



Energética de formação de corona proteica devido a interação Lisozima-Nanopartícula de ouro

Ygor R. Guimarães^{1,*}(G), Hauster M. C. De Paula³(PQ), Luciano S. Virtuoso⁴(PQ), Thalles M. Pereira⁴(PG), Yara L. Coelho⁴(PQ), Ana C. S. Pires²(PQ), Luís H. M. Da Silva¹(PQ).

¹ Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Química, Viçosa, Minas Gerais, Brasil; ygor.guimaraes@ufv.br

² Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Viçosa, Minas Gerais, Brasil;

³ Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Ciências da Educação, Santarém, Pará, Brasil;

⁴ Universidade Federal de Alfenas, Instituto de Química, Alfenas, Minas Gerais, Brasil;

RESUMO

A lisozima é uma proteína que apresenta alta estabilidade estrutural com conformação aproximadamente esférica. Ela apresenta propriedades conservantes e, sendo possível, modular suas propriedades pela sua interação com diferentes ligantes. Nesse estudo, é utilizado como ligante a nanopartícula de ouro revestida com polietilenoglicol 2000 g mol⁻¹, a AuNP PEG 2000, com objetivo de avaliar a termodinâmica do processo de formação do complexo. Os resultados mostraram uma alta liberação de energia $-100 \text{ kJ mol}^{-1} \geq \Delta H_{app-int} \geq -55 \times 10^3 \text{ kJ mol}^{-1}$ devida a ocorrência de formação de milhares ligações de hidrogênio. Além disso, foi observado a adsorção de diversos filmes de lisozima na superfície da AuNP através de sucessivas curvas com diferentes mínimos de $\Delta H_{app-int}$. Os altos valores energéticos evidenciam que a medida que aumenta o recobrimento molecular da superfície da AuNP, as interações de ligações de hidrogênio ocorrem de forma cooperativa. Conclui-se que a partir do excesso de energia livre de Gibbs na interface da AuNP, é fornecido energia suficiente para uma mudança conformacional na proteína seguido de sucessivas adsorções de filmes moleculares auto-organizados.

Palavras-chave: Corona proteica, Termodinâmica, Nanopartícula, Proteína, Interação intermolecular.

Introdução

A lisozima (Lyz) é uma proteína encontrada principalmente na clara de ovo de galinha. Destaca-se sobre ela, sua propriedade conservante e, além disso é considerada segura para aplicação em alimentos. Possuindo massa molar de 14,3 kDa, ela apresenta alta estabilidade estrutural com conformação aproximadamente esférica e raio de giro de 1,64 nm. A molécula de lisozima pode ser modificada para apresentar determinadas propriedades, como por exemplo, para atuar como antibiótico natural ou anti-inflamatório (1-2). Com base nisso, analisar sua associação com nanomateriais, especialmente nanopartículas de ouro (AuNP) - que vêm ganhando destaque pela alta bioafinidade e baixa toxicidade – torna-se de fundamental importância pois novas propriedades podem ser obtidas a partir das interações destas nanopartículas (3).

Nesse estudo foi analisado a interação da lisozima com nanopartícula de ouro revestida com polietilenoglicol 2000 g mol⁻¹ (AuNP PEG 2000). Para os estudos termodinâmicos de interação das duas nanoestruturas foram realizados experimentos de nanocalorimetria de titulação isotérmica.

Experimental

O experimento de nanocalorimetria de titulação isotérmica para o estudo de interação entre lisozima e AuNP PEG 2000, foram realizados em um nanocalorímetro de titulação isotérmica (NanoITC), da Calorimetry a 25,0°C.

A técnica de análise é baseada na mistura dos dois componentes. A

dispersão de lisozima a $1,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (Titulante), obtida da Sigma Aldrich, é adicionada na dispersão de AuNP PEG 2000 $1,20 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ (Titulado), fornecida gentilmente pela Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), que está presente em uma cela calorimétrica de volume de 2,0 mL dentro de um ambiente de temperatura controlada. Foram realizadas 7 conjuntos de titulações sequenciais, sendo cada conjunto formado de 24 injeções de dispersões de lisozima nas dispersões de nanopartículas de ouro. A mesma amostra foi titulada no total de 7 vezes consecutivas, sem troca do sistema inicial, de maneira que a cada nova titulação ocorreu no sistema previamente existente. Os experimentos foram realizados em água deionizada, sem controle ou ajuste de pH. Nessa mistura ocorre ruptura e formação de interações intermoleculares que liberam ou absorvem energia na forma de calor que é detectada pelas termopilhas. Esse sinal permite obter um gráfico de potência em função do tempo, através do qual a integração da área do sinal fornece a variação da entalpia observada de interação intermolecular ($\Delta H_{observada-int}$) em função da concentração da lisozima. O $\Delta H_{observada-int}$ inclui os valores interação da Lyz-AuNP PEG 2000 e Lys-Solvente. É descontado o efeito da interação do solvente da dispersão de AuNP com a lisozima realizando-se uma titulação sequencial de lisozima apenas no solvente de dispersão para descontar o valor da interação da lisozima com o solvente obtendo assim a variação da entalpia aparente de interação



intermolecular ($\Delta H_{app-int}$) em função da concentração da lisozima.

Resultados e Discussão

Os resultados apresentados na figura 1 mostra a variação da energia de interação aparente da lisozima com AuNP PEG2000 em função da concentração da proteína. Tradicionalmente, os valores encontrados na literatura para energias aparente de interação NP-Pr são aproximadamente entre 20 kJ mol^{-1} e 55 kJ mol^{-1} . Entretanto, os resultados mostraram uma elevada liberação de energia $-100 \text{ kJ mol}^{-1} \geq \Delta H_{app-int} \geq -55 \times 10^3 \text{ kJ mol}^{-1}$. Esta alta energia pode ser devida à formação do complexo LyZ-AuNP PEG2000 que ocorre através da formação de milhares de ligação de Hidrogênio entre segmentos de aminoácidos de diferentes proteínas adsorvidas na superfície da nanopartícula de ouro.

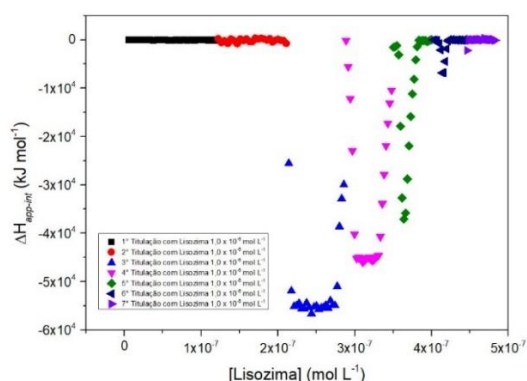


Figura 1. $\Delta H_{app-int}$ Lyz-AuNP em função da concentração da lisozima.

Em baixas concentrações de lisozima, a proteína ao interagir AuNP adsorve na superfície da AuNP sofrendo uma mudança conformacional ao enrolar-se sobre nanopartícula deixando expostos grupos carboxílicos e aminos da proteína permitindo, em seguida, a formação de milhares de ligações de hidrogênio entre segmentos de aminoácidos de diferentes proteínas. Estas interações levam a formação de um filme proteico sobre a superfície da nanopartícula. Esse processo vai ocorrendo sucessivamente liberando cada vez mais energia até que metade dos sítios ativos para formar a ligação de hidrogênio estejam saturados formando assim o mínimo de liberação de energia $\Delta H_{app-int} \approx -55 \times 10^3$.

No entanto, essas interações não encerram neste ponto de mínimo, com novas interações sendo formadas em concentrações superiores ao mínimo indicando a formação de novas camadas de adsorção de proteínas. Sucessivas curvas com diferentes mínimos demonstram a formação de múltiplas camadas da proteína adsorvidas nas superfícies das AuNP formando uma coroa proteica. A subtração dos mínimos consecutivos do $\Delta H_{app-int}$ produziram as seguintes energias: $+9,0 \times 10^3 \text{ kJ mol}^{-1}$, $+5,0 \times 10^3 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $+32 \times 10^3 \text{ kJ mol}^{-1}$. Há questões em aberto acerca de multicamadas formadas na coroa de proteína⁴, portanto estes resultados demonstram que as camadas de filmes poliméricos proteicos diferem em interações intermoleculares com densidades de ligações de

hidrogênios diferentes. Isso ocorre em razão de que camadas proteicas mais externas apresentam menos sítios de interação formados por grupos aminos e carboxílicos.

Esses altos valores energéticos demonstram, e evidenciam, que as interações de ligações de hidrogênio ocorrem de forma cooperativa a medida que aumenta o recobrimento molecular da superfície da AuNP. A interação Lyz-AuNP promove a formação de filmes moleculares auto-organizados de moléculas de proteína ao redor da superfície da nanopartícula de ouro.

Conclusões

O excesso de energia livre de Gibbs presentes na interface da nanopartícula de ouro fornece um campo energético suficiente para a desestruturação conformacional das proteínas e posterior adsorção em filmes moleculares auto-organizados. Este processo ocorre com alta liberação de energia e grande redução entrópica conformacional.

Agradecimentos

Cnpq, Capes, Fapemig;

Referências

1. F. E. Galdino, Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, 2018.
2. B. Bharti; J. Meissner; G. H. Findenegg, *Langmuir* **2011**, 27, 16, 9823–9833.
3. L. Dykmana; N. Khlebtsov, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 2256-228.
4. D. Prozeller; S. Morsbach; K. Landfester. *Nanoscale* 2019, 11, 41. 19265-19273.