

Estudio de la nanoencapsulación molecular del ácido Ruménico con diferentes tipos de ciclodextrinas.

A. Matencio, C. J. García Hernández-Gil, F. García-Carmona y J. M. López-Nicolás

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A, Facultad de Biología, Campus de Espinardo. 30100 Espinardo (Murcia). adrian.matencio@um.es

INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos hoy día están siendo altamente investigados por sus capacidades bioactivas. Uno de ellos es el ácido ruménico (RA, Fig 1A inserto), un ácido linoléico conjugado (CLA) encontrado en rumiantes y en productos de uso diario derivados de la biohidrogenación del ácido vacénico. Además, RA es el isómero del CLA con mayor proporción (85-90%) [1]. RA presenta propiedades anticancerígenas, quimiopreventivas, antiinflamatorio [1] y tiene un potencial efecto en las enfermedades derivadas de respuesta Th₁ [1]. Además, entre otros un estudio en humanos, ha demostrado que RA disminuye los biomarcadores asociados a sobrepeso y obesidad [1].

No obstante, su baja solubilidad e inestabilidad hace que la mayoría de estudios sean *in vitro* y agencias como la Agencia europea de seguridad alimentaria (EFSA) den informes negativos [2]. Por ello, es necesario un estudio que aborde este tema y además, profundice en protegerle de la oxidación. La encapsulación molecular con ciclodextrinas (CDs), es altamente recomendable para este propósito.

Las CDs son oligosacáridos cíclicos no reductores de glucosa unidos por enlace $\alpha(1\rightarrow4)$. Las más comunes son la α , β , y γ -CD que contienen 6, 7 y 8 unidades de glucosa respectivamente, pudiendo modificarse. Debido a las versátiles propiedades de las ciclodextrinas son usadas ampliamente por diversas industrias con los siguientes propósitos [3] como solubilización, estabilización, enmascaramiento de sabores, liberación controlada, etc.

Pocos artículos han tratado los efectos de CDs frente a RA [4,5]. Pero, en ninguno se obtienen sus constantes de encapsulación (K_F), esenciales para el correcto uso del agente encapsulante. Por ello, hemos tratado por primera vez el comportamiento de agregación de RA en solución acuosa y su comportamiento con distintas CDs naturales (α -CD y β -CD) y modificadas (Hidroxipropil- β -CD y Metil- β -CD) bajo distintas condiciones de pH y temperatura. Para finalizar, se predijeron las interacciones moleculares del complejo mediante docking molecular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales:

Todas las CDs empleadas y RA fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (Madrid, España). DPHT de Fluka (Madrid, España) y el Tetrahidrofurano a Merck (Darmstadt, Alemania).

Métodos:

Medida de la fluorescencia, determinación del modelo de interacción y cálculo de las constantes de complejación.

Los valores de concentración micelar crítica (c.m.c.) obtenidos para el RA fueron determinados mediante espectroscopia de fluorescencia [6]. Distintas concentraciones de ácido graso fueron preparadas para calcular dichos valores de c.m.c. Cada Muestra

contenía 0,88 μM de DPHT (disuelto en THF) tampón 0,1M y las correspondientes cantidades de CDs y RA. Las muestras se incubaron 60 min en oscuridad antes de medir.

Las medidas de fluorescencia, fueron realizadas con un espectrofotómetro de fluorescencia Kontron SFM-25 (λ_{ex} 358 & λ_{em} 430). La c.m.c se encuentra en la intersección entre las líneas que definen el comportamiento de fluorescencia en las regiones pre- y post-micelares en la gráfica fluorescencia vs [RA].

Para estudiar la estequiometría entre RA y CD se establecieron dos modelos opcionales de encapsulación. En el primero de ellos la complejación de RA por CD puede seguir una posible estequiometría 1:1 donde una molécula de CD interacciona con una molécula de RA siguiendo el siguiente equilibrio.

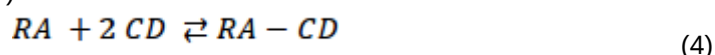


$$K_F = \frac{[RA-CD]}{[CD][RA]} \quad (2)$$

Haciendo una serie de transformaciones matemáticas [8] se llega a

$$[c.m.c.*]_t = [c.m.c._0] + K_F[c.m.c._0][CD] \quad (3)$$

Donde c.m.c.* es la observada y c.m.c.₀ es su valor sin CD. La representación lineal de (3), [c.m.c.*] vs [CD], nos dará un coeficiente de regresión. Valores próximos a 1 justificarían este modelo. Partiendo del mismo razonamiento, podemos determinar un complejo 2:1 (dos CDs por RA):



$$K_{F12} = \frac{[RA-CD]}{[CD]^2[RA]} \quad (5)$$

Haciendo una serie de transformaciones matemáticas, se llega a

$$[c.m.c.*]_t = [c.m.c._0] + K_{F12}[c.m.c._0][CD]^2 \quad (6)$$

La representación lineal de (6), [c.m.c.*] vs $[CD]^2$, nos dará un coeficiente de regresión. Valores próximos a 1 justificarían este modelo.

Modelado molecular.

La estructura de α CD y β CD fueron obtenidas de estructuras cristalizadas del Protein data bank (PDB) códigos 3EDD y 1ZON respectivamente. Metil e Hidroxietil beta ciclodextrina fueron creadas usando Avogadro [7] añadiendo los radicales metilo e hidroxipropilo y RA se obtuvo de CACTUS database (NCI/CADD group, USA). Docking fue realizado con Autodock Vina [8]; todos los receptores fueron considerados como rígidos. La representación gráfica se realizó con PyMOL (Molecular Graphics System, versión 1.3, Schrödinger, LLC). La simulación del pK_a se realizó manualmente con Avogadro.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medida de c.m.c. de RA, estudio del equilibrio monómero/agregado y efecto de la adición de ciclodextrinas sobre este comportamiento.

Es esencial el estudio de las propiedades físico-químicas de un nuevo ingrediente para optimizar su administración, estabilidad, etc. Hasta la fecha, la c.m.c. de RA no se ha estudiado. Fig. 1A muestra los valores obtenidos a pH 8 y 25°C con una c.m.c de 35 μM . Por debajo de ese valor RA se encuentra en estado monomérico, y por encima se encuentra agregado. Además, estos valores podrían correlacionarse con los resultados *in vitro* ayudando a las distintas agencias, como EFSA, en sus conclusiones. Un

comportamiento similar se encontró en otros ácidos grasos como el linoléico, araquidónico o linolénico [6,9], permitiendo observar que la c.m.c. depende de la concentración de ácido graso.

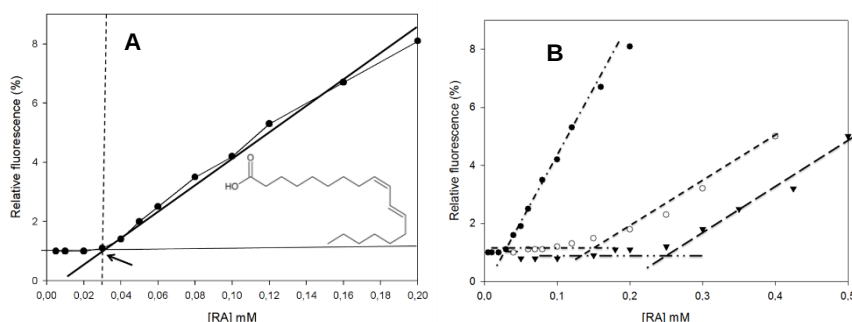


Fig 1. (A) Medida de la concentración micelar crítica de RA. Condiciones experimentales: pH 8 y temperatura 25°C. Inserto, estructura de RA. (B) Dependencia de la fluorescencia relativa de RA con diferentes concentraciones de HPβCD: 0mM (●), 0.4mM (○) y 1 mM (▲). Condiciones: pH 8 a 25°C.

Las propiedades de los ácidos grasos en disolución van a verse afectadas por las concentración de CDs. Conforme aumentamos la concentración de HPβCD en el medio, la c.m.c. aumenta (Fig 1B), permitiendo más cantidad de RA soluble al ser encapsulado.

Estudio de la constante de encapsulación (K_F) en presencia de distintas CDs y estudio del modelo de encapsulación.

Una vez determinadas las c.m.c de RA a diferentes concentraciones y con diferentes CDs, sus valores fueron representados y se procedió al ajuste de los valores mediante regresión lineal según las ecuaciones 3 y 6. De esta forma se puede calcular tanto la estequiometría de la encapsulación como las constantes del complejo CDs/RA y su constante. Todos los complejos fueron 1:1, (tabla 1, ver diferencias entre R^2) dando mejor resultado HPβCD con una constante de 8347 $\pm$ 417.35 M⁻¹. a pH 8 y 25 °C. Por ello, HPβCD fue seleccionada como modelo para seguir nuestro estudio.

Efecto de la variación de pH y temperatura sobre la formación del complejo de inclusión.

Es sobradamente conocida la influencia de las distintas variables físico-químicas en las propiedades organolépticas. En el caso de los ácidos grasos como el linoléico, araquidónico o linolénico, también se ha reportado la influencia de estas variables en complejos con CDs [6,9]. Por ello, el siguiente paso en nuestro estudio es ver la influencia de estas variables sobre el complejo HPβCD/RA.

Para la variación de pH, distintas medidas de K_F a distintos pHs {2-8} fueron realizadas. Los resultados (Fig 2A) demostraron la fuerte dependencia de K_F con respecto al pH. De Fig 2A podemos obtener un ajuste polinomial al que, aplicándole un tratamiento de derivadas podemos obtener un valor experimental de pK_a , en este caso, se situó en 4.31. Previamente, la simulación manual del pK_a de RA con el software Avogadro dio un pK_a de 4.1, no muy lejano al determinado. Por tanto, a pH bajo el complejo es más estable.

En cuanto a la temperatura, los resultados muestran un comportamiento inusual (Fig 2B) a diferencia de otros ácidos grasos [6]. A partir de 25°C el complejo cambia de estequiometría 1:1 a 2:1 (R^2 ec. 6 >0.99 frente a ec. 3 de $\approx$ 0.95 a 37°C).

Tabla 1. K_F experimentales con cada CD, regresión lineal para cada modelo (pH 8 a 25°C) y valor score de docking molecular

	K_F (M^{-1})	SD (+/-) (M^{-1})	R^2 (1:1)	R^2 (1:2)	Score
α CD	3859.00	192.50	0.99	0.91	-2.30
β CD	5846.00	292.30	0.97	0.86	-3.20
M β CD	6814.00	340.70	0.99	0.91	-3.70
HP β CD	8347.00	417.35	0.99	0.94	-3.90

Esto puede ser debido a un cambio en la estructura de RA en función de la temperatura, que originaría que entraran 2 CDs por RA.

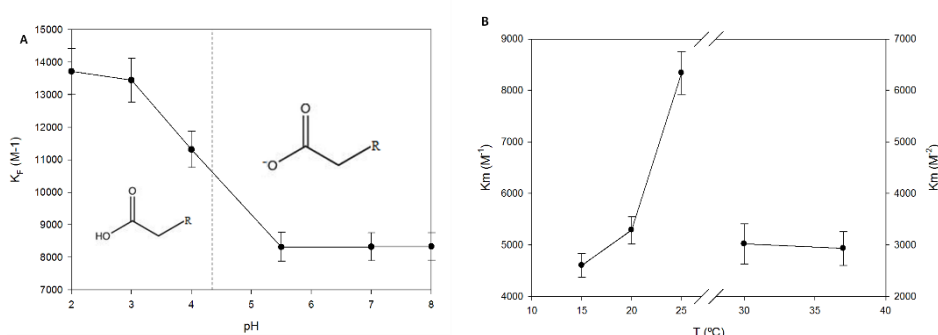


Fig 2. (A), dependencia de K_F frente a pH, la separación corresponde al pKa experimental. (B) Efecto de la temperatura sobre K_F a pH 8.

Modelado molecular

Para intentar comprender mejor la formación del complejo de inclusión, se hizo uso de la técnica de docking molecular, la cual predice la conformación del complejo y uniones no covalentes. Los resultados (Tabla 1) muestran una correlación perfecta entre los valores de K_F y los score obtenidos.

Además, los resultados muestran como α CD no encapsula del todo a RA (Fig 3A) a diferencia de β CD y derivadas. β CD y M β CD (Fig 3B y 3C) tienen el mismo número de puentes de hidrógeno; luego, un aumento en su hidrofobicidad debido al metil puede justificar el incremento. HP β CD (Fig 3D) tiene menos puentes de hidrógeno pero el incremento de hidrofobicidad, junto a una mejor entrada de RA, puede justificar los valores de K_F .

CONCLUSIONES

En este estudio se ha demostrado, por primera vez, que RA presenta un comportamiento de agregación, con una c.m.c. de 35 μ M a pH 8 y 25°C) Este

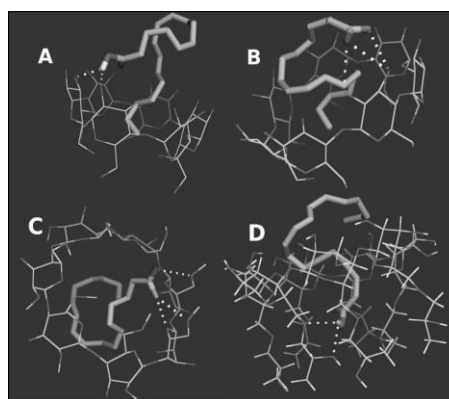


Fig 3. Resultados de docking de RA con A: α CD, B: β CD, C: M β CD y D: HP β CD. Los puentes de hidrógeno están pintados de amarillo.

comportamiento se modifica por la presencia en el medio de CDs. Los complejos CD/ RA siguen un modelo estequiométrico 1:1. De entre todas las CDs evaluadas la que presentó una mayor constante de encapsulación fue HP β CD. El valor de las constantes de encapsulación y estequiometría se mostraron dependientes de la temperatura. También mostraron gran dependencia con el pH, encapsulando mejor a pH bajo. Los resultados de docking mostraron las posibles interacciones entre ellos. Este estudio puede ayudar su utilización en alimentos funcionales e industria nutracéutica.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto ha sido financiado por "Ministerio de Ciencia e Innovación" (Proyecto AGL2014-57431) y por "Programa de ayudas a Grupos de Excelencia de la Región de Murcia, de la Fundación Séneca, Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia" N° 19893/GERM/2015. Adrián Matencio tuvo una beca "Ayudas de Iniciación a la Investigación 2014" de la universidad de Murcia (R.-662/2014), y ahora una "FPU UM" de la Universidad de Murcia (R-1042/2015).

REFERENCIAS

- [1] Yang, B., Chen, H., Stanton, C., Ross, R. P., Zhang, H., Chen, Y. Q., & Chen, W. (2015). Review of the roles of conjugated linoleic acid in health and disease. *Journal of Functional Foods*, 15, 314-325.
- [2] Authority, E. F. S. (2015). Scientific opinion on the substantiation of a health claim related to an equimolar mixture of the CLA isomers c9, t11 and t10, c12 (marketed as Clarinol® and Tonalin®) and "contributes to a reduction in body fat mass" pursuant to Article 13 (5) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 13(1).
- [3] López-Nicolás, J. M., Rodríguez-Bonilla, P., & García-Carmona, F. (2014). Cyclodextrins and antioxidants. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54(2), 251-276.
- [4] Kim, S. J., Park, G. B., Kang, C. B., Park, S. D., Jung, M. Y., Kim, J. O., & Ha, Y. L. (2000). Improvement of oxidative stability of conjugated linoleic acid (CLA) by microencapsulation in cyclodextrins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(9), 3922-3929.
- [5] Park, C. W., Kim, S. J., Park, S. J., Kim, J. H., Kim, J. K., Park, G. B., ... & Ha, Y. L. (2002). Inclusion complex of conjugated linoleic acid (CLA) with cyclodextrins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(10), 2977-2983.
- [6] López-Nicolás, J. M., Bru, R., Sánchez-Ferrer, A., & García-Carmona, F. (1995). Use of 'soluble lipids' for biochemical processes: linoleic acid-cyclodextrin inclusion complexes in aqueous solutions. *Biochemical Journal*, 308(1), 151-154.
- [7] Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminformatics*, 4(1), 17.
- [8] Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455-461.
- [9] Bru, R., López-Nicolás, J., & García-Carmona, F. (1995). Aggregation of polyunsaturated fatty acids in the presence of cyclodextrins. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 97(3), 263-269.