

ESTUDIOS DE LA INTERACCION DE COMPUESTOS FENÓLICOS GABAÉRGICOS CON MEMBRANAS A TRAVÉS DE ¹H-RMN.

Gabriela N. Reiner¹, Leonardo Fernandes Fraceto², Eneida de Paula³ y Daniel A. García¹,

¹Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIBYT-CONICET-Universidad Nacional de Córdoba), Av. Vélez Sarsfield 1611, Córdoba (5016), Argentina.

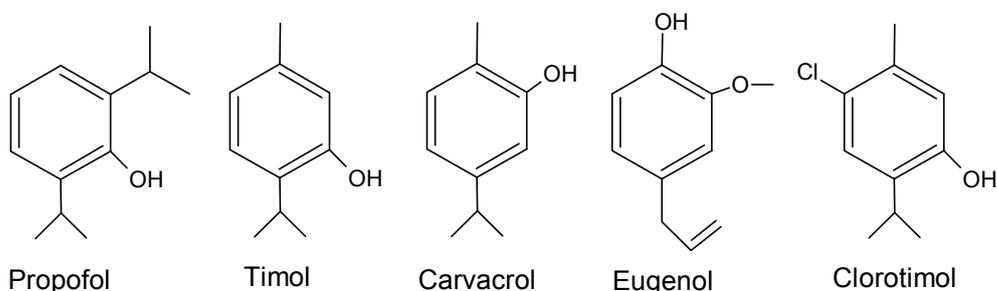
²Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Sorocaba, SP, Brasil. ³Departamento de Bioquímica, Instituto de Biología, Universidad Estadual de Campinas, SP, Brasil. E-mail: dagarcia@efn.uncor.edu

Introducción

Los principales mecanismos moleculares involucrados en la actividad estimuladora e inhibitoria del Sistema Nervioso Central incluyen la neurotransmisión GABAérgica, glutamatérgica y colinérgica, siendo el receptor GABA_A el principal receptor inhibitorio de dicho sistema [1,2]. Nuestro grupo ha descrito que varios compuestos fenólicos derivados del propofol, un conocido agente gabaérgico, poseen efectos positivos sobre el receptor GABA_A [3-6]. Por otra parte, demostramos que estos compuestos son altamente lipofílicos con capacidad para interactuar con membranas modificando sus propiedades [7-9]. De esta manera, teniendo en cuenta que el receptor GABA_A está inserto en una estructura supramolecular altamente dinámica como la membrana, es posible sugerir que en los efectos farmacológicos demostrados para este tipo de compuestos podrían subyacer fenómenos inespecíficos como disparadores de la modulación de la organización molecular, la cual, en última instancia, podría ser la responsable al menos en parte de la modulación del receptor. Por esta razón, en el presente trabajo se analiza por ¹H-RMN la interacción entre algunos compuestos fenólicos, con probada actividad farmacológica, con modelos de membrana.

Metodología

Los compuestos fenólicos incluidos en este trabajo fueron: eugenol, timol, propofol, carvacrol y clorotimol. Propofol es un compuesto de síntesis, clorotimol es un monoterpenoide derivado de timol. Timol y carvacrol son extraídos de aceites esenciales de numerosas especies de tomillo (género *Thymus*) y de orégano (gen. *Origanum*) respectivamente, mientras eugenol se encuentra en numerosas especies como la albahaca y el clavo de olor (gen. *Ocimum* y *Syzygium*) [10,11].



Fueron colectados espectros 1D de ¹H-RMN (500 MHz) de cada compuesto, de vesículas unilamelares de fosfatidilcolina de huevo (EPC) y de muestras conteniendo el compuesto más vesículas de EPC. Previamente, fueron determinados además los

coeficientes de partición EPC/agua de cada compuesto para seleccionar la relación molar a usar en los experimentos de ^1H -RMN.

A partir de estos espectros, se realizó la asignación de picos para los átomos de hidrógeno tanto de EPC como de cada compuesto, de acuerdo con los datos de la literatura [12-14]. A partir de los valores de desplazamientos químicos (CS) de los hidrógenos de los compuestos, determinados en agua o en presencia de EPC, se calculó el cambio de desplazamiento químico (ΔCS), siendo realizado además este procedimiento para los hidrógenos de EPC.

También fueron determinadas las variaciones en los tiempos de relajación longitudinal (T_1) de los átomos de hidrógeno como medida de la interacción de los compuestos con las vesículas de EPC [12,13].

Resultados

Las alteraciones en los corrimientos químicos de los hidrógenos ($\Delta\text{CS}\neq 0$) indicarían variaciones en el ambiente químico de los núcleos, considerándose como más significativas alteraciones mayores a 0.05 ppm [13]. El análisis de los datos mostró que los hidrógenos de los compuestos, en general, presentan variaciones significativas en los valores de CS cuando están en presencia de vesículas fosfolipídicas, indicando que interactúan con las mismas. A partir de los valores de T_1 es posible determinar el grado de movilidad de las distintas partes del compuesto cuando interactúan con los componentes de la membrana y viceversa. Los resultados mostraron una disminución en los T_1 de la mayoría de los hidrógenos de los compuestos fenólicos lo que revela su interacción (inmovilización de la molécula entera) con la bicapa lipídica.

Por otro lado, también fueron detectados cambios en CS y T_1 de los hidrógenos de la molécula de EPC en presencia de los diferentes fenoles. El efecto de corto alcance de corriente del anillo, causado por el anillo aromático de los fenoles, afectaría el ambiente electrónico de los hidrógenos de EPC modificando los CS, lo cual aporta información directa sobre la localización preferencial de los compuestos dentro de la membrana [13]. Así, los datos reflejan que todos los fenoles se ubicarían entre el glicerol y la molécula de colina, ocupando clorotimol y propofol posiciones más profundas en esta misma región. Del mismo modo, los cambios encontrados en T_1 para EPC nos indicarían que existen variaciones en la dinámica molecular de la membrana (menos movilidad) en presencia de estos compuestos, principalmente en la zona de las cadenas hidrocarbonadas y glicerol.

Conclusiones

Los resultados descriptos indican que todos los compuestos se insertan en las vesículas fosfolipídicas de EPC, ubicándose preferentemente en la zona de las cabezas polares (colina) y el glicerol, ocupando los compuestos más lipofílicos (propofol y clorotimol) posiciones más profundas en esta región. Esta localización de los fenoles induciría la reducción de la repulsión entre cabezas polares permitiendo un mayor acercamiento intermolecular y disminuyendo finalmente el grado de movilidad de las cadenas hidrocarbonadas. Este resultado concuerda con lo descripto recientemente por nuestro grupo, utilizando capas monomoleculares fosfolipídicas y epifluorescencia [8].

Referencias

1. Mac Donald and Olsen (1994). *Biochem Pharmacol.* 68,1675
2. Rudolph and Mohler (2004). *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 44, 475.
3. Sánchez et al. (2004). *Coll Surf B.* 34, 77
4. García et al. (2006). *Neuropharmacol.* 50, 25
5. García et al. (2008). *Eur J Pharm.* 600, 26
6. Reiner et al. (2010) XXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias.

7. Reiner et al. (2009) J Pharm Biomed Anal 49, 686.
 8. Reiner et al. (2009) XVII Jornadas Científicas de la Soc. de Biología de Córdoba
 9. Sánchez-Borzzone et al. (2011) XL Reunión Anual de la Soc. Arg. de Biofísica.
 10. Brand-Williams et al. (1995) Food Sci Technol. 28, 25.
 11. Ruch et al. (1989) Carcinogenesis. 10, 1003.
 12. Fraceto et al. (2002) Biophys Chem 99, 229.
 13. Fraceto et al. (2005) Biophys Chem 115, 11.
 14. Locci E, et al. (2004). Chemistry and Biodiversity. 1, 1354.
- Este trabajo fue financiado por SECyT-UNC, FONCyT, CONICET, MINCyT-Arg, CAPES-Brasil, FAPESP y Fundunesp.*