

ESTUDO BIOQUÍMICO FUNCIONAL E ESTRUTURAL DA CASEÍNA SUBMETIDA AO PROCESSO DE ENCAPSULAÇÃO EM MICROESFERAS DE PLGA

Antônio Carlos Melo Lima Filho (IC-PIBIC/UFPI), Paulo Henrique de Holanda Veloso Junior (IC-PIBITI/UFPI), Lucas Rodrigues de Carvalho (IC-PIBIC/CNPQ) e Reginaldo Almeida da Trindade (Prof. Adjunto de Biomedicina).

Introdução

Os sistemas de liberação são empregados com objetivo de promover a liberação controlada de um fármaco ou uma proteína terapêutica, oferecendo maior eficácia, tempo na circulação, direcionamento a alvos específicos e administração segura. Em se tratando de proteínas ou peptídeos, a principal limitação desta estratégia é a fragilidade destas moléculas frente ao processamento de encapsulação. Portanto, antes de se iniciar este processo são necessários alguns estudos preliminares, tais como, determinar um método de dosagem da proteína de interesse que seja padronizado e para que se tenha maior certeza da quantidade encapsulada nas partículas formadas, além de garantir a integridade estrutural durante e após o processamento. Neste trabalho utilizamos como proteína modelo, a caseína, produzida por meio da precipitação ácida, que é uma das principais proteínas com funcionalidade tecnológica em alimentos. Este trabalho teve como principal objetivo estudar o efeito do processo de encapsulação em diferentes condições excipientes sobre a estrutura química da caseína, por meio da padronização dos métodos de dosagem da caseína e estudo da sua estrutura após processamento em diferentes condições por métodos bioquímicos e biofísicos.

Material e Métodos

Solução de caseína: Foram preparadas soluções-mãe de caseína na concentração de 1 mg/mL em tampão PBS com pH 7,2, a qual foi posteriormente diluída em diferentes concentrações (0,8 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,13 mg/mL; 0,06 mg/mL e 0,03 mg/mL) a fim de se produzir uma curva de calibração de dosagem da caseína. **Absorbância a 280 nm UV:** Para leitura direta a 280 nm, o espectrofotômetro Shimadzu UV1800 foi calibrado para leitura zero com PBS pH 7,2, e posteriormente foram realizadas as leituras das soluções de insulina a 280 nm. **Método de Lowry:** foram adicionados 120 µL de cada diluição e/ou de cada amostra recuperada a 80 µL de NaOH 1M, 800 µL do reativo A (CuSO₄ 1%; tartarato de sódio e potássio 2%; carbonato de sódio 2% na proporção 1:1:98) e 100 µL de reagente Folin diluído 1:2. Foi preparado um branco substituindo a amostra por NaOH 1M (120 µL). A reação foi mantida ao abrigo da luz por 30 minutos, e realizada a leitura a λ 720 nm. **Método de Bradford:** foram utilizados inicialmente 20 µL de amostra das diferentes diluições a 1000 µL de solução de Bradford (Corante azul de Coomassie dissolvido em etanol e ácido fosfórico), realizando-se a leitura a 595 nm, após 5 minutos de reação. **Processo de encapsulação:** uma simulação da fase (W1/O) da dupla emulsão (W1/O/W2) foi realizada processando-se a caseína (1 mg/mL) em diferentes excipientes: PBS (controle), água, e soluções salinas constituídas individualmente de 50 mM de NaCl, MgCl₂, KSCN e NaH₂PO₄, com pH ajustado para 7.2. Foram adicionados 2mL da solução de caseína a 8 mL de CH₂Cl₂ em um tubo, e esta mistura foi emulsificada em um Ultraturrax a 24.000 rpm durante 2 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 5.000 rpm, retirando-se o sobrenadante para as dosagens de proteínas. **Eletroforese:** Utilizou-se um sistema vertical com gel de poliacrilamida, 12,5% no gel de

separação e 5% no de empacotamento, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Adicionou-se 50 µL da caseína (resultante das diferentes soluções processadas e concentradas no Concentrador plus por 10 horas a 30°C) com mais 50 µL de tampão de amostra, aplicando-se em seguida, 30 µL desta mistura nos poços formados no gel a 50 mA, 120 V por 1 hora. Método de fluorescência intrínseca: As amostras foram excitadas a 280 nm e a emissão de fluorescência medida entre 300 e 400 nm. Para relação “Fluorescência X Estrutura” foram utilizados as relações medidas em 350/330 nm.

Resultados e Discussão

Foi analisado o espectro de absorção da solução de caseína na concentração de 1 mg/mL para determinar o comprimento de onda de máxima absorvidade e o coeficiente de extinção molar para serem utilizados como λ de referência. Nas figuras 2.B-D são mostradas as curvas de calibração de dosagem da caseína com diferentes concentrações (0,03 mg/mL a 1 mg/mL) através da leitura realizada a 280 nm, método de Lowry e Bradford. Observou-se uma boa linearidade com o coeficiente de correlação (r^2) de 0,999 em (B), (r^2) de 0,990 em (C) e (r^2) de 0,979 em (D).

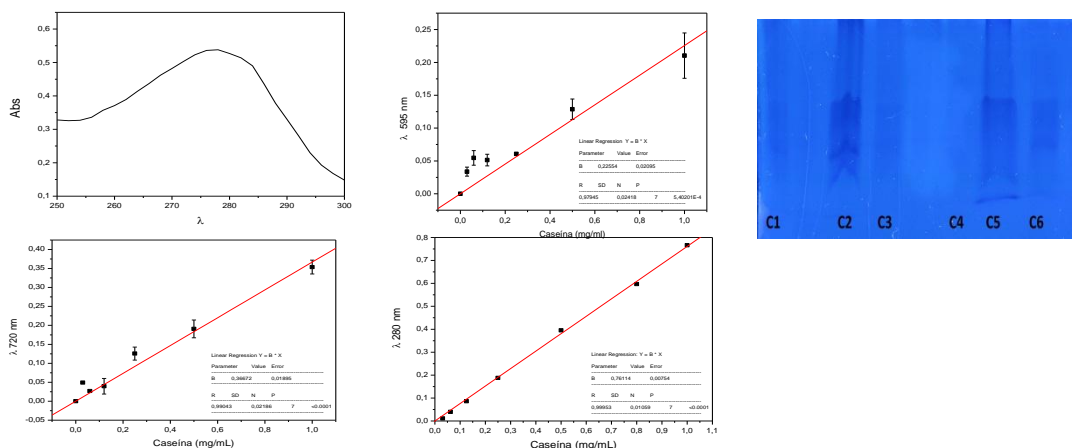


Figura 1. (A) Espectro da caseína 240 nm a 300 nm em PBS pH 7.4. (B) Curva de calibração da caseína por leitura a 280nm. (C) Curva de calibração da caseína pelo método de Lowry. (D) Curva de calibração da caseína pelo método de Bradford. (E) Eletroforese da caseína após tratamento com diferentes solventes simulando o processo de dupla emulsão.

Na dosagem para verificar a recuperação da caseína após processamento utilizando diferentes soluções excipientes foi utilizado a leitura a 280 nm (Figura 2). Foi observado que na solução excipiente PBS 50 mM encontrou-se a maior concentração da caseína, portanto, sendo a solução mais adequada para o seguir com o processamento da caseína em microesferas de PLGA.

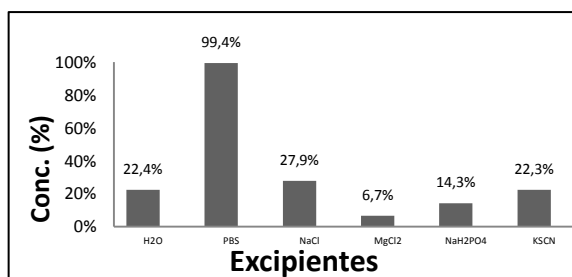


Figura 2. Porcentagem de recuperação da caseína após simulação da fase (W /O) do método da dupla emulsão em diferentes excipientes dosada a 280nm.

A espectroscopia de fluorescência da caseína demonstrou que quando em água e NaCl, as alterações sofridas na disposição dos aminoácidos da proteína são menores, ocorrendo uma diminuição da fluorescência, o que pode indicar uma possível formação de pequenos agregados (Figura 3).

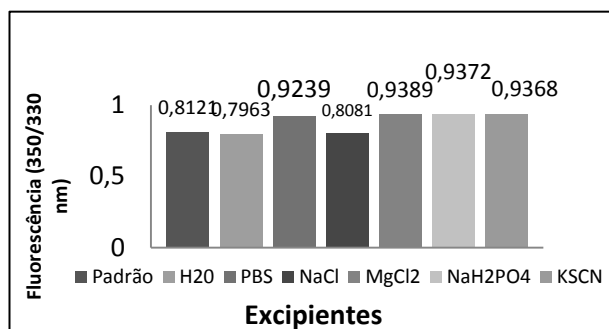


Figura 3. Valores referentes às intensidades de fluorescência intrínseca obtidas da caseína através da espectroscopia de fluorescência após processamento com os diferentes solventes.

Conclusão

Embora os três métodos possam ser utilizados para a dosagem da caseína recuperada após processamento, a dosagem pela leitura a 280 nm mostrou ser menos susceptível a interferentes presentes nos demais métodos colorimétricos (Lowry e Bradford). Através da eletroforese e métodos de dosagem da proteína, observou-se que após o processamento da caseína em diferentes soluções excipientes (H_2O , PBS, NaCl, $MgCl_2$, NaH_2PO_4 , KSCN), simulando o processo de dupla emulsão, o PBS apresentou melhor resultado recuperando 99,4% da proteína (observado na dosagem a 280 nm). O perfil eletroforético não foi alterado após o processamento, formando três bandas distintas referentes às quatro cadeias que compõem a caseína. A espectroscopia de fluorescência demonstrou que a caseína sofreu poucas alterações na disposição de seus aminoácidos na presença de H_2O e NaCl, diferentemente do PBS, $MgCl_2$, NaH_2PO_4 e KSCN.

Apoio



Referencia

1. AZEVEDO, Marcelo Mantovani M. de. Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos. Monografia apresentada ao Laboratório de Química do Estado Sólido LQES, Instituto de Química – UNICAMP. 2002.
2. SILVA, Catarina et al. Administração oral de peptídeos e proteínas:II. Aplicação de métodos de microencapsulação. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Volume 39, Nº1, 2003.
3. REDIGUIERI, Camila Fracalossi. Mistura aquosas de pectina/caseína: estudo físico-químico e potencial de uso no tratamento da doença periodontal. tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Ribeirão Preto, 2008.

PALAVRAS-CHAVE: Encapsulação. PLGA. Caseína.