



A FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS DE B. LACTOGLOBULINA COM BRIJ-58 É ESTABILIZADA POR COMPENSAÇÃO ENTALPICA-ENTROPICA

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

O estudo da dinâmica molecular da interação dos complexos formados entre proteínas-surfactantes é fundamental para o desenvolvimento de novas moléculas com potencial terapêutico. Este trabalho investiga o processo de formação dos complexos entre β -Lactoglobulina (BLG) com o Brij 58 (B58), pela técnica RPS. Os valores dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos revelam que a formação do $[BLG-B58]^{\circ}$, ocorre pela formação do complexo ativado, $[BLG-B58]^{\ddagger} \rightarrow [BLG-B58]^{\circ}$. A formação dos complexos de transição $[BLG-B58]^{\ddagger}$ a partir das espécies livres em solução ou através do complexo termodinamicamente estável $[BLG-B58]^{\circ}$ ocorreu em múltiplas etapas. O aumento da temperatura favorece a formação do complexo $[BLG-B58]^{\circ}$. Já os valores de $\Delta G^{\circ} < 0$ mostram que, em condições padrão, o complexo $[BLG-B58]^{\circ}$ é termodinamicamente mais estável do que as espécies livres de BLG e B58, em solução. A formação do complexo $[BLG-B58]^{\circ}$ ou das espécies livres é determinada por um equilíbrio de interações hidrofóbicas e hidrofílicas.

Palavras-chave: Compensação hidrofóbica-hidrofílica, dinâmica molecular, cinética química, termodinâmica.

Introdução

Os nanocomplexos formados por proteína-surfactante tem aplicabilidade na indústria de cosméticos, farmaceuticas, dentre outras. Os surfactantes não iônicos como o Brij 58, que possui um região hidrofílica (grupos de óxido de etileno) e uma cadeia hidrofóbica que auxilia nos sistemas biomiméticos, controle de transporte de fármacos, até mesmo em aplicações terapêuticas¹.

A formação desses complexos tem o objetivo de potencializar e/ou modificar suas propriedades funcionais. A determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos da interação proteína-surfactantes é estratégica para modular as diferentes propriedades físico-químicas de diversos sistemas coloidais. Portanto, neste trabalho determinamos os parâmetros cinéticos e termodinâmicos da formação dos complexos formados entre a proteína Beta Lactoglobulina (BLG) com o surfactante não-iônico Brij 58 (B58), utilizando a técnica de ressonância plasmônica de superfície, RPS².

Experimental

Os valores das parâmetros termodinâmicos foram obtidos pela técnica RPS utilizando o instrumento Biacore X100 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, EUA). Para este estudo a BLG foi imobilizada em um sensor-chip CM5 pelo método Acoplamento amina. Esse método consiste na ativação das cadeias de carboximetidextrana, fixadas ao

chip, pela mistura de 1-3-(*N,N*-dimetilamino)propil-N-etilcarbodiimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS) na proporção 1:1, no pH 4. Posteriormente, a solução de BLG (30 $\mu\text{g mL}^{-1}$), flui sobre a superfície do chip imobilizando a proteína. Para finalizar o processo de imobilização os grupos da cadeia da matriz de dextrana não ligados à proteína são bloqueados por uma solução de cloridrato de etanolamina. Imobilizou-se 2537 RU de densidade de carga, da BLG, minimizando a possibilidade do transporte de massa do ligante. A célula de fluxo do sistema RPS, apresenta um canal de referência (sem a BLG, canal 1) e um de amostra (com a BLG, canal 2). Soluções de B58, na faixa de concentração de 8 a 13 μM , foram preparadas na solução tampão pH 7,4. A cada experimento de interação, uma solução de B58 foi injetada em ambos canais. A resposta RU foi obtida subtraindo a resposta do canal 2 pelo canal 1. Os experimentos de ligação do B58 com a BLG foram realizados a pH 7,4 em diferentes temperaturas (15 a 40 °C).

Resultados e Discussão

A Figura 1a mostra os sensorgramas (RU x tempo (t)) da interação BLG-B58 a 298 K e pH 7,4. Os sensorgramas 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, calculou-se os valores dos parâmetros energéticos utilizando as Eq. 3-5 que determinam o processo de

de formação do complexo ativado, tabela 1.

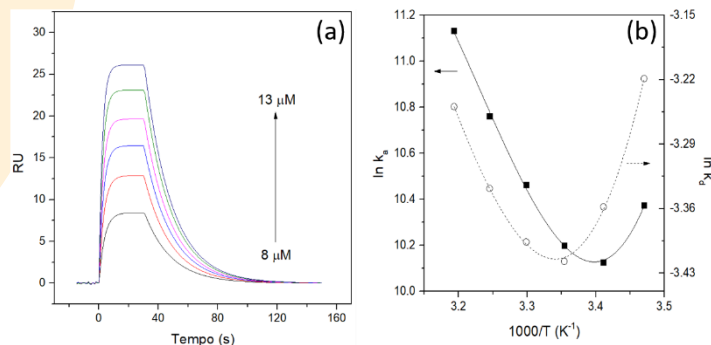


Figura 1. a) Sensogramas de BLG (2537 RU) imobilizada interagindo com B58. b) Gráficos de $\ln k_a$ ou $\ln k_d$ versus T ajustados ao modelo não linear de Arrhenius.

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

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

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

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

Tabela 1. Parâmetros energéticos da formação do complexo de transição do BLG-B58, pH 7,4.

T °C	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}				
15	-56,02	-58,42	45,49	-103,91	-11,23	-13,62	78,48	-92,11
20	-15,03	-17,47	46,94	-64,41	-5,53	-7,97	80,03	-88,00
25	17,78	15,30	47,73	-32,44	0,19	-2,29	81,49	-83,78
30	43,14	40,62	48,06	-7,44	5,92	3,40	82,84	-79,44
35	61,72	59,16	48,03	11,13	11,66	9,09	84,10	-75,01
40	74,13	71,53	47,74	23,79	17,38	14,78	85,28	-70,50

A tabela 1 mostra a variação dos valores de $E_{a,a}^\ddagger$, $E_{a,d}^\ddagger$, $\Delta H_{a,a}^\ddagger$, $\Delta H_{a,d}^\ddagger$, $\Delta S_{a,a}^\ddagger$ e $\Delta S_{a,d}^\ddagger$ em função da temperatura (T). Os valores de $E_{a,a}^\ddagger$ mostram que a energia liberada durante a associação das espécies livres foi maior (para $T \leq 20^\circ\text{C}$) do que as energias absorvida para remover a camada de solvatação e promover as mudanças conformacionais no sítio de interação da proteína³. Os valores da $E_{a,d}^\ddagger$ e $\Delta H_{a,d}^\ddagger$ também aumentam com o aumento da temperatura, indicando que houve um maior conteúdo de liberação de energia entálpica no processo de $[\text{BLG}-\text{B58}]^\ddagger \rightarrow [\text{BLG}-\text{B58}]^0$, promovido pela formação da camada de solvatação da calda hidrofóbica do B58, conforme evidenciada pelo ganho de entropia que aumenta com o aumento da temperatura. A formação dos complexos de transição $[\text{BLG}-\text{B58}]^\ddagger$ a partir das espécies livres em solução ou através com complexo termodinamicamente estável $[\text{BLG}-\text{B58}]^0$ ocorreu em múltiplas etapas, conforme evidenciado pelas curvas de Arrhenius ($\ln k_a$ ou $\ln k_d \times 1/T$), na figura 1b. A formação do $[\text{BLG}-\text{B58}]^\ddagger$ a partir da associação das espécies livres em solução, ($\Delta G_{a,a}^\ddagger = 59,16 \text{ kJ mol}^{-1}$), precisam superar uma barreira energética menor compara ao processo de formação pela dissociação do $[\text{BLG}-\text{B58}]^0$, ($\Delta G_{a,d}^\ddagger = 84,10 \text{ kJ mol}^{-1}$). Essas barreiras de energia são resultados da energia potencial de interação ($-58,42 < \Delta H_{a,a}^\ddagger < 71,53 \text{ kJ mol}^{-1}$ ou $-13,62 < \Delta H_{a,d}^\ddagger < 14,78 \text{ kJ mol}^{-1}$) e por fatores configuracionais ($-103,91 < T\Delta S_{a,a}^\ddagger < 23,79 \text{ kJ mol}^{-1}$ ou $-92,11 < T\Delta S_{a,d}^\ddagger < -50,70 \text{ kJ mol}^{-1}$). Esses fatores são causados pela mudança na camada de solvatação do sítio de interação da BLG e da cadeia do B58 também das mudanças conformacionais e das ligações de hidrogênio. Os

valores dos parâmetros $\Delta H_{a,a}^\ddagger$, $\Delta H_{a,d}^\ddagger$, $T\Delta S_{a,a}^\ddagger$ e $T\Delta S_{a,d}^\ddagger$ mostra que o processo da formação dos complexos ativados a partir das espécies livres ou do complexo termodinamicamente estável ocorreu por um compensação isocinética. A cinética de formação do complexo $[\text{BLG}-\text{B58}]^0$ ocorre através da formação de um $[\text{BLG}-\text{B58}]^\ddagger$. 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 BLG-B58, pH 7.4.

Temperatura K	K_b 10^5 L mol^{-1}	ΔH^0	ΔG^0	$T\Delta S^0$
			kJ mol^{-1}	
15	9,58	-44,84	-32,99	-11,85
20	7,88	-9,55	-33,09	23,54
25	8,20	17,54	-33,75	51,29
30	9,85	37,17	-34,78	71,95
35	13,01	50,02	-36,07	86,09
40	18,30	56,71	-37,54	94,25

O aumento da temperatura favorece o processo de formação dos complexos $[\text{BLG}-\text{B58}]^0$, evidenciado pelo aumento dos valores de K_b com o aumento da temperatura. Os valores de $\Delta G^0 < 0$ mostram que, em condições padrão, a formação do complexo $[\text{BLG}-\text{B58}]^0$ é mais favorável do que para as espécies livres de BLG e B58. Para $T \leq 20^\circ\text{C}$ o processo é dirigido entalpicamente, indicando que interações hidrofílicas determinam a formação do $[\text{BLG}-\text{B58}]^0$. Já para $T > 20^\circ\text{C}$ o processo é dirigido entropicamente, sugerindo que processos de dessolvatação dirigem a estabilização do complexo. Os valores de ΔG^0 permaneceram razoavelmente constantes ($-32,99 < \Delta G^0 < -37,54 \text{ kJ mol}^{-1}$), com o aumento da T , no entanto, os valores de ΔH^0 e ΔS^0 aumentaram gradualmente indicando que houve uma compensação entálpica-entrópica para a formação dos complexos $[\text{BLG}-\text{B58}]^0$, que pode ser observada no gráfico de ΔH^0 vs. ΔS^0 (gráfico não mostrado), com uma relação linear com $r^2 > 0,99$.

Conclusões

A formação do complexo $[\text{BLG}-\text{B58}]^0$ ou das espécies livres é determinada por um equilíbrio de interações hidrofóbicas e hidrofílicas. As forças hidrofóbicas é proveniente do processo de dessolvatação das regiões hidrofóbicas das moléculas interagentes enquanto as contribuições hidrofílicas vêm da formação de ligações de hidrogênio e forças dispersivas. A determinação dos parâmetros cinéticos é fundamental para caracterização do mecanismo de formação dos complexos de proteínas-surfactantes e auxiliar no desenvolvimento de novas moléculas.

Agradecimentos

CNPq, CAPES, FINEP, FAPEMIG.

Referências

- ¹N. Gull, et. al., *J. Coll. Int. Sci.* **2011**, 364, 157-162
- ²A. de Castro, et. al., *Int. Jour. Macr. Biol.* **2021**, 325-331.
- ³H. de Paula, et. al., *J. Braz. Chem. Soc.* **2020**, 2611-2619.