en el ajuste.

Au+ DMPC	Tris+cupla	Tris+cupla +Ibu a	Tris+cupla +Ibu b
R ₁ / Ω	1,30.10 ²	1,10.10 ²	1,13.10 ²
Q / F s ⁿ⁻¹	5,09.10 ⁻⁶	5,04.10 ⁻⁶	2,15.10 ⁻⁶
n	0,80	0,80	0,79
R ₂ / Ω	2,50.10 ⁴	1,77.10 ⁴	1,35.10 ⁵
C / F	1,11.10 ⁻⁴	1,11.10 ⁻⁴	8,72.10 ⁻⁵
R ₃ / Ω	1,21.10 ⁴	7,97.10 ³	2,99.10 ⁴
A _p / A _e	6,86.10 ⁻¹⁰	1,05.10 ⁻⁰⁹	2,79.10 ⁻¹⁰

Tabla 2: Electrodo de Au/DMPC en soluciones: Tris+cupla, Tris+cupla+Ibu a y Tris+cupla+Ibu b. Valores óptimos del ajuste paramétrico utilizando el método de cuadrados mínimos no lineales y complejos. La fracción de poros A_p/A_e (área de poros respecto área del electrodo) es indicativo del número de defectos de la membrana.

Espectros UV-Visible

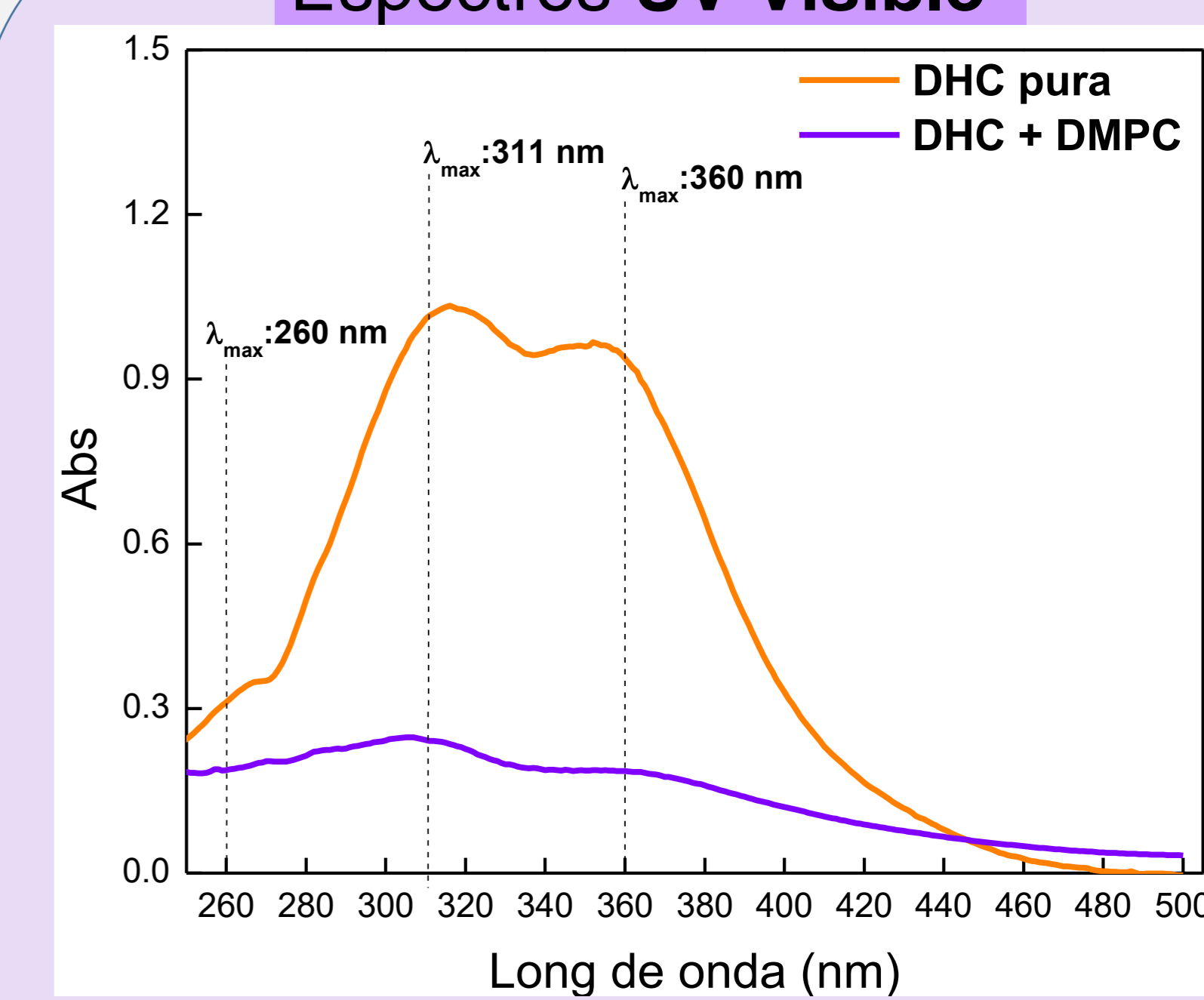


Figura 5: Espectros UV-Vis de la suspensión de vesículas de (DMPC + DHC) y DHC pura. Barrido de 200 – 500 nm, resolución 1nm.

Conclusiones

- EIS:** se detecta una disminución del 51 % en el número de defectos de la membrana de DMPC soportada, cuando está dopada con DHC, respecto de la membrana DMPC sin dopar (Figuras 3 y Tabla 1). Mientras que, en la membrana de DMPC soportada, en presencia de las dos soluciones de Ibuprofeno, se observa un aumento del 53 % del número de defectos con Ibu a, mientras que con Ibu b hay una disminución del 56% (Figuras 4 y Tabla 2) respecto al número de defectos de la membrana en solución de buffer Tris + cupla Ferro/Ferri. Esto indicaría que tanto DHC como Ibu b, ejercerían un efecto protector en la membrana, reduciendo el número de defectos en la misma.
- VC:** La presencia de DHC en la membrana soportada produce una leve disminución y corrimiento del pico de oxidación hacia valores más positivos de potencial y desaparición del pico de reducción (Fig. 1). Las VC de la Figura 2, muestran una notable desaparición de los picos de oxidación y reducción para la concentración de Ibu b. Esto podría atribuirse a la formación de una barrera más efectiva para la transferencia electrónica y coincidiría con el efecto de disminución en la fracción de poros (A_p/A_e) determinada con los parámetros óptimos de los ajustes de las EIS para estos dos casos.
- Del análisis de las bandas obtenidas en el espectro experimental UV-Vis (λ_{máx} 260, 311 y 360 nm), no se observaron diferencias significativas en los máximos de absorción de las vesículas dopadas con DHC con respecto a los valores de los tres máximos obtenidos del espectro de DHC pura.

Referencia bibliográfica

- Moreno, A., Nuño, G., Cuello, S., Sayago, J. E., Alberto, M. R., Zampini, C. and Isla, M. I., *Natural Product Communications*, **2015**, 10 6, 991-994.
- Diamanti, E., Gregurec, D., Rodriguez-Presa, M. J., Gervasi, C. A., Azzaroni, O. and Moya, S. E., *Langmuir*, **2016**, 32, 6263-6271.