

Estudo da conformação estrutural da albumina por espectroscopia Raman

Franciele Zanoni (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Francielle Sato (Orientadora), e-mail: fsato@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Exatas e da Terra / Maringá, PR.

Ciências Exatas e da Terra / Física / Física da Matéria Condensada

Palavras-chave: Espectroscopia Raman, Albumina, Proteína

Resumo:

Neste trabalho foi avaliado o potencial da espectroscopia Raman, a qual permite uma análise qualitativa à respeito dos modos vibracionais de um composto. Tal técnica foi empregada no estudo da proteína albumina presente na clara de ovo de galinha. O consumo desta proteína do ovo pode ser por meio da ingestão da clara do ovo *in natura* ou na forma em pó, podendo ser manipulada quimicamente ou por liofilização. Sendo assim, foram analisadas em função da temperatura, a clara do ovo *in natura*, a clara do ovo liofilizada e a clara do ovo em pó adquirida no comércio local, com o objeto de observar mudanças conformacionais na albumina mediante a variação de temperatura.

Introdução

As proteínas são formadas por aminoácidos unidos entre si por ligações covalentes denominadas ligações peptídicas. Sua conformação protéica se dá por meio da sequência única de aminoácidos que determina a função biológica que a proteína irá desempenhar (NELSON e COX, 2011). Uma das proteínas de grande interesse, a albumina, está presente tanto em alimentos, como na clara de ovo, quanto em aplicações industriais e até mesmo no sangue. É usada em grandes quantidades na produção de produtos alimentares, visando, deste modo, a obtenção de frações da proteína com diferentes propriedades funcionais (SHARMA, 2012).

Métodos espectroscópicos abrangem um grupo de técnicas que permite estudar a interação da radiação com a matéria, em especial a espectroscopia Raman é aplicada para estudo em proteínas, pois permite avaliar conformações protéicas por meio de bandas Raman que apresentam assinatura das quatro estruturas das proteínas nas regiões espectrais conhecidas como amida I e III (BENEVIDES et al, 2003). Diante do exposto, o objetivo principal deste trabalho é observar possíveis mudanças na conformação protéica da albumina da clara de ovo mediante a variação de temperatura via espectroscopia Raman, a qual permite estudar os modos vibracionais de moléculas, associando aos grupos químicos da molécula.

Materiais e métodos

As análises por meio das técnicas de Espectroscopia Raman foram feitas utilizando as amostras de clara de ovo *in natura*, comercial e liofilizada. Já para análise térmica foi utilizada apenas as amostras comercial e liofilizada. Todos os equipamentos utilizados neste trabalho pertencem ao COMCAP-UEM.

Para as medidas da espectroscopia Raman foi utilizado um microscópio Raman confocal (Senterra, Bruker) acoplado a um sistema de temperatura *homemade* nas seguintes configurações: laser de excitação em 532 nm (20 mW); lente de magnitude de 20 x; fenda confocal de 50x1000 μm ; resolução espectral de 3-5 cm^{-1} , entre 200-1700 cm^{-1} ; 3 s de tempo de integração; 100 varreduras por espectro; temperatura de $\sim 20^\circ\text{C}$ a 70°C com incremento de 5 em 5°C . Para as análises térmicas foi utilizado um calorímetro diferencial de varredura (DSC) nas seguintes configurações: taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$; intervalo de temperatura ambiente à 200°C ; atmosfera de aquecimento foi controlada com um fluxo de ar de 50 ml/min.

Resultados e Discussão

Inicialmente foi realizada a caracterização dos espectros Raman da clara de ovo, *in natura*, liofilizada e comercial em temperatura ambiente (21°C) por meio da espectroscopia Raman. Os espectros estão mostrados na Fig. 1. Foi observado nos espectros das amostras bandas Raman referentes à albumina, conforme relatados na literatura, entretanto para a amostra comercial foram encontradas algumas regiões espectrais diferentes da clara de ovo *in natura* e liofilizada, as quais apresentaram espectros Raman semelhantes. Estas diferenças podem estar associadas ao processo de produção da clara de ovo em pó comercial, que geralmente incluem pasteurização, eliminação de açúcares no ovo evitando o escurecimento não-enzimático e desidratação (CUNHA et al, 2012).

Para determinar a temperatura na qual as amostras não sofressem degradação térmica foi utilizada a técnica de DSC. Foi observado nos termogramas um pico de degradação térmica próximo à 150°C , próxima a temperatura de degradação térmica da albumina descrita na literatura em 145°C (XIANG et al, 2017), além disso, podemos observar que o processo de o efeito térmico observado é irreversível.

Nas medidas de espectroscopia Raman em função da temperatura conforme transcorria o aumento de temperatura, notou-se, sem exceções, deslocamentos por toda a região espectral. Para o estudo de mudanças conformacionais em proteínas por espectroscopia Raman, usualmente, são observados os comportamentos das bandas da amida I ($1658\text{-}1667\text{ cm}^{-1}$) e amida III ($1220\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$) (DUAN et al, 2017; BENEVIDES et al, 2013), as quais foram analisadas neste trabalho. As bandas Raman referentes à amida I e III estão, predominantemente, correlacionadas com as estruturas

protéicas tridimensionais α -hélice (estrutura enrolada) e β -folha (estrutura planar), respectivamente, estas são as estruturas secundárias de proteínas (BENEVIDES et al, 2003).

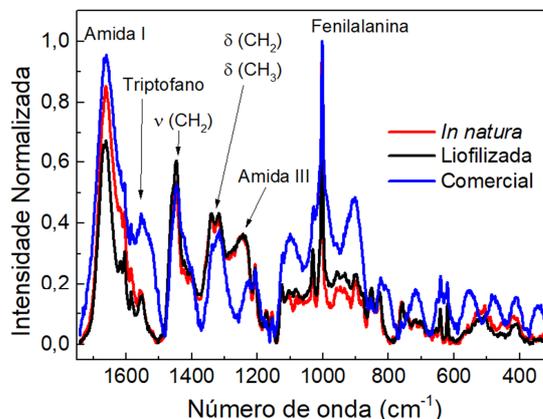


Figura 1 – Espectros Raman da clara de ovo em temperatura ambiente: in natura, liofilizada e comercial e as principais atribuições químicas.

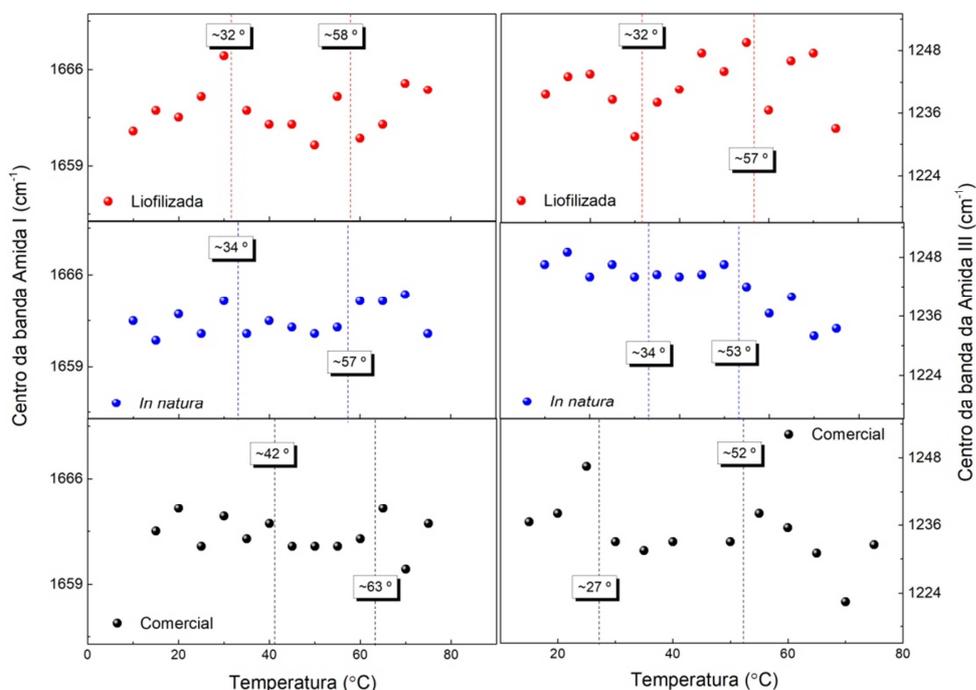


Figura 2 – Posições das bandas amida I e amida III em função da temperatura para as amostras de clara de ovo (comercial, *in natura* e liofilizada).

Para melhor avaliar os deslocamentos foram avaliados os centros das amidas nos espectros, como mostra a Fig. 2. Nota-se três regiões distintas de deslocamento nas duas amidas, mostrando mudanças nas estruturas α -hélice e β -folha. Podemos inferir que deslocamentos para maiores números de onda há mudanças de estruturas mais enroladas para menos enroladas, possivelmente devido ao maior espaçamento entre as ligações químicas das

estruturas secundárias com o aumento da temperatura. As variações na clara de ovo liofilizada são mais intensas tanto na amida I quanto na amida III, mostrando que o processo de liofilização, no qual a temperatura é reduzida à aproximadamente $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ permite maiores mudanças nas estruturas α -hélice e β -folha. Porém em nenhuma das amostras foi observada a desnaturação, que se caracterizaria pelo desaparecimento das bandas.

Conclusões

Dessa forma, podemos concluir que, com a espectroscopia Raman foi possível observar mudanças conformacionais na albumina da clara de ovo *in natura* e oriunda de processamentos diferentes. Ainda observamos que não houve nenhuma desnaturação protéica, porém com mudanças nas estruturas enroladas e planares em função da temperatura.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Prof^a. Dr^a. Francielle Sato por todo auxílio. Agradeço também à Fundação Araucária, CNPq, Finep, COMCAP e UEM pelo auxílio financeiro e tecnológico para a realização deste trabalho.

Referências

NELSON, D. L. e COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger** 5. ed., Artmed, 2011.

SHARMA, D. Non-isothermal unfolding/denaturing kinetics of egg white protein. **J. Therm Anal Calorim**, v. 109, n. 3, p. 1139–1143, 2012.

BENEVIDES, J. M., OVERMAN, S. A. E THOMAS, G. J. JR. **Current Protocols in Protein Science**, John Wiley & Sons, Inc, 2003.

CUNHA, F. L., CALIXTO, F. A. A. CARNEIRO, C. S. E CARRIJO, K. F. Processamento, pasteurização, desidratação e outros processos similares de conservação de ovos de consumo. **PUBVET**, v. 6, n. 31, 2012.

Duan, X., Li, J., Zhang, Q., Zhao, T., Li, M., Xu, X. e Liu, X. Effect of a multiple freeze-thaw process on structural and foaming properties of individual egg white proteins. **Food Chemistry**, v.228, n. 1, p.243-248, 2017.