



CASEINA MICELAR COMO NANOCARREADOR PARA A RUTINA: UM ESTUDO DA FORMAÇÃO DO NANOCOMPLEXO

Hauster M. C. De Paula^{1,*} (PQ), Ygor R. Guimarães² (G), José A. S. Costa¹ (PQ), Thays C. Azevedo¹ (G), Carlos S. Ferreira¹ (PQ), Eliara A. Hudson³ (PQ), Ana C. S. Pires³ (PQ), Luis H. M. da Silva² (PQ).

¹ Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Ciências da Educação, Santarém, Pará, Brasil; hauster.paula@ufopa.edu.br

² Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Química, Viçosa, Minas Gerais, Brasil;

³ Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

RESUMO

A rutina (RT) possui propriedades antioxidantes, dentre outras. Entretanto, a RT possui baixa solubilidade em água. Moléculas bioativas ligadas as micelas de caseína podem apresentar maior estabilidade e solubilidade, usando a caseína micelar (CM) como um sistema nanocarreador. Portanto, nesse estudo investigou-se a formação desses complexos da CM-RT, por dados obtidos pela ressonância plasmônica de superfície. A formação dos $[CM-RT]^{\ddagger}$ a partir das moléculas livres de CM e RT, ocorreu em múltiplas etapas como evidenciado nas curvas de Arrhenius, uma vez que durante esse processo as mudanças conformacionais são mais pronunciadas comparadas ao processo de $[CM-RT]^{\circ} \rightarrow [CM-RT]^{\ddagger}$, que ocorre em uma única etapa. Para $T < 297,15$ K, as forças hidrofóbicas foram mais pronunciadas na estabilização dos complexos. Já para $T > 297,15$ K, observa-se que a formação dos $[CM-RT]^{\circ}$, foi entropicamente dirigida. Este estudo é estratégico para auxiliar no desenvolvimento de novas moléculas com a RT.

Palavras-chave: Rutina, Caseína Micelar, Formação de complexos, Termodinâmica.

Introdução

A RT é um flavonoide, encontrado em frutas cítricas, e é composto pela aglicona e um dissacarídeo rutinose ligado à quercetina. A RT possui ação propriedades anticancerígenas, vasoprotetoras, citoprotetoras e antiosteopênicas. Entretanto, a biodisponibilidade da rutina no trato gastrointestinal é conhecida como limitada devido à sua baixa solubilidade em água, má absorção e bioacessibilidade restrita. Estudos mostram que a formação de complexos com proteínas pode aumentar a sua biodisponibilidade, bem como as propriedades antioxidantes da rutina, porém alguns experimentos, *in vitro*, indicaram baixa estabilidade¹. Nesse contexto, a caseína micelar, um agregado proteico, que possui canais e cavidades preenchidos com soro permite sua ligação a pequenas moléculas, como compostos hidrofóbicos, incluindo as moléculas bioativas, dentre outras. Assim, moléculas bioativas ligadas as micelas de caseína podem apresentar maior estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade, usando a CM como um sistema nanocarreador. Portanto, nesse estudo vamos investigar a dinâmica de formação desses complexos da CM-RT, através da determinação de parâmetros cinéticos e termodinâmicos obtidos pela técnica de ressonância plasmônica de superfície (RPS)².

Experimental

Utilizou-se a técnica espectroscópica ressonância plasmônica de

superfície (RPS). Essa técnica possui alta sensibilidade e realiza medidas em tempo real, que nos permite obter, através do ajustes em equações e modelos, os valores dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos. O equipamento utilizado foi o o Biacore X100 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, EUA). Para este estudo a CM foi imobilizada em um sensor-chip CM5 pelo método Acoplamento amina. O sensor-chip CM5 conta, na sua superfície, com cadeias de carboximetidextrana (CMD), que devem ser ativadas utilizando uma mistura de dois reagentes, ambos em 1M, seja o 1-3-(*N*, *N*- dimetilamino) propil-*N*-etilcarbodiimida (EDC) e *N*-hidroxissuccinimida (NHS), no pH 4, que flui no fluxo de 10 $\mu\text{L min}^{-1}$, durante 7 min. Após a ativação, a solução de CM (30 $\mu\text{g mL}^{-1}$), flui sobre a superfície do chip imobilizando a proteína. As cadeias de CMD ativadas e não ligadas covalentemente com a CM precisam ser desativadas utilizando uma solução de cloridrato de etanolamina, que flui sobre o sistema no fluxo de 10 $\mu\text{L min}^{-1}$. Nessa preparação do chip imobilizou-se 2744 RU (unidades de ressonância) de densidade de carga da CM. O baixo valor de densidade de carga é fundamental para minimizar a possibilidade do transporte de massa da RT. A célula de fluxo do sistema RPS, apresenta uma canal de referência (sem a CM, canal 1) e um de amostra (com a CM, canal 2). Para o estudo da interação, soluções de RT, na faixa de concentração de 40 a 110 μM , preparadas no tampão pH 7,4, fluem sobre a superfície do sensor-chip. A cada experimento de interação, uma solução de RT foi injetada em ambos canais. A resposta RU foi obtida subtraindo a resposta do canal 2 do canal 1. Os sensorgramas mostram a dependência das unidades ressonantes com o tempo (RU vs. t).



Os experimentos de interação da RT com a CM foram realizados a pH 7,4 em diferentes temperaturas (12 a 28 °C).

Resultados e Discussão

Os sensogramas (não mostrados) foram ajustados às Eqs. 1-2, obtendo os valores das constantes cinéticas de associação (k_a) e dissociação (k_d). Através da dependência dos valores de k_a e k_d em função da temperatura, figura 1a, calculou-se os valores dos parâmetros energéticos utilizando as Eqs. 3-5 que determinam o processo de formação do complexo ativado, tabela 1.

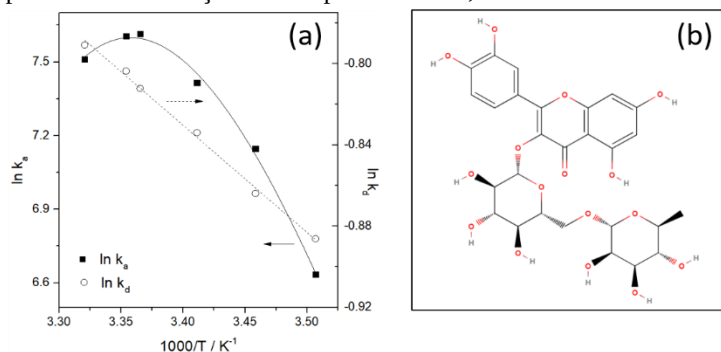


Figura 1. (a) Gráficos de $\ln k_a$ ou $\ln k_d$ versus T. **(b)** Estrutura da Rutina

$$RU(t) = RU_{max}[1 - e^{-k_{obs}(t-t_0)}] \quad Eq. 1 \quad E_{act} = \Delta H^\ddagger + R \cdot T \quad Eq. 5$$

$$RU(t) = RU(t_r) e^{-k_d(t-t_r)} \quad Eq. 2 \quad \Delta G^0 = -RT \ln K_b \quad Eq. 6$$

$$\Delta G^\ddagger = -R \cdot T \cdot \ln \frac{k_a \cdot h}{K_B \cdot T} \quad Eq. 3 \quad E_{act,x} = -R \left(\frac{\partial \ln K}{\partial 1/T} \right) \quad Eq. 7$$

$$T\Delta S^\ddagger = \Delta H^\ddagger - \Delta G^\ddagger \quad Eq. 4 \quad T\Delta S^0 = \Delta H^0 - \Delta G^0 \quad Eq. 8$$

Tabela 1. Parâmetros energéticos da formação do complexo de transição do CM-RT, pH 7,4.

T K	Fase de associação (a)				Fase de dissociação (d)			
	E_{act}	$\Delta H^\ddagger$	$\Delta G^\ddagger$	$T\Delta S^\ddagger$	E_{act}	$\Delta H^\ddagger$	$\Delta G^\ddagger$	$T\Delta S^\ddagger$
	kJ mol ⁻¹							
285,15	91,85	89,48	54,00	35,48	4,39	2,02	71,83	-69,81
289,15	71,90	69,49	53,56	15,94		1,99	72,82	-70,83
293,15	43,39	40,96	53,68	-12,72		1,95	73,78	-71,83
297,15	7,04	4,57	53,95	-49,38		1,92	74,77	-72,85
298,15	-3,19	-5,67	54,16	-59,83		1,91	75,01	-73,10
301,15	-36,50	-39,00	54,97	-93,97		1,89	75,76	-73,87

A tabela 1 mostra uma barreira energética para o processo de formação do complexo intermediário a partir do complexo termodinamicamente estável ([CM-RT]^o → [CM-RT][‡]) de $\Delta G_a^\ddagger \cong 74,00 \text{ kJ mol}^{-1}$, que é maior quando comparado ao processo a partir das moléculas livres em solução (CM ou RT), $\Delta G_a^\ddagger \cong 54,05 \text{ kJ mol}^{-1}$. Essa barreira energética é modulada pela energia de interação ($-39,00 \leq \Delta H_a^\ddagger \leq 89,48 \text{ kJ mol}^{-1}$ ou $\Delta H_d^\ddagger \cong 2,0 \text{ kJ mol}^{-1}$) e por fatores configuracionais ($-93,97 \leq T\Delta S_a^\ddagger \leq 35,00 \text{ kJ mol}^{-1}$ ou $T\Delta S_d^\ddagger \cong -72,05 \text{ kJ mol}^{-1}$). Os valores de $\Delta H_x^\ddagger$ e $\Delta S_x^\ddagger$ estão associados às energias absorvidas durante os processos moleculares de dessolvatação das moléculas de água e dos íons do tampão de análise, dos sítios de interação da CM e da RT (figura 1b), bem como a absorção de energia para promover as mudanças conformacionais nas cadeias proteicas e na molécula da RT, e da liberação de energia promovida no processo de interação da CM-RT.

A tabela 1 mostra que os valores da $E_{a,a}^\ddagger$ diminuem com o aumento da temperatura, indicando uma menor absorção de energia para promover as mudanças conformacionais de ambas moléculas. Já em altas temperaturas a energia liberada durante o processo de associação, promovida por interações hidrofílicas, superam a energia absorvida durante os processos moleculares citados. A formação dos [CM-RT][‡] a partir das moléculas livres de CM e RT, ocorreu em múltiplas etapas como evidenciado nas curvas de Arrhenius, uma vez que durante esse processo as mudanças conformacionais são mais pronunciadas comparadas ao processo de [CM-RT]^o → [CM-RT][‡], que ocorre em uma única etapa, ou seja, independente da temperatura, apresentando um menor valor da $E_{a,d}^\ddagger$.

Os valores da constante de ligação (K_b) são obtidos usando a relação $K_b = k_a/k_d$, e usados para obter os valores de ΔG^0 , Eq. 6. Os valores de ΔH^0 foram obtidos pela aproximação de van'T Hoff e, os de $T\Delta S^0$ pela equação 8 (tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros termodinâmicos padrão do complexo CM-RT, pH 7.4.

Temperatura K	K_b 10 ³ L mol ⁻¹	ΔH^0	ΔG^0	$T\Delta S^0$
			kJmol ⁻¹	
285,15	1,84	88,49	-17,83	106,31
289,15	3,01	67,26	-19,26	86,52
293,15	3,82	38,48	-20,10	58,58
297,15	4,57	2,76	-20,82	23,58
298,15	4,49	-7,19	-20,85	13,66
301,15	4,04	-39,32	-20,79	-18,53

Os valores de K_b foram da ordem de 10³ M⁻¹. Os valores de ΔH^0 e $T\Delta S^0$ diminuem com o aumento da temperatura. Essa grande variação nos valores ($-39,00 \leq \Delta H^0 \leq 88,49 \text{ kJ mol}^{-1}$ ou $-18 \leq T\Delta S^0 \leq 106,31 \text{ kJ mol}^{-1}$), e os valores de $\Delta G^0 \cong 19,94 \text{ kJ mol}^{-1}$, evidencia que houve uma compensação da entálpico-entrópica para a estabilização dos complexos. Para $T < 297,15 \text{ K}$, as forças hidrofóbicas foram mais pronunciadas na estabilização dos complexos. Já para $T > 297,15 \text{ K}$, observa-se que a formação dos [CM-RT]^o, foi entropicamente dirigida onde as ligações de hidrogênio e forças de van der Waals são de maior magnitude.

Conclusões

Os valores de ΔG^0 indicam que a formação dos complexos [CM-RT]^o, são mais estáveis comparado às espécies livres (CM ou RT) em solução e que este processo é entropicamente dirigido em $T < 297,15 \text{ K}$ e entálpicamente dirigido em $T > 297,15 \text{ K}$, onde as ligações de hidrogênio e forças de van der Waals são mais pronunciadas para a estabilização dos complexos. A determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos é estratégica para determinação da estabilidade dos complexos formados, bem como para auxiliar no desenvolvimento de novas moléculas.

Agradecimentos

CNPq, CAPES, FINEP, FAPEMIG.

Referências

- REMANAN, et. al., *Food. Chem.* **2021**, 353, 128534
- ZHAO, et. al., *Int. Jour. Macr. Biol.* **2024**, 135748.