

**JÉSSYKA EMMILLE SOARES DA CUNHA SECUNDINO**

**CASEÍNA MICELAR E NANOPARTÍCULAS DE OURO: TERMODINÂMICA DE  
FORMAÇÃO DE NANOCOMPLEXOS ORGÂNICO-INORGÂNICO**

Monografia apresentada ao Departamento de  
Química da Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências para a conclusão do  
Curso de Bacharelado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Mendes da  
Silva

**VIÇOSA – MINAS GERAIS  
2024**

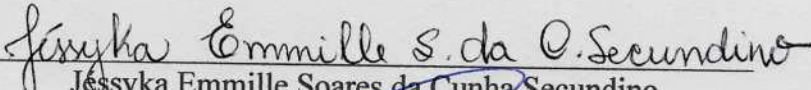
**JÉSSYKA EMMILLE SOARES DA CUNHA SECUNDINO**

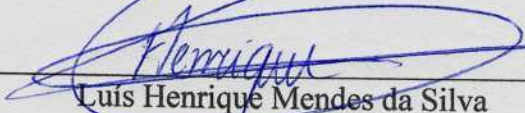
**CASEÍNA MICELAR E NANOPARTÍCULAS DE OURO: TERMODINÂMICA E  
CINÉTICA DE FORMAÇÃO DE NANOCOMPLEXOS ORGÂNICO-INORGÂNICO**

Monografia apresentada ao Departamento de  
Química da Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências para a conclusão do  
Curso de Bacharelado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Mendes da  
Silva

APROVADO: 12, SETEMBRO, 2024

  
\_\_\_\_\_  
Jessyka Emmille Soares da Cunha Secundino  
(Autora)

  
\_\_\_\_\_  
Luis Henrique Mendes da Silva  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem Ele eu não teria chegado até aqui. Por todas as vezes Ele se mostrou fiel em tudo e permitiu que o meu sonho fosse o mesmo que o Dele.

À minha família e agregados por sempre me apoiar em todas as minhas decisões, não importa o que aconteça, que confiaram em mim mesmo eu embarcando nessa jornada árdua de segunda graduação e longe de casa por mais um tempo.

A todos os meus amigos de longa data, que são muitos, tanto da UFV quanto fora dela. Foram companheiros essenciais que puderam me dar força quando eu não tive.

Ao meu orientador Luis Henrique pela confiança, incentivo e ensinamentos. Também aos meus companheiros de laboratório tanto do grupo QUIVECOM quanto do GAES que sempre foram muito legais comigo.

Aos professores da UFV, não só do DEQ, que tornaram amigos e sempre torceram por mim. Eles me ajudaram a chegar até aqui e que me deram a esperança de que ainda podemos encontrar bons docentes durante a vida acadêmica.

E por fim, às meninas da República Havaianas pelo companheirismo durante todos esses anos.

Obrigada!

*"Rendam graças ao Senhor, pois Ele é bom; o seu amor dura para sempre. Bendito seja o Senhor, o Deus de Israel, de eternidade a eternidade."  
(1 Crônicas 16:34 e 36a)*

## RESUMO

SECUNDINO, Jéssyka Emmille Soares da Cunha, projeto de conclusão do Curso de Bacharelado em Química. Universidade Federal de Viçosa, setembro, 2024. Termodinâmica e Cinética de formação de Nanocomplexos Orgânico-Inorgânico. Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Mendes da Silva. viçosa

As nanopartículas metálicas (NP) têm aplicações diversas, mas como sua biocompatibilidade é limitada, pesquisas buscam modificações para melhorar essa característica. As caseínas micelares, biocompatíveis, podem transportar nanopartículas no meio biológico, evitando perdas funcionais tanto das estruturas das NP quanto da própria caseína. O presente trabalho permitiu entender como a complexação proteína-nanopartícula ocorre, estudando as energias das interações intermoleculares entre a caseína micelar e as nanopartículas de ouro (AuNP). As nanopartículas foram recobertas com estabilizadores de citrato e PEO de diferentes tamanhos. Para determinar a variação de entalpia padrão dessas interações, foi usada a técnica de nano calorimetria de titulação isotérmica (ITC). O instrumento aplica várias injeções de pequenos volumes de uma solução de nanopartícula (titulante) sobre o sistema contendo uma dispersão de caseína micelar (titulado), medindo a energia de interação entre as duas espécies a cada injeção. Portanto, foi possível a compreensão e modulação do processo de interação nanopartícula-caseína micelar, a partir de uma análise de gráficos feitos no programa Origin. Tanto o complexo CM-AuNP-Citrato quanto o CM-AuNP-PEG800 apresentaram uma alta energia exotérmica, no entanto, foi observado que as moléculas que recobrem as nanopartículas afetam a energia de interação. Isso significa que houve diferenças no valor de energia ( $\Delta H_{\text{apa-int}}$ ) e na concentração de nanopartículas de um complexo em relação ao outro, devido às moléculas de revestimento das partículas (citrato e PEG800).

*Palavras-chaves:* nanopartículas, caseína, proteínas, nano calorimetria, entalpia padrão.

## SUMÁRIO

|                  |   |                                      |
|------------------|---|--------------------------------------|
| <b><u>1.</u></b> | <b><u>Introdução.....</u></b>   | <b><u>7</u></b>                      |
| <b><u>2.</u></b> | <b><u>Revisão de literatura .....</u></b>                                     | <b><u>8</u></b>                      |
| 2. 1.            | Caseína Micelar .....   | 8                                    |
| 2. 2.            | Nanopartículas metálicas.....   | 9                                    |
| 2. 3.            | Calorímetro de titulação isotérmica (ITC) .....                               | 12                                   |
| 2.3.1.           | Parâmetros termodinâmicos .....   | 12                                   |
| <b><u>3.</u></b> | <b><u>Materiais e Métodos .....</u></b>                                       | <b><u>13</u></b>                     |
| 3. 1.            | Materiais .....   | 13                                   |
| 3.1.1.           | Reagentes e Soluções .....  | 13                                   |
| 3.1.2.           | Calorímetro de titulação isotérmica (ITC) .....                               | 13                                   |
| 3. 2.            | Métodos .....   | 13                                   |
| 3.2.1.           | Caseína Micelar (CM).....   | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| 3.2.2.           | Preparo da solução de nanopartículas de Au recobertas com PEO e citrato ..... | 13                                   |
| <b><u>4.</u></b> | <b><u>Resultados e discussão .....</u></b>                                    | <b><u>14</u></b>                     |
| <b><u>5.</u></b> | <b><u>Conclusão .....</u></b>   | <b><u>17</u></b>                     |
| <b><u>6.</u></b> | <b><u>Perspectivas .....</u></b>  | <b><u>17</u></b>                     |
| <b><u>7.</u></b> | <b><u>Referências.....</u></b>  | <b><u>18</u></b>                     |

## 1. Introdução

As proteínas desempenham inúmeras funções biológicas em organismos multicelulares por meio de interações que possuem finalidades específicas. Os mecanismos de interação das proteínas podem ser lineares ou não lineares, rearranjos intra e intermoleculares, e ocorrem sob condições específicas, como pH e temperatura. No entanto, os detalhes de algumas interações e seus mecanismos ainda não são completamente compreendidos no contexto celular. Sabe-se que as interações entre proteínas e outras moléculas desempenham um papel fundamental nesse processo de compreensão. Entre os aspectos investigados está o comportamento físico-químico, tanto cinético quanto termodinâmico, dessas interações, o que pode contribuir para a compreensão dos processos envolvidos [1].

Uma espécie que interage com proteínas em organismos são as nanopartículas metálicas (NPs). Essas nanopartículas são amplamente utilizadas nos contextos farmacêutico, médico e cosmético, embora não sejam biocompatíveis. Biocompatibilidade refere-se à capacidade de uma substância de induzir uma resposta adequada do organismo, ou seja, causar o efeito esperado de uma aplicação específica, sem provocar efeitos adversos significativos. Quando introduzidas em sistemas biológicos, as NPs interagem com diversas biomoléculas, formando coronas proteicas que controlam o destino geral dessas nanopartículas no organismo. Essa interação modifica suas propriedades, afetando tanto a eficácia das NPs quanto das proteínas [2]. Esse processo pode levar a uma “resposta imunológica” que obstrui a superfície de ligação das nanopartículas, provocando perda de função, perturbações estruturais ou conformacionais, o que dificulta o reconhecimento específico da superfície [2,3]. As proteínas aderidas às NPs podem sofrer rearranjos estruturais, expondo seus sítios de ligação para anticorpos, o que pode tornar as nanopartículas tóxicas [2]. As coronas proteicas geralmente resultam da tentativa de minimizar a energia livre de Gibbs de superfície e de transformar as características físico-químicas das nanopartículas [2,4]. Dentre os vários processos pesquisados para tornar as NPs biocompatíveis, destaca-se a formação de complexos com outras proteínas.

A caseína micelar é um complexo proteico presente no leite como partículas coloidais e é pode ser considerada no processo de complexação com NPs. Essa estrutura é um nanoagregado de milhares de moléculas proteicas que fornecem distintos sítios ativos para o reconhecimento e interação com nanopartículas, além de serem biocompatíveis com a maioria dos organismos. Embora ainda não exista uma imagem clara e consensual da estrutura da caseína micelar, diversas pesquisas têm investigado sua organização, por exemplo pode ser citada uma que utiliza técnicas de espalhamento de luz (SANS/SAXS) [5].

Dado o grande número de tipos de proteínas e ligantes, o presente trabalho estudou a físico-química de formação de nanocomplexos orgânico-inorgânicos entre a caseína micelar, proveniente do leite bovino, e nanopartículas de ouro, utilizando o calorímetro de titulação isotérmica (ITC). O ITC é um instrumento na área da calorimetria de alta sensibilidade. Este método permite a obtenção de valores precisos da variação de entalpia na maioria dos processos bimoleculares, além de determinar a constante de equilíbrio ( $K_b$ ) juntamente com outros instrumentos, e as variações de energia livre e entropia sob condições definidas [1]. Nesse estudo, o ITC medirá a mudança de calor causada pela interação da proteína com a nanopartícula. Devido à sua elevada sensibilidade, o ITC pode detectar interações de baixa energia, permitindo estimar o tamanho e as características termodinâmicas das regiões interfaciais de ligação. Alterações estruturais e conformacionais nas proteínas após a interação podem ser identificadas por meio do ITC, especialmente quando combinadas com outros métodos analíticos [2].

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi realizar uma análise qualitativa do processo de interação entre a caseína micelar e as nanopartículas de ouro (AuNP) recobertas de citrato e PEG800 ou PEO800 (polietilenoglicol 800 g mol<sup>-1</sup>). Utilizando gráficos obtidos do Origin®, foi investigado o processo de interação entre caseína micelar e nanopartícula, com medições realizadas por meio da técnica de ITC.

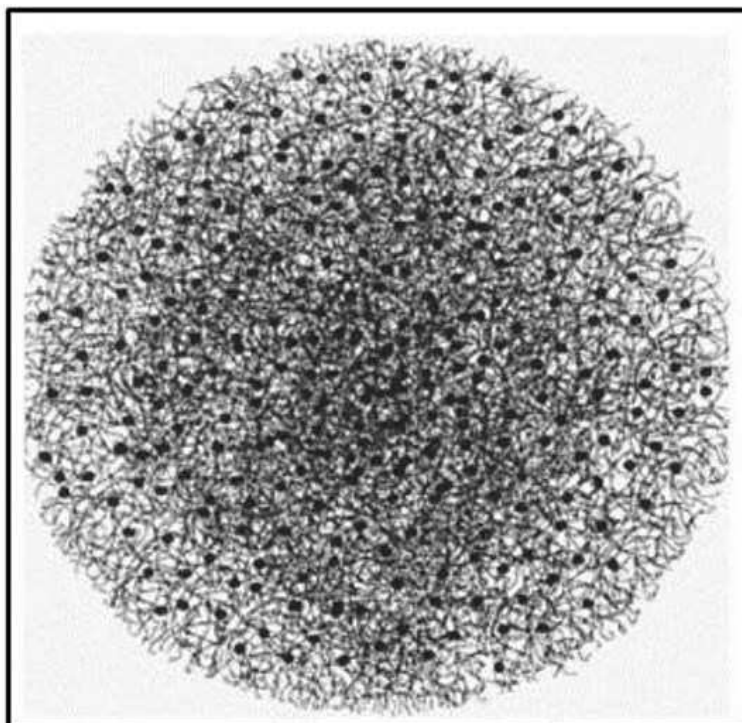
## **2. Revisão de literatura**

### ***2.1. Caseína Micelar***

As caseínas representam 80% do total de proteínas do leite [6]. Esse agregado proteico pode ser obtido tanto da precipitação isoelétrica a um pH de 4,6 quanto da microfiltração do leite, e é considerada uma proteína sem estruturas secundárias específicas. A caseína do leite de vaca possui, na sua composição, 93% de sua massa seca composta de quatro frações de caseínas:  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - e K-caseínas, caracterizadas como fosfoproteínas, com razão molar de 4:1:4:1 aproximadamente [5,7,8]. Os 7% restantes consistem em material inorgânico, como o fosfato de cálcio coloidal (CCP) [5,8]. A caseína micelar (CM) está estruturada em micelas estáveis, mantidas unidas por meio de interações hidrofóbicas e pela ligação de fosfato de cálcio coloidal, mantendo a integridade micelar [8].

A organização da estrutura da caseína micelar ainda não é unanimemente definida, no entanto, possuem uma forte tendência a se auto montar em micelas esféricas (figura 1): internamente há as frações  $\alpha_{s1}$ - e  $\beta$ -caseína que representam 70% do peso total seco e, dentre elas, a  $\beta$ -caseína é a mais hidrofóbica. Já a  $\alpha_{s2}$ -caseína constitui apenas 10% da caseína total e

também está mais internamente, enquanto a K-caseína, mais hidrofílica, a aproximadamente 12% da massa, se concentra externamente promovendo uma estabilização estérica e eletrostática à CM [6,8].



**Figura 1.** Modelo de estrutura da caseína micelar, elaborado por De Kruif e Holt (2003), que define a estabilização da  $\beta$ -caseína devido à ligação com os nanoclusters de fosfato de cálcio coloidal (CCP) (pontos escuros). Esta estrutura permite a formação interna de nanoaglomerados de tamanhos limitados que induzem mais ligações entre as outras fosfoproteínas e CCP (interações hidrofóbicas). A K-caseína, hidrofílica, se concentra na superfície [8].

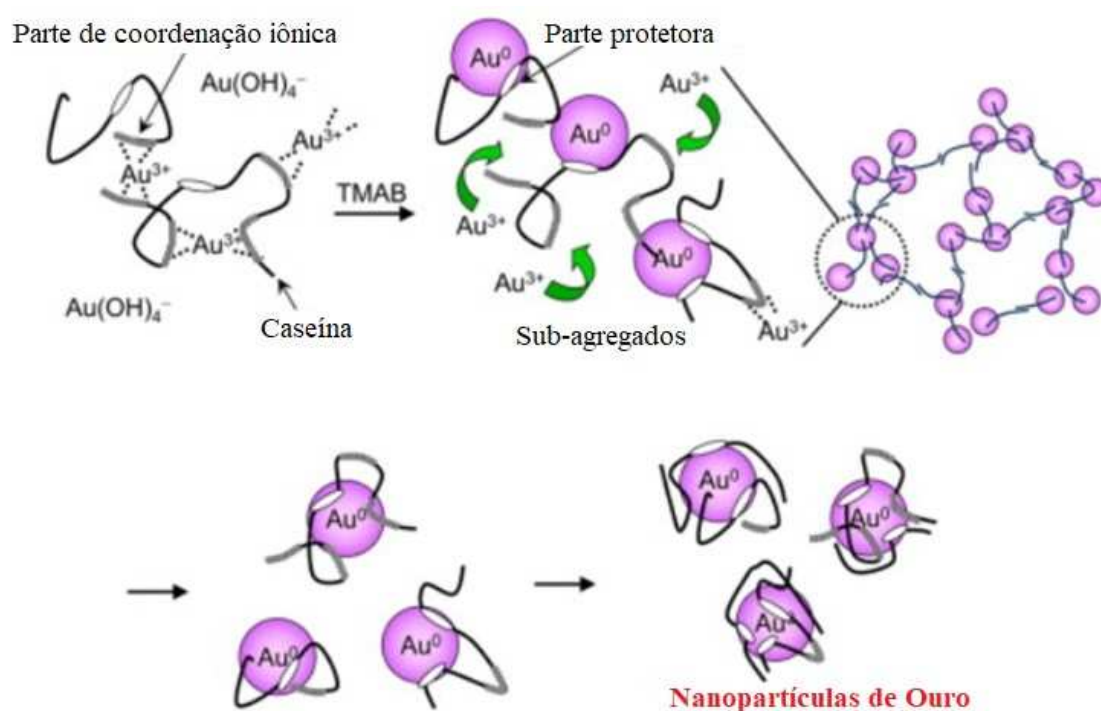
## 2.2. *Nanopartículas metálicas*

As nanopartículas metálicas (NP), em especial as de ouro, possuem propriedades optoeletrônicas e compatibilidade com uma variedade de moléculas bioativas. Devido a isto, possuem uma ampla gama de aplicações: catalíticas quando associadas em reações com óxidos metálicos e reações orgânicas, detecção de biomoléculas juntamente com a técnica de ressonância plasmônica de superfície, diagnósticos moleculares, bioengenharia, etc. A combinação com moléculas biológicas proporciona tanto a estabilidade das NPs quanto a introdução delas no meio biológico, trazendo funcionalidades diversas [9,10]. Isso se deve à alta relação entre a área de superfície/volume total e à alta energia de superfície, permitindo uma forte adsorção de biomoléculas [11].

Em alguns processos de obtenção de nanopartículas, as caseínas são utilizadas para que interajam e os resultados foram analisados por espectroscopia UV-vis. Nesse contexto, as NPs

devem ser carregadas negativamente e dispersas em solução aquosa com um pH maior que o ponto isoelétrico das proteínas de caseína (4,6), devido às repulsões eletrostáticas entre as nanopartículas. As caseínas ( $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - e  $\kappa$ -) interagem com as superfícies de ouro com seus 20 aminoácidos. Elas adsorvem fortemente na superfície do metal por meio de múltiplas ligações entre o ouro e grupos funcionais que possuem enxofre, o grupo amino e o grupo hidroxila. As NPs obtidas, portanto, são altamente estáveis e não agregadas tanto em solução aquosa quanto na forma de pó seco [9].

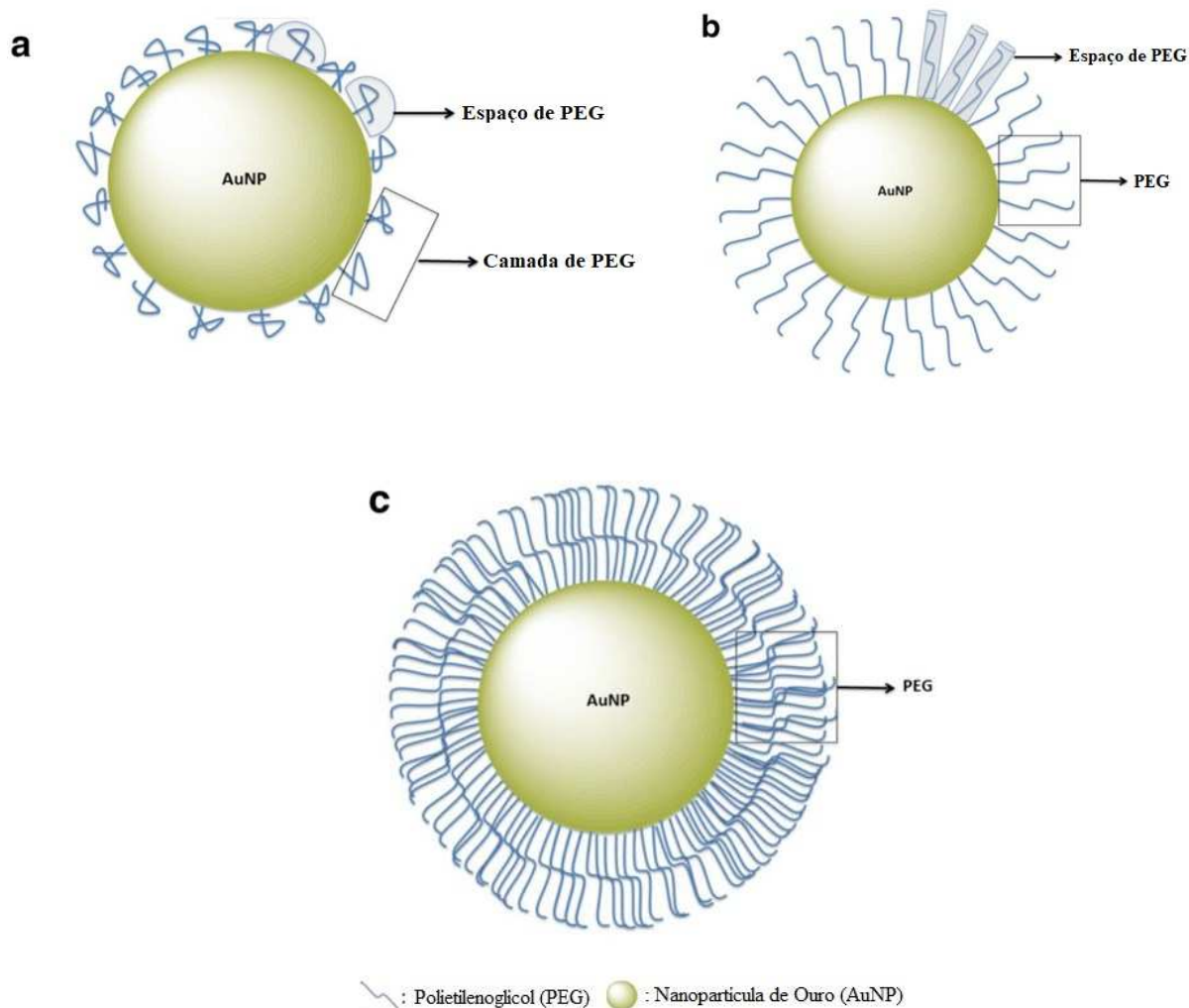
Na figura 2 é mostrado o provável mecanismo na produção de AuNP utilizando a caseína e como a interação ocorre entre as duas espécies. A  $\kappa$ -caseína, a fração mais externa do complexo proteico, se coordena à parte metálica das nanopartículas. O ouro é reduzido pelo brometo de tetrametilamônio (TMAB) e as caseínas atuam como proteção para as AuNPs. Portanto, as caseínas englobam as nanopartículas e são montadas em submicelas, um nível primário de agregados [9].



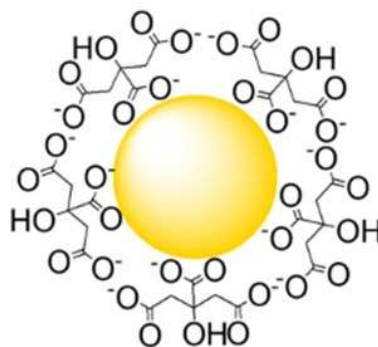
**Figura 2.** Mecanismo provável da formação de complexos entre AuNP's e caseínas [9].

As nanopartículas podem ser revestidas de moléculas de diferentes massas moleculares, como o polietilenoglicol (PEG) que pode ter tamanhos diferentes (800, 2000, 6000  $g\ mol^{-1}$ , etc). As moléculas que atuam como revestimentos, como PEG (Figura 3) e citrato (Figura 4), possibilitam às NPs maior estabilidade, menor possibilidade de agregação entre nanopartículas, menor toxicidade e melhor geração de imagens. No contexto medicinal, as AuNP-PEG podem ser aplicadas para tratamento terapêutico de câncer, pois essas nanopartículas revestidas

possuem uma vida útil prolongada e sua eliminação no organismo é desacelerada, por possuírem menor interação com proteínas do sangue [12].



**Figura 3.** Nanopartículas de ouro recobertas de PEG em diferentes tamanhos e quantidades adsorvidos na superfície metálica. As conformações são denominadas: (a) “cogumelo”; (b) “escova” e (c) “escova densa” [12].

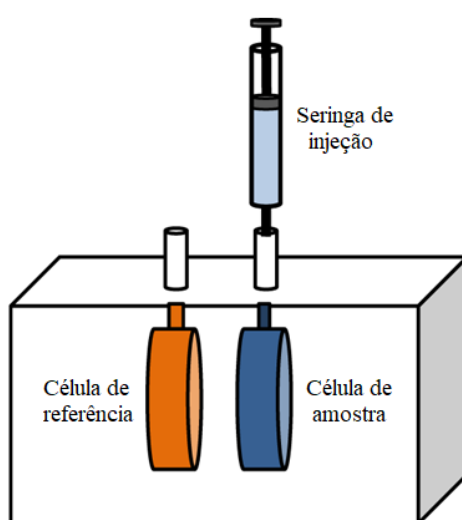


#### AuNPs Citrato

**Figura 4.** Nanopartícula de ouro revestida de citrato, uma outra molécula que promove estabilidade à NP [13].

### 2.3. Calorímetro de titulação isotérmica (ITC)

A instrumentação consiste em um sistema de células (Figura 5), uma de amostra e a outra de referência, compostas por “torres” feitas de material metálico, com propriedades físicas idênticas e de material inerte, mantidas a temperatura constante (22°C). Na célula de referência é contida uma das espécies de interesse (titulado), no entanto não exerce nenhuma função da titulação, pois é tida como referência nas medições da variação da energia. Na célula de amostra conterá o titulante e é onde ocorrerá a reação entre as duas espécies de interesse [1]. O titulante, portanto, é inserido sobre o titulado por injeções automatizadas, de acordo com os parâmetros previamente determinados no software: número de injeções e volume ( $\mu\text{L}$ ).



**Figura 5.** Esquema simplificado do sistema interno do ITC (fonte: CMI - Center for Macromolecular Interactions – Harvard University. MODIFICADO).

#### 2.3.1. Parâmetros termodinâmicos

A medição do instrumento é refletida nos valores da entalpia observada ( $\Delta H_{\text{obs}}$ ). O valor de  $\Delta H_{\text{obs}}$  inclui várias contribuições associadas às alterações conformacionais e de ligação, definidas como de ionização ( $\Delta H_{\text{ion}}$ ) e de interação ( $\Delta H_{\text{int}}$ ), respectivamente [1]. Dessa forma,

$$\Delta H_{\text{obs}} = \Delta H_{\text{apa-int}} + \Delta H_{\text{dil}} \quad (1)$$

$$\Delta H_{\text{apa-int}} = \Delta H_{\text{obs}} - \Delta H_{\text{dil}}$$

No entanto, as variações nos valores de  $\Delta H_{\text{obs}}$  não estão associados somente às interações entre ligante e proteína na interface de ligação, como também envolvem os efeitos de solvente (diluição) e das interações nos estados livre e ligado. Em um sistema onde não há alteração de pH que altere significativamente os valores de  $\Delta H_{\text{obs}}$ , então a Equação (1) ficará da seguinte forma [1]:

$$\Delta H_{\text{obs}} = \Delta H_{\text{int}}$$

Em sistemas onde a energia de diluição das nanopartículas é consideravelmente pequena em comparação com as energias de interação, logo pode ser escrito como variação da entalpia aparente de interação ( $\Delta H_{\text{apa-int}}$ ):

$$\Delta H_{\text{int}} = \Delta H_{\text{apa-int}} \quad (2)$$

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. *Materiais***

##### *3.1.1. Reagentes e Soluções*

Os reagentes que foram utilizados são uma dispersão de caseína micelar previamente extraída do leite bovino, com concentração de 0,05 a 1% m/m e solução de nanopartícula de Au (AuNP) recobertas com PEO e citrato, com concentrações entre  $10^{-10}$  e  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. Todas as soluções e dispersão foram preparadas com água deionizada do sistema Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore, Bedford, MA, EUA). As nanopartículas foram sintetizadas previamente e a caseína foi extraída por uma extração líquido-líquido. As nanopartículas e a caseína foram obtidas de laboratórios externos ao Departamento de Química. A síntese de nanopartículas e o processo de extração de caseína não serão explorados neste trabalho, por motivos de processo de patenteamento e não ser o objetivo deste trabalho.

#### **3.2. *Métodos***

##### *3.2.1. Calorímetro de titulação isotérmica (ITC)*

Um ITC da marca Hard Scientific (USA) modelo 6210 foi utilizado neste trabalho. O titulado (caseína) foi previamente inserido com um volume de 1,8 mL e concentração definida na torre de referência. O titulante (AuNP) foi inserido em uma seringa com um volume de 240  $\mu$ L e fixado no motor de passo para 24 injeções automáticas sobre o titulado, em volumes de 10  $\mu$ L. Os parâmetros como tempo de início das injeções (300 s), intervalo entre cada injeção (1400 s), número de injeções e volume de cada foi definido previamente no software “4200 ITCRun”.

##### *3.2.2. Preparo da solução de nanopartículas de Au recobertas com PEO e citrato*

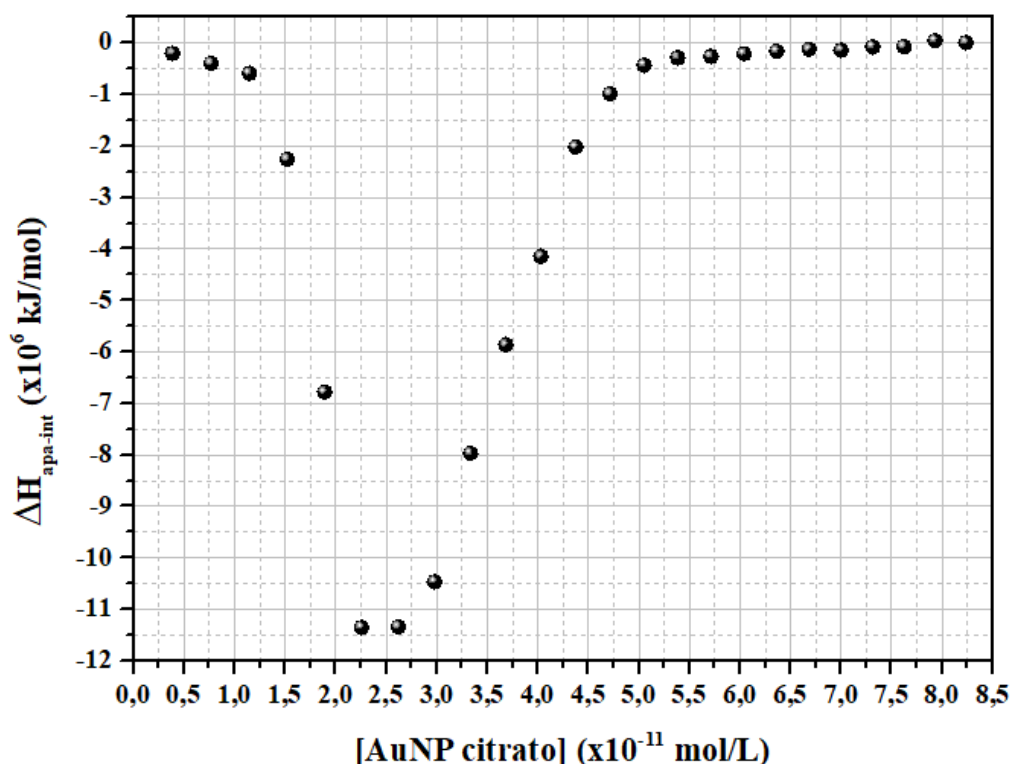
As soluções de AuNP, seja PEG ou Citrato, foram obtidas a partir de uma diluição de outra solução com concentração de  $2,5 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, nomeada estoque.

## 4. Resultados e discussão

Os resultados a seguir se referem à interação da caseína com dois tipos de AuNP: recobertas com citrato (Figura 6) e PEG 800 (polietilenoglicol 800 g mol<sup>-1</sup>) (Figura 7). O eixo vertical de cada gráfico corresponde às energias detectadas pelo ITC, a entalpia de interação ( $\Delta H_{\text{apa-int}}$ ), enquanto o eixo horizontal corresponde às concentrações de nanopartícula que aumentam à medida que é inserida no sistema com a caseína.

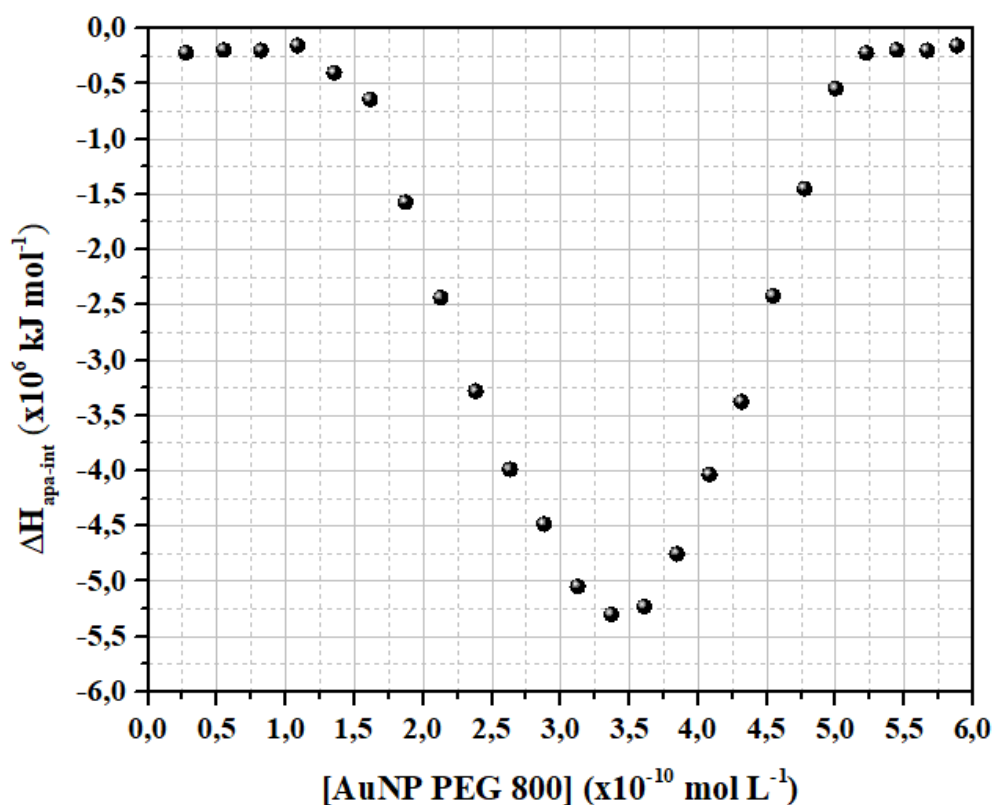
As energias envolvidas em  $\Delta H_{\text{obs}}$  incluem-se a energia de diluição das AuNP's (que se deriva da interação nanopartícula-nanopartícula) e a energia do complexo caseína-nanopartícula. No entanto, a energia de diluição das nanopartículas na água deionizada é uma muito pequena em comparação com a energia de interação entre a caseína e a AuNP (equação 2). Com isso, os valores expressos podem ser em  $\Delta H_{\text{apa-int}}$ , o que seria a energia que engloba a energia da interação de ambas as espécies e da mudança de conformação da própria proteína.

Observa-se no gráfico do complexo CM-AuNP-Citrato (Figura 6) que nas primeiras injeções a energia de aparente de interação é exotérmica e alta, em comparação a uma reação química entre moléculas mais simples (300-500 kJ mol<sup>-1</sup>). À medida que o número de injeções aumenta e, conseqüentemente a concentração de nanopartícula aumenta no sistema, essa energia diminui atingindo um valor mínimo de aproximadamente  $-1,13 \times 10^7$  kJ mol<sup>-1</sup>. A concentração de nanopartícula deste mesmo ponto é de aproximadamente  $2,62 \times 10^{-11}$  mol L<sup>-1</sup>. No entanto, o valor da energia retorna a aumentar com o aumento da concentração de AuNP-Citrato, até atingir o patamar onde há pouca variação de energia e atingir valores da ordem de  $4 \times 10^5$  kJ mol<sup>-1</sup>.



**Figura 6.** Isoterma que mostra a variação da entalpia de interação ( $\Delta H_{\text{apa-int}}$ ) em função da concentração de AuNP-Citrato do complexo CM-AuNP-Citrato.

A caseína se auto estrutura na forma esférica e a distribuição das frações ( $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - e K-caseínas) desse complexo ocorre de forma que a K-caseína está mais distribuída externamente (hidrofílica), enquanto as outras frações estão mais internamente (hidrofóbicas). A parte externa, portanto, estabiliza a micela através de efeitos estéricos e eletrostáticos [8]. No entanto, o comportamento do gráfico mostra que ocorre mais de um tipo de interação, ou seja, as nanopartículas não interagem somente com a fração proteica distribuída externamente. Então da primeira energia registrada até a mínima, toda a nanopartícula inicialmente injetada interage com a fração externa, na superfície da caseína micelar, registrando uma liberação da energia. No entanto, a partir do momento que pelo menos a metade dos sítios de ligação da K-caseína estão ocupados, no sistema passa a ocorrer um aumento da energia que mostra que as caseínas sofrem um processo de mudança conformacional. Isso ocorre devido à formação de uma ligação iônica entre o ouro às cadeias laterais que contém grupos amina e hidroxila da proteína, pelo processo de adsorção na superfícies das NPs [9]. A partir dessa mudança conformacional ocorre a saturação dos sítios da caseína, ou seja, as nanopartículas deixam de interagir com a K-caseína e interagem entre si, pois possuem uma estrutura hidrofílica, não favorecendo interações com a parte interna da caseína micelar composta pelas outras frações, que seria hidrofóbica. Vale considerar que as frações proteicas da caseína podem estar interagindo entre si, impedindo mais interação com a nanopartícula.



**Figura 7.** Isoterma que mostra a variação da entalpia de interação ( $\Delta H_{\text{apa-int}}$ ) do complexo CM-AuNP-PEG800.

No caso do complexo CM-AuNP-PEG800 (Figura 7), o comportamento geral desta curva não é tão diferente da curva anterior e pode ser explicado da mesma forma. No entanto, os valores de energia ( $\Delta H_{\text{apa-int}}$ ) e os valores de concentração de AuNP-PEG800 não são os mesmos e nem estão próximos. A energia mínima liberada, para o caso anterior, é de aproximadamente  $-1,13 \times 10^7 \text{ kJ mol}^{-1}$ , é maior que o caso atual, de aproximadamente  $-5,30 \times 10^6 \text{ kJ mol}^{-1}$ . A concentração das nanopartículas também muda, pois a [AuNP-Citrato] necessária para o valor mínimo de energia correspondente é de 13x menor (da ordem de  $2,62 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$ ) em relação ao valor da [AuNP-PEG800] ( $3,5 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ ), também para o valor mínimo de energia. A saturação dos sítios da CM, no último ponto do gráfico, ocorre na concentração de  $1,48 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$  para o CM-AuNP-Citrato, enquanto para o CM-AuNP-PEG800,  $1,06 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ . Energeticamente, o valor mínimo do complexo contendo citrato é aproximadamente 7x maior do que o complexo contendo PEG800. Isso significa que os grupos funcionais das moléculas que recobrem as nanopartículas possuem uma grande influência na energia de interação.

## 5. Conclusão

A caseína micelar é formada por diferentes sítios de interação capazes de complexar com as superfícies das AuNPs, fazendo inclusive a substituição molecular com as espécies químicas da superfície das nanopartículas. Além das interações intermoleculares, os grupos sulfeto, amino e hidroxila podem fazer reações químicas com a parte metálica (Au), produzindo valores de energia aparente de interação ( $\Delta H_{\text{apa-int}}$ ) muito altos, provavelmente maiores do que ocorre com moléculas mais simples. Com isso é possível concluir que esses resíduos de aminoácidos presentes na superfície das CM são os responsáveis pela adsorção das AuNPs, levando a substituição das espécies superficiais.

Uma explicação da diferença energética entre os complexos pode ser explicada pelo fato da molécula de PEG na superfície torna a nanopartícula mais hidrofílica, interagindo melhor com o solvente do que com a K-caseína. Isso dificulta a saída desse grupo (PEG) da superfície da NP, fazendo com que seja necessária uma maior concentração de titulante para que ocorra a interação com a caseína. A energia também deve ser maior para a quebra dessas interações e assim ocorra a formação do complexo. Em outras palavras, a energia de interação é menor (menos exotérmica) porque a presença do PEG induz menor interação com a caseína.

Essa análise das energias de interação permitiu a compreensão da modulação do processo de formação do complexo nanopartícula-caseína micelar, ainda que os mecanismos dessas interações não sejam totalmente compreendidos, devido à complexidade das macromoléculas envolvidas e são necessários mais tipos de instrumentações para maior aprofundamento.

## 6. Perspectivas

Outra forma de investigação são os cálculos termodinâmicos e cinéticos de interação, pode ser utilizada também a espectroscopia de fluorescência, uma técnica não destrutiva e capaz de mostrar os resíduos de aminoácidos que fluorescem e tem a intensidade da emissão afetada quando sofrem a influência das nanopartículas, além de calcular a constante de ligação ( $K_b$ ). E a partir desta constante, calcular os parâmetros termodinâmicos, como a variação da entropia ( $\Delta S$ ) e a variação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ).

$$\text{Energia livre de Gibbs:} \quad \Delta G = - RT \cdot \ln K \quad (2)$$

$$\text{Entropia:} \quad \Delta S = - \frac{(\Delta G - \Delta H)}{T} \quad (3)$$

## 7. Referências

- [1] S. E. Harding e B. Z. Chowdhry, *Protein-Ligand Interactions: hydrodynamics and calorimetry*, 1º ed, vol. 1. em Practical Approach, vol. 1. Oxford: Oxford University Press.
- [2] R. K. Mishra, A. Ahmad, A. Vyawahare, P. Alam, T. H. Khan, e R. Khan, “Biological effects of formation of protein corona onto nanoparticles”, *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, vol. 175, p. 1–18, abr. 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.01.152.
- [3] S. Zanganeh, R. Spitler, M. Erfanzadeh, A. M. Alkilany, e M. Mahmoudi, “Protein corona: Opportunities and challenges”, *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY & CELL BIOLOGY*, vol. 75, p. 143–147, jun. 2016, doi: 10.1016/j.biocel.2016.01.005.
- [4] Y. Yu, Y. Luan, e W. Dai, “Dynamic process, mechanisms, influencing factors and study methods of protein corona formation”, *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, vol. 205, p. 731–739, abr. 2022, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.03.105.
- [5] C. G. de Kruif, T. Huppertz, V. S. Urban, e A. V. Petukhov, “Casein micelles and their internal structure”, *ADVANCES IN COLLOID AND INTERFACE SCIENCE*, vol. 171, p. 36–52, abr. 2012, doi: 10.1016/j.cis.2012.01.002.
- [6] Y. Wang, Wusigale, e Y. Luo, “Colloidal nanoparticles prepared from zein and casein: interactions, characterizations and emerging food applications”, *FOOD SCIENCE AND HUMAN WELLNESS*, vol. 12, nº 2, p. 337–350, mar. 2023, doi: 10.1016/j.fshw.2022.07.036.
- [7] T. Yang *et al.*, “Formation of casein micelles from bovine caseins simulating human casein phosphorylation patterns: Micellar structure and in vitro infant gastrointestinal digestion”, *FOOD HYDROCOLLOIDS*, vol. 153, ago. 2024, doi: 10.1016/j.foodhyd.2024.110020.
- [8] Wusigale, L. Liang, e Y. Luo, “Casein and pectin: Structures, interactions, and applications”, *TRENDS IN FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY*, vol. 97, p. 391–403, mar. 2020, doi: 10.1016/j.tifs.2020.01.027.
- [9] T. Soejima, S. Oshiro, Y. Nakatsuji, e S. Ito, “Dense aqueous colloidal gold nanoparticles prepared from highly concentrated precursor solution”, *JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE*, vol. 362, nº 2, p. 325–329, out. 2011, doi: 10.1016/j.jcis.2011.07.010.
- [10] Y. Liu e R. Guo, “The interaction between casein micelles and gold nanoparticles”, *JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE*, vol. 332, nº 1, p. 265–269, abr. 2009, doi: 10.1016/j.jcis.2008.12.043.
- [11] M. Espinoza-Castaneda, A. de la Escosura-Muniz, G. Gonzalez-Ortiz, S. M. Martin-Orue, J. Francisco Perez, e A. Merkoci, “Casein modified gold nanoparticles for future theranostic applications”, *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS*, vol. 40, nº 1, SI, p. 271–276, fev. 2013, doi: 10.1016/j.bios.2012.07.042.
- [12] N. Verimli, A. Demiral, H. Yilmaz, M. Culha, e S. Erdem, “Design of Dense Brush Conformation Bearing Gold Nanoparticles as Theranostic Agent for Cancer”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 189, p. 1–20, nov. 2019, doi: 10.1007/s12010-019-03151-6.
- [13] E. Lee *et al.*, “Molecular origin of AuNPs-induced cytotoxicity and mechanistic study.”, *Molecular origin of AuNPs-induced cytotoxicity and mechanistic study.*, nº 9, 2019, doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39579-3>.