

AS INTERAÇÕES ENTRE AS PROTEÍNAS DO ISOLADO PROTEICO DE BARU E CURCUMINA SÃO REGIDAS PELA ENTALPIA

Miyashita¹ N. M. R.; Albuine² M. S.; Lima¹ A. A. S.; Hudson¹ E. A.; Silva² L. H. M.; Pires¹ A. C. S.

¹ Universidade Federal de Viçosa (UFV); Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos / ana.pires@ufv.br

² UFV; Departamento de Química/ luhen@ufv.br

RESUMO

A interação entre as proteínas do isolado proteico de baru (P-IPB) e curcumina (CUR) foi estudada em pH 7,0 e diferentes temperaturas, por espectroscopia de fluorescência. Houve formação de complexos termodinamicamente estáveis, com variação da energia livre de Gibbs padrão média (ΔG_m°) igual a $-22,74 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, indicando que, no equilíbrio termodinâmico, o complexo (P-IPB-CUR) predominou sobre as formas livres das moléculas. Com o aumento da temperatura, o número de complexos P-IPB-CUR formados diminuiu, com as constantes de interação (K_b) variando de $0,14\cdot 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ até $5,67\cdot 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$. A variação de entalpia padrão média foi negativa ($\Delta H_m^\circ = -142,84 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), assim como os valores de variação da entropia padrão média ($T\Delta S_m^\circ$ de $-116,17$ a $-123,89 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) indicando que o processo de formação de complexos P-IPB-CUR é exotérmico e entropicamente desfavorável. Desta forma, as interações hidrofílicas têm um papel importante nesta interação. A redução nos valores entrópicos está associada à redução no grau de liberdade translacional das moléculas do sistema após sua interação. Este trabalho elucidou os mecanismos de interação entre proteínas vegetais (P-IPB) e moléculas bioativas, evidenciando o potencial carreador destes biopolímeros.

INTRODUÇÃO

O baru (*Dipteryx alata* Vog.) é uma leguminosa abundante no Cerrado brasileiro, cuja castanha pode ser explorada através do uso sustentável para o aproveitamento das frações proteicas e lipídicas. A castanha de baru torrada possui em torno de $25,8 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de proteína, $41,9 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de lipídeos e $13,6 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de carboidratos (1). O isolado proteico de baru (IPB) apresenta alto teor de proteína, maior que o teor de proteínas do isolado proteico de soja, de caseína e albumina comerciais (2).

A *Curcuma longa*, conhecida como açafrão-da-índia, é utilizada como tempero, corante e erva medicinal na Ásia, devido às suas propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica, antimicrobiana, antiviral e anticâncer. Dentre seus componentes, a curcumina se destaca como seu principal composto, pertencente ao grupo dos curcuminoides (3). Porém, a curcumina, também chamada diferulometano, apresenta baixa solubilidade em água ($7,9 \text{ mg/L}$) e biodisponibilidade, em razão de sua meia vida curta, de apenas 30-45 minutos (4).

A formação de complexos com proteínas animais (caseína micelar, caseínas, albumina do soro bovino, lisozima, β -lactoglobulina, entre outras) vêm sendo extensamente estudada como forma de contornar os obstáculos supracitados para aplicação da curcumina (5-7). Entretanto, a demanda por proteínas de origem vegetal é

crecente, devido a diversos fatores. Com essa mudança, surgem muitos desafios, como manter a qualidade nutricional dos alimentos, portanto, é importante conhecer as interações específicas entre as proteínas vegetais e compostos bioativos, para uma aplicação bem sucedida destas proteínas carreadoras de moléculas bioativas (8).

Estudos sobre a termodinâmica de interação entre curcumina e diferentes tipos de isolado proteico (de ervilha, de soro e de soja) demonstraram que complexos proteicos bioativos são formados predominantemente por interações hidrofóbicas. Desta forma, é importante que diferentes proteínas vegetais sejam estudadas, principalmente, as fontes nativas, incentivando e valorizando os frutos brasileiros, como o baru, que possui alto teor proteico, sendo suas proteínas potenciais carreadoras de moléculas bioativas, assim como as proteínas animais e de soja.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi determinar, por meio da técnica de espectroscopia de fluorescência, os parâmetros termodinâmicos médios de formação de complexo entre as P-IPB e a CUR, em diferentes temperaturas (entre 20 e 40 °C), e em pH 7,0.

MATERIAIS E MÉTODOS

O IPB foi obtido da castanha de baru, por meio do método de extração de proteínas por mudança de pH (2). Curcumina (CUR) (pureza >80%) foi obtida da empresa Sigma-Aldrich (USA), etanol (p.a.), ácido clorídrico (37% p.a.) e hidróxido de sódio (p.a.) foram obtidos da empresa Alphatec (Brasil).

Os experimentos de fluorescência foram realizados em pH 7,0 utilizando um espectrofluorímetro da marca PerkinElmer, modelo LS 55. As P-IPB foram solubilizadas pelo método de mudança de pH, para obtenção de uma solução na concentração $2,7 \times 10^{-4} \text{ g.mL}^{-1}$ (9). Soluções estoque de CUR foram preparadas na concentração de $2,4 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ a partir da solução estoque contendo as proteínas e 3% de etanol. Os experimentos foram realizados com a concentração de CUR variando de 0 a $6,35 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ e concentração de proteínas constante. As dispersões de proteínas foram excitadas no comprimento de onda de 295 nm e os espectros de emissão de fluorescência emitidos no intervalo de 300 a 550 nm. As análises foram realizadas nas temperaturas de 20, 25, 30, 35 e 40 °C, em duplicata.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Devido à presença de aminoácidos fluoróforos (triptofano, tirosina e fenilalanina) nas proteínas da castanha de baru, o IPB emite fluorescência. Observou-se que a intensidade de fluorescência das P-IPB diminuiu com a adição concentrações crescentes de CUR. A Figura 1 mostra o espectro de emissão de fluorescência das P-IPB com o aumento da concentração de curcumina, a 25 °C.

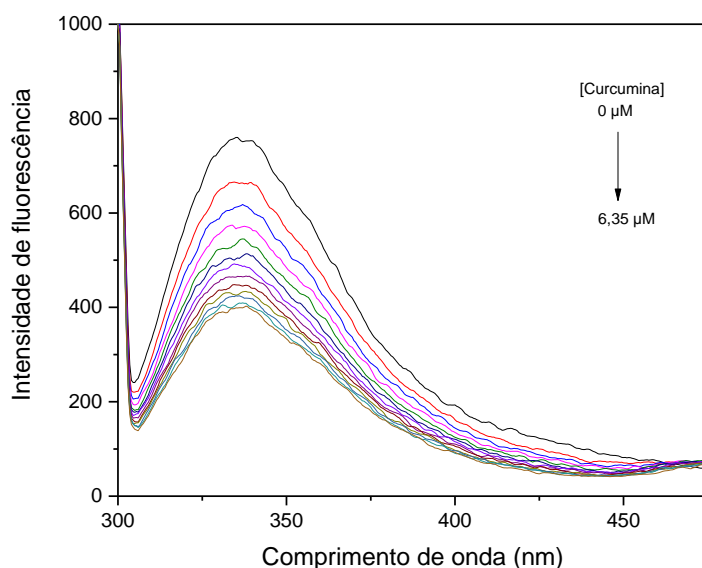


Figura 1- Espectro de emissão de fluorescência para o sistema P-IPB-CUR, em pH 7,0, 25 °C.

As P-IPB emitiram fluorescência em comprimento de onda máximo de 337,5 nm e, apesar de a fluorescência emitida ter reduzido com o aumento da concentração da CUR, não houve deslocamento no comprimento de onda de emissão máxima, indicando que não houve alteração conformacional das P-IPB detectável pela técnica utilizada. A supressão da fluorescência ocorreu por meio de mecanismos de extinção estáticos, pois os valores da constante de Stern-Volmer (K_{SV}), Tabela 1, diminuíram com o aumento da temperatura, isto significa que a supressão da fluorescência ocorreu devido à formação de complexos entre as P-IPB e CUR (10).

Tabela1- Parâmetros termodinâmicos de formação de complexo entre P-IPB e CUR, em pH 7,0.

Temperatura (°C)	K_{SV} (10^5 L.mol ⁻¹)	R^2	K_b (10^4 L.mol ⁻¹)	R^2	n	ΔG (kJ mol ⁻¹)	ΔH (kJ.mol ⁻¹)	R^2	T ΔS (kJ.mol ⁻¹)
20	1,68	0,99	5,67	0,99	0,89	-26,68		0,99	-116,17
25	1,42	0,99	2,53	0,99	0,84	-25,13			-117,71
30	0,65	0,99	0,66	0,99	0,80	-22,15	-142,84		-120,69
35	0,77	0,97	0,34	0,99	0,74	-20,81			-122,04
40	0,62	0,97	0,14	0,99	0,69	-18,95			-123,89

A constante de interação média (K_b) e a estequiometria de formação de complexo média (n) foram determinadas por meio da equação de Stern-Volmer modificada. Os parâmetros termodinâmicos médios (variação de entalpia padrão (ΔH°_m), variação da entropia padrão (T ΔS°_m) e variação de energia livre de Gibbs padrão (ΔG°_m) de formação de complexo entre as P-IPB e CUR foram calculados a partir da abordagem de van't Hoff e da relação fundamental de Gibbs (11).

Os valores de K_b , n, ΔG° , ΔH° e T ΔS° para as diversas temperaturas estudadas são apresentados na Tabela 1. Os valores de n diminuíram com o aumento da temperatura,

por exemplo, a 25 °C há uma CUR para cada P-IPB, enquanto, em 40 °C, duas proteínas se agregaram ao redor de uma CUR. Os valores de K_b foram da ordem de $10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ e diminuíram com o aumento da temperatura, o que indica que os complexos formados são menos estáveis em temperaturas mais elevadas, com redução de 97,5% no número de complexos formados.

Os valores de ΔG° foram negativos em todas as temperaturas estudadas ($\Delta G^\circ_{\text{médio}} = -22,74 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), demonstrando que o equilíbrio favoreceu a formação de complexos em relação às moléculas livres. Os valores negativos ΔH°_m e de $T\Delta S^\circ_m$ evidenciaram que a interação entre as P-IPB e a CUR é dirigida entalpicamente. A negatividade atribuída à ΔH°_m indica que a energia liberada devido às interações para formação de complexo entre P-IPB e a CUR ($\Delta H_{\text{P-IPB-CURC}} < 0$) somada com a energia liberada devido às interações entre moléculas de água liberadas da dessolvatação de ambos os reagentes ($\Delta H_{\text{H}_2\text{O-H}_2\text{O}} < 0$) superou a energia gasta no processo de dessolvatação das moléculas de proteína e CUR do sistema ($\Delta H_{\text{DES-IPB}} > 0$ e $\Delta H_{\text{DES-CURC}} > 0$) (12). A diminuição dos valores de $T\Delta S^\circ_m$ está associada principalmente a uma redução no grau de liberdade translacional das moléculas de P-IPB e CUR, o que corrobora com os resultados de n encontrados, que sugerem agregação de duas proteínas com uma molécula de CUR.

CONCLUSÃO

As P-IPB e CUR formam complexos termodinamicamente estáveis em pH 7,0. A formação destes complexos é entalpicamente dirigida, com as interações hidrofílicas exercendo um papel fundamental. A temperatura é um fator importante na formação e na estequiometria dos complexos. Este trabalho elucidou os mecanismos de formação de complexo entre P-IPB e CUR, demonstrando o potencial que proteínas de origem vegetal pouco exploradas têm como carreadores de moléculas bioativas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES, ao CNPq e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Lima D.; Alves M. R.; Nogueira N.; Nascimento R. D. P.; A review on Brazilian baru plant (*Dipteryx alata* Vogel): morphology, chemical composition, health effects, and technological potential. **Future Foods**. v. 5, n. 1, p. 100146, 2022;
2. Nunes A.; Favaro S. P.; Miranda C. H. B.; Neves V. A.; Preparation and characterization of baru (*Dipteryx alata* Vogel) nut protein isolate and comparison of its physico-chemical properties with commercial animal and plant protein isolates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 97, n. 1, p. 151-157, 2017.
3. Pu C.; Tang W.; Li X.; Li M.; Sun Q.; Stability enhancement efficiency of surface decoration on curcumin-loaded liposomes: Comparison of guar gum and its cationic counterpart. **Food Hydrocolloids**. v.87, n. 1, p. 27-37, 2019.
4. Sanphui P.; Bolla G.; Curcumin, a Biological Wonder Molecule: A Crystal Engineering Point of View. **Crystal Growth & Design**. v.18, n. 1, p.5690–5711, 2018.
5. Huang W.; Wang L.; Wei Y.; Cao M.; Xie H.; Wu D.; Fabrication of lysozyme/ κ -carrageenan complex nanoparticles as a novel carrier to enhance the stability and in vitro release of curcumin. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.146, n. 1, p. 444–452, 2020.
6. Nadi M. M.; Ashrafi K. M. R.; Mansouri K.; Ghadami S.A.; Amani M.; Ghobadi S.; Comparative

- Spectroscopic Studies on Curcumin Stabilization by Association to Bovine Serum Albumin and Casein: A Perspective on Drug-Delivery Application. **International Journal of Food Properties**. v.18, n. 3, p. 638–659, 2020.
7. Hudson E. A.; De Paula H. M. C.; da Silva R. M.; Pires A. C. S; da Silva L. H. M.; Curcumin micellar-casein multisite interactions elucidated by surface plasmon resonance. **International Journal of Biological Macromolecules** v.133, n. 1, p. 860–866, 2019.
 8. Rezende J. P.; De Paula H. M. C.; Freitas T. D.; Coelho Y. L.; Da Silva L. H. M.; Pires A. C. S. Application of Congo red dye as a molecular probe to investigate the kinetics and thermodynamics of the formation processes of arachin and conarachin nanocomplexes. **Food Chemistry**. v.384, n 1, p. 132485, 2022.
 9. Kannamangalam V.U.; Shah N. N.; Muley A. B.; Singhal R. S. Complexation of curcumin using proteins to enhance aqueous solubility and bioaccessibility: Pea protein vis-à-vis whey protein. **Journal of Food Engineering**.v. 292, n. 1, p.110258, 2021.
 10. Lelis C. A.; Ferreira G. M. D.; Ferreira G. M. D.; Hespanhol M. C.; Pinto M. S.; Silva L. H. M. Determination of driving forces for bovine serum albumin-Ponceau4R binding using surface plasmon resonance and fluorescence spectroscopy : A comparative study. **Food Hydrocolloids**. v.70, n.1, p.29–35, 2018.
 11. Lelis C. A.; Hudson E. A.; Ferreira G. M. D.; Ferreira G. M. D.; Silva L. H. M., Silva M. C. H.; Binding thermodynamics of synthetic dye Allura Red with bovine serum albumin. **Food Chemistry**.v. 217, n.1, p. 52–58, 2018.
 12. Rezende J. P.; Hudson E. A.; De Paula H. M. C.; Meinel R. S.; Da Silva A. D.; Da Silva L. H. M. Human serum albumin-resveratrol complex formation: Effect of the phenolic chemical structure on the kinetic and thermodynamic parameters of the interactions. **Food Chemistry** v.307, n.1, p. 125514, 2020.