



ESTABILIDADE DA CURCUMINA É OBTIDA PELA FORMAÇÃO DE NANOCOMPLEXOS COM PROTEÍNAS

Hauster M. C. De Paula^{1,*} (PQ), Ygor R. Guimarães² (G), José A. S. Costa¹ (PQ), 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 curcumina (CUR) é um polifenólico com diversas atividades biológicas. No entanto, possui baixa solubilidade em água, além de possuir fotoestabilidade. A interação da CUR com proteínas pode aumentar a sua biodisponibilidade e sua diminuir a fotoestabilidade. Neste trabalho, realizamos o estudo cinético para elucidar a dinâmica da formação do complexo da CUR com a proteína β -Lactoglobulina (BLG) pela técnica de ressonância plasmônica de superfície. A formação do complexo ativado pela dissociação do $[BLG-CUR]^o$ é mais lenta em comparação à associação das moléculas livres em solução. Valores de $\Delta H^o > 0$ e $\Delta S^o > 0$, destaca que as interações hidrofóbicas são mais pronunciadas para estabilização dos complexos e com valores de $K_b = 9,43 \times 10^4 M^{-1}$, a 298,15 K, e no pH 7,4. O estudo cinético e termodinâmico sobre a interação BLG e CUR torna possível modular e otimizar, alterando o estado termodinâmico do sistema, o transportador e a liberação de CUR por BLG.

Palavras-chave: Cinética, Curcumina, B. Lactoglobulina, Termodinâmica.

Introdução

A curcumina (CUR) é polifenólico com atividades biológicas, anti-inflamatória, anticancerígena, antioxidante, antimicrobiana¹. Esses efeitos podem ser limitados devido a sua baixa solubilidade e fotoestabilidade em sistemas aquosos². Na busca de garantir sua funcionalidade e aumentar sua biodisponibilidade e estabilidade foram realizados estudos da interação da curcumina com proteínas³⁻⁵. Em especial destaca-se o estudo da interação da CUR com a β Lactoglobulina (BLG). Segundo Snehari e colaboradores afirmam que a estabilidade da curcumina ligada à BLG em solução é aumentada 6,7 vezes, em comparação com a curcumina sozinha (em solução aquosa)⁶. Li *et. al.*, 2013, destacam que a escolha da interação da BLG com a curcumina é estratégica, porque a BLG é resistente à digestão com pepsina. Portanto, a BLG atua como nanocarreador da CUR que é benéfico para a absorção intestinal do CUR ou para o tratamento mais eficaz da doença inflamatória intestinal⁷. Apesar do esforços para compreender a dinâmica de interação da CUR com a BLG, não encontramos, até este momento, dados da cinética de formação dos complexos da BLG-CUR. Portanto, neste trabalho investigamos a cinética de interação da BLG com a CUR, através da técnica de ressonância plasmônica de superfície, RPS.

Experimental

β BLG ($\geq 90\%$ em peso) e CUR ($\geq 80\%$ em peso) foram adquiridos da

Sigma-Aldrich (EUA). RPS utilizado é um instrumento Biacore X100 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, EUA). Para este estudo BLG foi imobilizada em um sensor-chip CM5 pelo método Acoplamento amina. O CM5 possui cadeias de carboximetidextrana (CBM), fixadas ao chip, que são preparadas pela mistura de 1-3-(N,N-dimetilamino) propil-N-etilcarbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) na proporção 1:1, no pH 4. Após à ativação da CBM uma solução de BLG ($30 \mu g mL^{-1}$), flui sobre a superfície do chip imobilizando a proteína. Desativou-se a CBM não ligados a BLG utilizando uma solução de cloridrato de etanolamina. Obteve-se 3047 RU de densidade de carga, da BLG. Os canais de referência (sem a BLG, canal 1) e um de amostra (com a BLG, canal 2), que compõe o sistema em fluxo do RPS, facilita a obtenção dos dados da interação que ocorre somente entre a BLG e a CUR. Soluções de CUR (8 a $13 \mu M$), preparadas na solução tampão pH 7,4, fluem, cada uma, no sistema (em ambos canais), investigando o processo de associação da BLG com a CUR. A resposta RU foi obtida subtraindo a resposta do canal 2 do canal 1. Os experimentos de ligação do CUR com a BLG foram realizados a pH 7,4. Os dados cinéticos e termodinâmicos foram obtidos pelas equações de 1 – 8.

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

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

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

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



Onde $x = a$ (associação) e d (dissociação), $\Delta G_x^\ddagger$ é a variação energia livre de Gibbs de transição, $\Delta H_x^\ddagger$ é a variação da entalpia de transição, $\Delta S_x^\ddagger$ é a variação da entropia de transição, h é a constante de Planck, K_B é a constante de Boltzmann, $E_{a,x}^\ddagger$ é a energia de ativação, t_f é o tempo final e t_0 é o tempo inicial, RU é a unidade ressonante.

Resultados e Discussão

A tabela 1 mostra os valores das constantes cinéticas de associação (k_a) e dissociação (k_d), em diferentes temperaturas (285,15 K a 301,15 K). 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 formação do complexo ativado, tabela 1.

Tabela 1 – Valores de k_a ou k_d e dos parâmetros energéticos da interação entre BLG com CUR.

T	k_a	k_d	$E_{act,a}$	41,14 ^a
K	$10^4 M^{-1}s^{-1}$	s^{-1}	$\Delta H_a^\ddagger$	38,69 ^a
285,15	1,24	0,242	$\Delta G_a^\ddagger$	47,64 ^a
289,15	1,59	0,255	$T\Delta S_a^\ddagger$	-8,95 ^b
293,15	2,02	0,265	$E_{act,d}$	7,96 ^a
297,15	2,51	0,278	$\Delta H_d^\ddagger$	5,51 ^a
298,15	2,64	0,280	$\Delta G_d^\ddagger$	75,18 ^a
301,15	3,12	0,290	$T\Delta S_d^\ddagger$	-69,67 ^b

Dados: ^a kJ mol⁻¹; ^b kJ mol⁻¹K.

A tabela 1 mostra que os valores de k_a ou k_d aumentam com o aumento da temperatura (T). Os valores de k_a aumentam com o incremento da energia cinética molecular média, promovendo uma maior alteração na camada de solvatação das moléculas de CUR, resultando no aumento do número de complexos formados por segundo, além de uma mudança mais acentuada na conformação do sítio de interação da BLG. Os valores de k_d aumentaram com o crescimento da faixa de temperatura, indicando que os sítios de interação da BLG se tornaram mais flexíveis, possibilitando a interação de CUR em sítios mais internos da proteína, o que resulta em uma maior absorção de energia. Experimentos cinéticos realizados em diferentes temperaturas fornecem insights importantes sobre a dinâmica molecular da formação de complexos, portanto, através das curvas de Arrhenius (gráficos não mostrados), ($\ln k_a$ ou $k_d \times 1/T$), permitiram observar que ambos processos (associação ou dissociação) ocorrem em uma única etapa. A formação do complexo ativado pela dissociação do $[BLG-CUR]^\circ$ é mais lenta em comparação à associação das moléculas livres em solução, porque os valores de $\Delta G_d^\ddagger > \Delta G_a^\ddagger$, ou seja, maior a barreira energética ($\Delta G_a^\ddagger \approx 47,75 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $\Delta G_d^\ddagger \approx 75,80 \text{ kJ mol}^{-1}$)⁹. Os valores de $E_{act,a}^\ddagger = 41,14 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $\Delta H_a^\ddagger = 38,69 \text{ kJ mol}^{-1}$, para a formação do complexo ativado a partir das moléculas livres em solução é maior quando comparado aos valores da formação do complexo ativado a partir do complexo estável, $[BLG-CUR]^\circ$, ($E_{act,d}^\ddagger = 7,96 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $\Delta H_d^\ddagger = 5,51 \text{ kJ mol}^{-1}$), sugerindo que a absorção de energia para mudanças na camada de solvatação das espécies livres em solução e na mudança conformacional no sítio de interação da proteína são mais pronunciadas quando comparado ao $[BLG-CUR]^\circ$. 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° . Os valores de ΔH° foram obtidos pela aproximação de van'T Hoff e, os de $T\Delta S^\circ$ pela equação 8. Valores de $\Delta G^\circ < 0$ indicam que a formação dos complexos $[BLG-CUR]^\circ$ é favorecida com o aumento da temperatura, e que, no equilíbrio termodinâmico, a formação dos complexos é mais estável energeticamente. Já os valores $\Delta H^\circ > 0$ e $\Delta S^\circ > 0$ sugerem que as interações hidrofóbicas foram mais pronunciadas para formação e estabilização do complexo $[BLG-CUR]^\circ$. Por meio deste estudo, pode-se observar que o processo de formação do complexo termodinamicamente estável é conduzido pela formação de um complexo intermediário, sendo esse processo entropicamente dirigido, onde os eventos de dessolvatação e alterações na conformação do sítio de ligação da proteína desempenham um papel crucial. O valor de $K_b = 9,43 \times 10^4 M^{-1}$, a 298,15 K, e no pH 7,4, foi semelhante ao obtido por Li e colaboradores, $K_b = 1,33 \times 10^5 M^{-1}$, no pH 7, e por Sneharani, 2010, $K_b = 1,03 \times 10^5 M^{-1}$, no pH 7, e 2,15 vezes maior ao que foi obtido por Kanakis, 2012, onde afirmam que as interações hidrofóbicas são mais pronunciadas para a estabilização dos complexos entre BLG e CUR⁶⁻⁸. O aumento da temperatura favorece a formação dos complexos $[BLG-CUR]^\circ$ quando comparado as moléculas livres (BLG e CUR), em solução.

Conclusões

O processo de associação entre moléculas livres de BLG e CUR depende do grau de estruturação da água na camada de solvatação de ambas as moléculas. O custo energético para liberar moléculas de água da camada de solvatação para o volume determina os valores de todos os parâmetros cinéticos de associação ($E_{act,a}^\ddagger$, $\Delta G_a^\ddagger$, $\Delta H_a^\ddagger$ e $T\Delta S_a^\ddagger$). A formação do nanocomplexo $[BLG-CUR]^\circ$ foi promovida pela interação hidrofóbica como evidenciado pelos valores de $\Delta H^\circ > 0$ e $\Delta S^\circ > 0$ e com valores de $K_b = 9,43 \times 10^4 M^{-1}$, a 298,15 K e no pH 7,4. Esse conhecimento termodinâmico e cinético sobre a interação BLG e CUR torna possível modular, alterando o estado termodinâmico, o transportador e a liberação de CUR por BLG.

Agradecimentos

CNPq, CAPES, FINEP, FAPEMIG.

Referências

- ¹Gupta, et. al., *The. APPS. Jour.* **2013**, 15, 195-218.
- ²Paramera, et. al., *Food Chem.* **2011**, 125, 913-922.
- ³Bourassa, et. al., *The Jour. Phy. Chem. B*, 2010, 3348-3354.
- ⁴Liu, et. al., *Immuno.* **2008**, 213, 651-661.
- ⁵Zsila, et. al., *Tetrah. Asy*, **2003**, 14, 2433-2444.
- ⁶Sneharani, et. al., *Jour. Agri. Food. Chem.* **2010**, 11130-11139
- ⁷Li, et. al., *Food. Chem.* **2013**, 141, 1504-1511.
- ⁸Kanakis, et. al., *Jour. Biol. Struc. Dyn.* **2013**, 1455-1466.
- ⁹Hudson, et. al., *Food. Chem.* **2022**, 366, 130612