



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE-UFCG**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AGROALIMENTAR - CCTA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMAS AGROINDUSTRIAIS-PPGSA**

**JÁLDER ALISON DA SILVA MACIEL**

**ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA) COMO ALTERNATIVA PARA**  
**NANOTECNOLOGIA NA ÁREA DE ALIMENTOS**

**POMBAL – PB**  
**2018**

JÁLDER ALISON DA SILVA MACIEL

ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA) COMO ALTERNATIVA PARA  
NANOTECNOLOGIA NA ÁREA DE ALIMENTOS

Trabalho de Conclusão de Mestrado apresentado ao Programa de Pós Graduação em Sistemas Agroindustriais do Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, campus Pombal – PB, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

**Orientador:** Prof.D. Sc João Paulo Natalino de Sá  
Prof.<sup>a</sup> M. Sc Aline Carla de Medeiros  
Prof. D. Sc Patrício Borges Maracajá

M152a Maciel, Jálder Alison da Silva.  
Albumina sérica bovina (BSA) como alternativa para nanotecnologia na área de alimentos / Jálder Alison da Silva Maciel. – Pombal, 2019.  
23 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, 2018.  
"Orientação: Prof. Dr. João Paulo Natalino de Sá".  
"Co-orientação: Prof. Dr. Patrício Borges Maracajá"; Profª. Ma. Aline Carla de Medeiros.

Referências.

1. Nanotecnologia. 2. Albuminas. 3. Alimentação. I. Sá, João Paulo Natalino de. II. Maracajá, Patrício Borges. III. Medeiros, Aline Carla de. IV. Título.

CDU 620.3(043)



Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar



CAMPUS DE POMBAL

**“ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA) COMO ALTERNATIVA PARA NANOTECNOLOGIA NA ÁREA DE ALIMENTOS”**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais do Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar da Universidade Federal de Campina Grande, Campus Pombal-PB, em cumprimento às exigências para obtenção do Título de Mestre (M. Sc.) em Sistemas Agroindustriais.

Aprovada em 31/07/2018

COMISSÃO EXAMINADORA

João Paulo Natalino de Sá  
Orientador

Aline Carla de Medeiros  
Orientadora

Patrício Borges Maracajá  
Examinador Interno

Milena Nunes Alves de Sousa  
Examinadora Externa

POMBAL-PB  
JULHO - 2018

CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AGROALIMENTAR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMAS AGROINDUSTRIAIS

RUA: JAIRO VIEIRA FEITOSA, 1770 - CEP.: 58840-000 - POMBAL - PB

SECRETARIA DO PPGSA: 3431-4016 COORDENAÇÃO DO PPGSA: 3431-4069

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, que rege minha vida e meu coração, me orientando nos propósitos que determino e me proporcionando a força necessária para superar todos os desafios que me são apresentados.

Agradeço também a minha namorada, Maria Clara Batista, pela compreensão e apoio a mim dedicados, aceitando meus momentos de ausência física e psicológica, mas sempre aguardando meu retorno.

À minha amiga Stephanny Batista, responsável pelo meu ingresso nessa pós-graduação, incentivadora de mais uma conquista na minha trajetória acadêmica.

À Francisca Solange da Silva, minha querida mãe, fonte da minha energia e motivação, por quem busco sempre ser alguém melhor em todos os âmbitos da minha vida.

À minha tia, Josefa Lea da Silva Santos, que sempre incentivou meus estudos e a conscientização de que eu podia ser alguém melhor por meio do conhecimento.

Por fim, agradeço aos orientadores dessa pesquisa acadêmica, aos professores da pós-graduação e aos funcionários dessa instituição, que compõem uma equipe ilustre e responsável pelo bom funcionamento desse curso.

## RESUMO

**Introdução:** a albumina sérica bovina (BSA) figura como uma das principais albuminas responsável pelo carregamento de compostos hidrofóbicos, que, por sua vez, são insolúveis no plasma sanguíneo, atuando também na eliminação dos radicais livres de oxigênio e desativação de vários metabólitos. **Objetivos:** analisar a albumina sérica bovina (BSA) como alternativa para nanotecnologia na área de alimentos. **Justificativa:** a importância dessa pesquisa repousa na análise das condições de interação entre o BSA - eugenol que podem contribuir com o avanço das tecnologias utilizadas na produção e tratamento dos alimentos. **Metodologia:** o estudo foi desenvolvido por meio de uma pesquisa bibliográfica, com abordagem qualitativa, reunindo dados de materiais disponíveis virtualmente em bases de dados de pesquisas científicas. **Resultados:** Percebeu-se que as operações que podem alterar a temperatura e o pH da matriz alimentícia possuem relevante potencial para o desenvolvimento de técnicas que possibilitam o melhoramento da estabilidade cinética e funcionalidade dessa matriz, influenciando futuras aplicações tecnológicas na área alimentícia.

**Palavras - chave:** Albumina. Nanotecnologia. Alimentação.

## ABSTRACT

**Introduction:** bovine serum albumin (BSA) is one of the main albumin responsible for the loading of hydrophobic compounds, which in turn are insoluble in the blood plasma, also acting in the elimination of oxygen free radicals and the deactivation of several metabolites. **Objectives:** to analyze bovine serum albumin (BSA) as an alternative for nanotechnology in the food area. **Rationale:** the importance of this research rests on the analysis of the interaction conditions between BSA - eugenol that can contribute to the advancement of the technologies used in the production and treatment of food. **Methodology:** the study was developed through a bibliographical research, with a qualitative approach, gathering material data available in virtually scientific research databases. **Results:** It was noticed that the operations that can alter the temperature and pH of the food matrix have relevant potential for the development of techniques that allow the improvement of kinetic stability and functionality of this matrix, influencing future technological applications in the food area.

**Keywords:** Albumin. Nanotechnology. Food

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estrutura da BSA com seus diferentes sítios, em destaques os pontos de ligação hidrofóbicos (site I e II) ..... 10
- Figura 2** - Estrutura molecular do eugenol. .... 12
- Figura 3** - Diferentes isômeros da conformação da BSA de acordo como o pH do meio. .... 18

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>7</b>
<b>2 METODOLOGIA</b> .....	<b>8</b>
2.1 TIPO DE PESQUISA.....	8
2.2 DADOS OBTIDOS .....	8
2.3 TRATAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS.....	8
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>10</b>
3.1 FUNÇÕES DA ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA) .....	10
3.2 FATORES QUE INTERFEREM NA ESTRUTURA NATIVA DA BSA.....	11
3.3 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA CONFORMAÇÃO DA BSA .....	15
3.4 INFLUÊNCIA DO PH NA CONFORMAÇÃO DA PROTEÍNA BSA.....	18
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>21</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>22</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As proteínas são biomoléculas formadas por um conjunto de cadeias poliméricas, onde cada monômero é constituído por um resíduo de aminoácido. O aminoácido é formado por um carbono da cadeia principal, denominado carbono-alfa ( $\alpha$ ). Este carbono realiza quatro ligações covalentes (Figura 1); uma com um átomo de hidrogênio, outra com um grupo amina primário ( $-\text{NH}_2$ ), um grupo carboxílico ( $-\text{COOH}$ ), e outra com um grupo radical, e as combinações dos diferentes aminoácidos formam todas as proteínas (BARACAT-PEREIRA, 2014).

Existem quatro níveis de organização que descrevem estruturalmente as proteínas. A estrutura primária consiste na representação linear da sequência de aminoácidos. A estrutura secundária se refere às conformações locais da proteína, como  $\alpha$ -hélice e conformações  $\beta$ . A estrutura terciária representa o arranjo tridimensional de todos os átomos, caracterizando uma configuração global da proteína. A estrutura quaternária é o arranjo espacial do agrupamento de subunidades de uma proteína com mais de uma cadeia de aminoácidos (BARACAT-PEREIRA, 2014).

Dentre as diferentes proteínas de interesse na área de alimentos, destacam-se as proteínas do leite, que podem ser classificadas em dois grupos: o primeiro grupo corresponde às caseínas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ ) que representam 80 % do conteúdo proteico total do leite e o segundo grupo corresponde às chamadas proteínas do soro (LIVNEY, 2010; FOX, 2003).

As proteínas do soro são principalmente uma mistura de proteínas globulares compreendendo  $\beta$ -lactoglobulina ( $\sim 50\%$  m/m),  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\sim 20\%$  m/m), imunoglobulinas ( $\sim 10\%$  m/m), albumina sérica bovina ( $\sim 6\%$ , m/m) e outros componentes proteicos menores ou peptídeos, incluindo a lactoferrina, lactoperoxidase, lisozima e fatores de crescimento (LIVNEY, 2010; FOX, 2003).

A albumina tem sido uma das primeiras moléculas de escolha em sistemas carreadores de diferentes princípios ativos, e foi uma das primeiras nanopartículas aprovadas pela agência de Administração de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos (USFDA) (PARK, 2012; ZHAO et al., 2010).

Este estudo tem como objetivo analisar a albumina sérica bovina (BSA) como alternativa para nanotecnologia na área de alimentos.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 TIPO DE PESQUISA

Trata-se de um estudo qualitativo onde realizou-se uma pesquisa bibliográfica.

A pesquisa qualitativa, pode ser definida como uma metodologia que produz dados a partir de observações extraídas diretamente do estudo de pessoas, lugares ou processos com os quais o pesquisador procura estabelecer uma interação direta para compreender os fenômenos estudados. Normalmente, parte de questões mais amplas, que só vão tomando uma forma mais definida quando se desenvolve o trabalho.

### 2.2 DADOS OBTIDOS

Os dados foram extraídos em sistema de busca e em bases de dados sendo utilizados os seguintes descritores para pesquisar os artigos: albumina sérica bovina (BSA) como alternativa para nanotecnologia na área de alimentos

### 2.3 TRATAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os dados coletados foram analisados e expressos de forma descritiva em texto, com sucessivo discurso baseada em dados de estudos já realizados.

Compreende-se a importância da pesquisa bibliográfica, tendo em vista que esta se objetiva a buscar “a resolução de um problema (hipótese) por meio de referenciais teóricos publicados, analisando e discutindo as várias contribuições científicas”. (Bocato, 2006, p. 266). Ainda, conforme o autor a pesquisa bibliográfica requer um planejamento sistemático que se inicia desde a definição do tema, passando pela construção do trabalho, até o momento de divulgação da pesquisa.

Nesse sentido, percebe-se que para a realização da pesquisa bibliográfica se faz necessário um procedimento devidamente estruturado, para que esta cumpra de fato a sua função de ampliar a divulgação do conhecimento científico, pois é através desta que se propaga a aprendizagem sobre uma determinada área do

saber, facilitando assim o dinamismo das pesquisas científicas e contribuindo para que o conhecimento não fique restrito a apenas uma pequena parcela pesquisadores e investigadores científicos.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

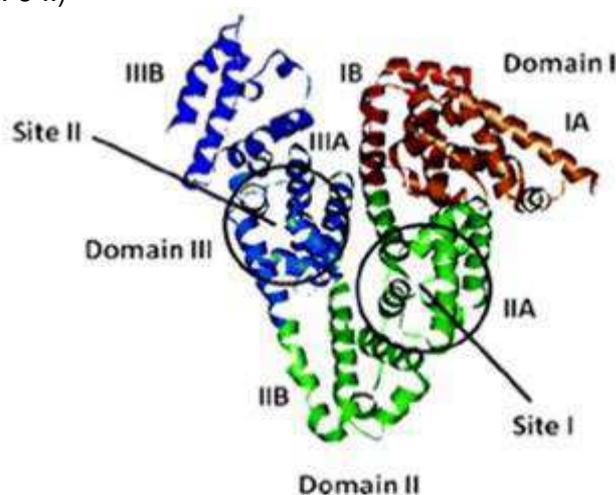
#### 3.1 FUNÇÕES DA ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA)

Dentre as albuminas, a albumina sérica bovina (BSA), desempenha importante função carregadora de compostos hidrofóbicos, os quais são insolúveis no plasma sanguíneo, além de atuar na eliminação de radicais livres de oxigênio e desativação de vários metabólitos lipofílicostóxicos, como bilirrubina, e uma grande afinidade por pequenos compostos aromáticos (INDYK, et al., 2015; HE, CARTER, 1992). Dentre os diferentes compostos aromáticos de pequena massa molar, que pode ser carregada pela BSA, tem-se por exemplo, o eugenol.

A BSA é uma proteína globular, com massa molar de 66,4 kDa, sendo constituída por uma sequência conhecida de 583 resíduos de aminoácidos, incluindo 17 ligações dissulfetos intramoleculares e um grupo tiol livre. O ponto isoelétrico da BSA é em pH de aproximadamente 4,6; sendo carregada negativamente em pH 7,0 e carga positiva no pH 3,0 (INDYK, et al., 2015; HE, CARTER, 1992).

A BSA, é constituída principalmente por estruturas do tipo  $\alpha$ -hélice, sendo formada pela presença de três domínios homólogos independentes (I, II, III). Cada um deste domínio compreende dois subdomínios A e B (IIA, IIIA e IB), denominados como os “sítios” I, II e III, respectivamente (Figura 1) (JATTINAGOUDAR et al., 2016; HE; CARTER, 1992).

**Figura 1** - Estrutura da BSA com seus diferentes sítios, em destaques os pontos de ligação hidrofóbicos (site I e II)



(Fonte: JATTINAGOUDAR et al., 2016).

A interação oferecida pelo sítio I ocorre principalmente por meio de interações hidrofóbicas, enquanto no sítio II envolve uma combinação de interações hidrofóbicas, ligação de hidrogênio e interações eletrostáticas. Desta forma, os locais de interação de albumina com moléculas exógenas ou endógenas de caráter hidrofóbico, como o eugenol, pode ser favorecido, principalmente, pela presença dos subdomínios II e IIIA, conhecido como sítios I e II, respectivamente (BANIPAL, et al., 2017; TAYEH et al., 2009).

Estes principais locais de interação na estruturada BSA, os subdomínios IIA e IIIA, diferem em tamanho, flexibilidade, estereosseletividade e afinidade de ligação. O subdomínio IIA é maior, mais flexível e menos estereosseletivo quando comparado ao subdomínio IIIA. As forças intermoleculares que estabilizam as espécies exógenas no subdomínio IIA são predominantemente hidrofóbicas, enquanto no subdomínio IIIA coexistem forças hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações eletrostática. Além dessas duas regiões de ligação, a BSA apresenta o subdomínio IB, um microambiente localizado na periferia da proteína. Por estar na interface proteína – solução, o subdomínio IB é mais suscetível às alterações tais como mudança do pH do meio e a temperatura. Quanto a presença de fluoróforo, a BSA apresenta dois fragmentos de triptofano denominados Trp-134 e Trp-212, localizados nos subdomínios IB e IIA, respectivamente (REZENDE et al., 2017; MOREIRA et al., 2014; CARTER, HO, 1994).

### 3.2 FATORES QUE INTERFEREM NA ESTRUTURA NATIVA DA BSA

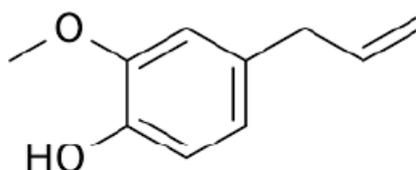
A estrutura nativa da BSA em determinado meio pode sofrer mudança na conformação mediante diferentes fatores, tais como, concentração da proteína, força iônica do meio, temperatura, pH, dentre outros, podendo favorecer ao enovelamento ou desnaturação da proteína.

A grande maioria dos estudos visa entender melhor os princípios termodinâmicos por trás do enovelamento e desnaturação das proteínas quando estas, ligadas ou não a outras moléculas, são submetidas a grandes variações de temperatura. Estes estudos visam fornecer importantes informações sobre as possíveis alterações nas estruturas secundárias e ou terciária das albuminas quando estas são submetidas ao aquecimento, o que pode levar a alterações na

estabilidade, propriedades de transportes, propriedades cinéticas e até perda irreversível de função da proteína ( ANJOS et al., 2011).

Na literatura não há disponível estudo demonstrando a influência da temperatura sobre a BSA carreando eugenol. Desta forma, trabalhos reportados na literatura envolvendo a BSA e moléculas de interesse para área de alimentos e com características físico-químicas similares ao eugenol (composto com elevada hidrofobicidade, massa molar relativamente pequena) (Figura 2), que demonstram a influência da temperatura sobre a conformação e a interação entre a BSA e determinados ligantes, podem auxiliar a inferir, sobre os possíveis efeitos da temperatura sobre a interação BSA-eugenol (BSA-E).

**Figura 2** - Estrutura molecular do eugenol.



Neste contexto, Nunes (2016), ao avaliar a interação do ácido cinâmico (AC) com a BSA na forma nativa (25 °C) e desnaturada (85 °C por 15 min) dispersas em pH 7.4, evidenciou pela técnica de espectroscopia de fluorescência, que a BSA na forma desnaturada ( comprovada pela de técnica de nano-calorimetria diferencial de varredura- nano-DSC- ) e nativa obtiveram a mesma proporção estequiométrica de sítios de ligação (n) com o ácido cinâmico (n=1:1), evidenciado que a possível mudança na conformação da proteína, não alterou a interação BSA-ligante. Porém, foi observado que a constante de ligação ( $K_b$ ) da interação BSA-CA no estado nativo passou de  $4,46 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}$  para  $1,06 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}$  para BSA-CA desnaturada, sendo também constatado uma redução da variação de energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ) que tornou-se menos negativa na conformação desnaturada ( $-22,96 \text{ KJ.mol}^{-1}$ ) em relação a conformação nativa ( $-26,53 \text{ KJ.mol}^{-1}$ ), sugerindo que a presença de sítios hidrofóbicos presentes na BSA pode desempenhar importante função para a manutenção da interação entre a BSA e ligantes que apresentem elevada hidrofobicidade, tal como o eugenol (NUNES, 2016). A diminuição da constante de

ligação verificada, também revela uma possível redução da estabilidade da interação BSA-CA, que se equaliza com o aumento verificado do  $\Delta G^\circ$  para o sistema BSA-CA desnaturada.

Além dos parâmetros termodinâmicos citados, foi evidenciado que a interação BSA-CA a 25 °C foi entalpicamente dirigido, sendo regido por interações hidrofóbicas ( $\Delta H^\circ = 14,22 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) e com contribuição entrópica de  $41,43 \text{ kJ.mol}^{-1}$ , porém, com a BSA desnaturada a interação BSA-CA foi ligeiramente exotérmico ( $\Delta H^\circ = -3,95 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) e com menor contribuição da entropia ao sistema ( $T\Delta S^\circ = 19,01 \text{ kJ.mol}^{-1}$  a 295 K), indicando que a desnaturação ao propiciar o desdobramento da BSA, pode ter ocasionado a exposição de diferentes resíduos de aminoácidos à superfície (NUNES, 2016).

Além disso, é possível, que à BSA desnaturada, o ligante possa estar interagindo, preferencialmente, em uma região mais externa, com por exemplo, o subdomínio IB, que envolve uma combinação de interações hidrofóbicas, ligação de hidrogênio e interações eletrostáticas e, portanto, mais suscetível à reestruturação do solvente na interface proteína – solução promovida pela desnaturação térmica da proteína.

Nunes (2016), também verificou as propriedades de superfície (potencial zeta, diâmetro hidrodinâmico e tensão superficial) sobre a BSA nativa e desnaturada por ação térmica em pH 7.4, demonstrando que a interação BSA-CA sobre a estrutura da proteína nativa apresentou potencial zeta ( -17,6 mV), diâmetro hidrodinâmico (7nm) e tensão superficial ( $53,4 \text{ mN.m}^{-1}$ ), diferentes em relação ao sistema BSA-CA desnaturada, sendo que esta apresentou potencial zeta e tensão superficial menores ( -11,5 Mv e  $48 \text{ mN.m}^{-1}$ , respectivamente) , e maior diâmetro hidrodinâmico (19,1 nm) (NUNES, 2016), enfatizando que a desnaturação ocasionada pela temperatura, favorece a mudanças de superfície na proteína e conseqüentemente, para a interação BSA-CA.

A desnaturação térmica ao favorecer maior flexibilidade da estrutura, possibilita a exposição de sítios hidrofóbicos da BSA que se encontram mais interiorizados na BSA em estado nativo, e também a uma distribuição de resíduos de aminoácidos menos carregados, que pode ter favorecido à diminuição, respectivamente, da tensão superficial e do potencialzeta no estudo de Nunes (2016).

A temperatura de um sistema está diretamente relacionada com a energia cinética deste. Incrementos na temperatura de uma solução proteica, tal como na BSA, geram aumentos na energia cinética do sistema, promovendo a redução da viscosidade do meio, o que favorece a ocorrência de colisões efetivas entre as partículas. Tais perturbações, pode resultar, em rompimento de interações fracas, que pode favorecer a exposição do núcleo hidrofóbico levando a formação de agregados e, conseqüentemente, a perda da estabilidade termodinâmica e cinética (BARACT- PEREIRA, 2014).

Pode-se inferir a partir do estudo de Nunes (2016), que o potencial zeta ao tornar-se menos negativo com a BSA desnaturada, pode favorecer a maior interação eletrostáticas entre as partículas, demonstrando possivelmente, uma menor estabilidade cinética ao sistema (BSA-CA), e juntamente com a maior flexibilização da estrutura da proteína desnaturada pela temperatura, proporcionar ao aumento do diâmetro hidrodinâmico. Estes dados, reportam também a importância do estudo do potencial zeta e do tamanho, que foi questionado na primeira questão desta prova de qualificação, visto que a mudança destes parâmetros no estudo citado, demonstram uma menor estabilidade do sistema BSA-ligante com a proteína desnaturada em relação a estrutura nativa.

Neste contexto, pode-se inferir, que a interação de compostos de pequena massa molar e elevada hidrofobicidade, como o eugenol, ao interagir com a BSA, dependendo da temperatura do meio na qual a proteína está presente, poderá ocasionar mudanças em sua conformação superficial, favorecendo a uma menor estabilidade, porém, sem alteração significativa na interação e possivelmente na funcionalidade deste sistema ( BSA-ligante), uma vez que a estequiometria de sítios de ligação entre a BSA e o ligante , no estudo supracitado, manteve-se inalterado com a BSA no estado nativo ou desnaturado.

No trabalho realizado por Zhang, Zhong, 2012, foi avaliadas possíveis alterações causadas pela desnaturação térmica ( 80 °C por 15 min.) com diferentes proteínas do soro, dentre elas a BSA em pH 6.4, e sua interação com a bixina ( substância química orgânica, muito utilizada como corante na indústria de alimentos, principalmente em queijos)(ZHANG, ZHONG, 2012).

Os autores constataram pela técnica de espectroscopia de fluorescência, que a interação entre a BSA e bixina(BSA-b), teve uma diminuição significativa da constante de ligação de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ), entre a forma nativa e desnaturada da

proteína com o ligante (de  $4.10 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  para  $2.80 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , respectivamente), porém, ambas foram consideradas como supressão estática (ZHANG; ZHONG, 2012).

### 3.3 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA CONFORMAÇÃO DA BSA

O aumento da temperatura promove a diminuição da viscosidade do meio reacional favorecendo a difusão do supressor em direção ao fluoróforo no estado excitado. Dessa forma, para o mecanismo estático, o aumento da temperatura induz a uma diminuição das colisões entre o ligante e a BSA excitada e, como consequência, observa-se uma diminuição da constante de supressão ( $K_{sv}$ ) com a elevação da temperatura (MOREIRA et al., 2014; LAKOWICZ, 2006).

Com auxílio do modelo matemático de Stern-Volmer modificado, foi constatado a diminuição da constante de ligação ( $K_a$ ) da interação BSA-b com a proteína nativa de  $2,32 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  para  $1,52 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  com proteína desnaturada. Os autores também evidenciaram, pela Transferência de energia por ressonância de Förster (FRET), que a distância de ligação ( $r$ ) entre o Trp- 212 e Trp-134 presentes na BSA e a bixina foi afetada pela desnaturação térmica, onde o valor de  $r$  da BSA-b(nativa) passou de 4,61 nm para 4,83 nm ( desnaturada), demonstrando que a temperatura ocasiona a mudança na conformação da BSA , indicando também uma menor eficiência da transferência de energia entre o dador e o receptor, inferindo que a mudança da conformação da BSA pela desnaturação térmica torna a distância de ligação entre a bixina e os resíduos de Trp maior, que equaliza-se com os valores obtidos pelo número de sítios de interação para a interação BSA-b desnaturada ( $k_a$ ), que passou de  $2.32 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  na forma nativa, para  $1,52 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  na forma desnaturada (ZHANG; ZHONG, 2012).

A diminuição destes parâmetros, pode ter sido favorecido pelo aumento da flexibilidade da conformação da BSA pelo aumento da temperatura, que favoreceu, possivelmente, a maior interação dos sítios hidrofóbicos (que na proteína nativa estavam mais interiorizados), com resíduos de aminoácidos hidrofóbicos presentes na proteína, em relação a interação com a bixina, que resultou na diminuição da constante de ligação do ligante com a BSA, ou seja, a interação proteína-proteína foi energeticamente mais favorável que a interação proteína-ligante. A diminuição de

citado no presente estudo com a BSA desnaturada para a interação BSA-b, pode também inferir, uma menor interação neste sistema, resultando em menor tempo de retenção do ligante com a com proteína, que poderá ser desfavorável para a funcionalidade deste sistema.

Os autores também constataram, em conjunto com a técnica de espectroscopia de dicroísmo circular (CD), que a ação do calor sobre a interação BSA-b(desnaturada), também pode alterar sua conformação secundária, visto que o complexo com a proteína na forma nativa obteve maior porcentagem de estruturas  $\alpha$ -hélice( $50.4 \pm 1.2$ ) em relação ao complexo com a proteína desnaturada ( $24.1 \pm 0.7$ ) (ZHANG; ZHONG, 2012).

A BSA ao ser aquecida passa por dois estágios de mudanças estruturais. O primeiro estágio que se situa numa faixa de aquecimento até  $65^{\circ}\text{C}$  é reversível, enquanto que o segundo ( $T > 65^{\circ}\text{C}$ ) é irreversível e pode resultar em formação de estruturas do tipo folhas- $\beta$ , embora nenhum destes estágios resulte, necessariamente, em uma completa destruição irreversível da conformação da BSA (KUZNETSOV et al., 1975).

Evidencia-se, com este estudo, que a temperatura do meio pode alterar a interação da BSA com moléculas de pequena massa molar com o eugenol, além de favorecer, a mudança na conformação da estrutura secundária, e conseqüentemente, desfavorecer a interação BSA-ligante e a sua funcionalidade.

Em contrapartida, Silva (2015), ao estudar o efeito da temperatura (20, 25, 37, 45 e  $55^{\circ}\text{C}$ ) sobre a BSA no estado nativo e desnaturado interagindo com betacaroteno (BSA- $\beta$ ) em pH 7,0; a partir da técnica de espectroscopia de fluorescência, sugeriu que os valores de  $n$  para a interação BSA- $\beta$  desnaturada foi maior, ou seja, três moléculas de BSA para cada molécula de betacaroteno (3:1) em relação ao interação BSA- $\beta$  no estado nativo (1:1). Além deste parâmetro, foi constatado que os valores obtidos para  $\Delta G^{\circ}$  foram negativos para todas as temperaturas estudadas, o que indica que o processo termodinâmico de interação BSA- $\beta$  desnaturada, favorece a formação do complexo e não dos reagentes (SILVA, 2015).

Entretanto, os valores de  $\Delta G^{\circ}$  foram menos negativos que os valores obtidos para a interação entre betacaroteno e BSA nativa, o que indica que a formação do complexo entre o corante e a proteína em sua conformação desnaturada é menos favorável termodinamicamente. A variação de entalpia de formação do complexo foi

positiva indicando que o processo termodinâmico de interação entre BSA- $\beta$  desnaturada é entalpicamente desfavorável. Assim, a força motriz que rege a interação entre estas duas espécies é o aumento da entropia do sistema, em função da liberação das moléculas de água que soltavam as moléculas da proteína e do corante (SILVA, 2015).

Quando a proteína está em sua conformação desnovelada há uma maior exposição de grupos hidrofóbicos para interagirem com o corante, que também é uma molécula hidrofóbica (SILVA, 2015). Neste contexto, a ação da temperatura sobre a BSA como carreadora de substâncias hidrofóbicas como o eugenol, pode favorecer a uma maior interação (BSA-ligante), que poderá resultar em maior funcionalidade do sistema.

De acordo com os estudos supracitados, pode-se inferir, que o efeito da temperatura na conformação e nas características da BSA atuando como carreadora, pode atuar de forma diferente na proteína, possivelmente, possivelmente, devido a peculiaridade das características do ligante. Desta forma, sugere-se que a ação da temperatura na BSA carreando eugenol, poderá: favorecer a uma flexibilização da proteína, que poderá favorecer em mudanças na sua superfície, tais como, potencial zeta, diâmetro hidrodinâmico (tamanho) e ou, alteração na conformação da estrutura secundária e ou terciária, que por sua vez, pode favorecer ou desfavorecer a interação com o eugenol, ou até mesmo, inalterar o número de sítios de interação entre a BSA e eugenol, e conseqüentemente, alterar a funcionalidade do sistema BSA-E.

Importante ressaltar que a estabilidade térmica de uma proteína na presença de um ligante depende da interação preferencial deste último com os estados nativo ou desdobrado da proteína. Se o ligante interage preferencialmente com o estado nativo da proteína, confere estabilização térmica para o biopolímero. No entanto, se o ligante interage preferencialmente com o estado desnaturado da proteína, conduz a uma redução da temperatura de transição térmica do biopolímero (CELEJ et al., 2005).

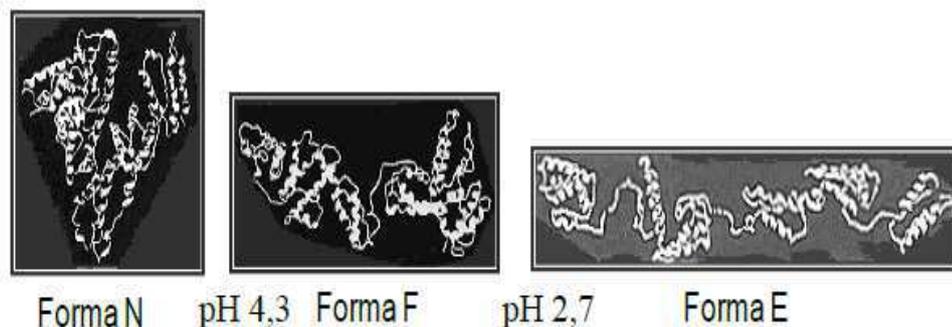
### 3.4 INFLUÊNCIA DO PH NA CONFORMAÇÃO DA PROTEÍNA BSA

Além da temperatura, o pH do meio no qual encontra-se a BSA, também pode influenciar na conformação da proteína e alterar a interação entre a BSA e determinado ligante, como o eugenol.

O pH é um fator que pode promover mudanças na densidade de cargas da BSA devido a protonação/desprotonação de grupos ionizáveis, bem como em sua carga líquida. Estas mudanças podem influenciar tanto as interações entre os segmentos da cadeia polipeptídica da BSA quanto as interações que esta proteína realiza com outras moléculas, como por exemplo, moléculas de eugenol que estão sendo carregados pela BSA (SILVA, 2015; KUN et al., 2009).

O ponto isoelétrico (pI) da BSA encontra-se em torno do pH de 4,6. O pI de uma molécula indica o pH no qual ela se encontra com a mesma quantidade de carga positiva e negativa. A BSA é carregada negativamente no pH 7,0 e pode sofrer mudança na conformação no intervalo de pH entre 4 e 8 (Figura 4) (FERREIRA, 2009; HE; CARTER, 1992).

**Figura 3** - Diferentes isômeros da conformação da BSA de acordo como o pH do meio.



A estrutura tridimensional da albumina, sofre mudanças em sua conformação principalmente quando não se encontra em condições fisiológicas (pH 7,0), originado diferentes isômeros de sua estrutura nativa (N) de acordo com o pH do meio (Figura 4). Em valores de pH entre 4,5 e 7,0 a sua conformação "N" (normal/nativa) é predominante. No intervalo de pH de 4,5 a 4,0 a BSA encontra-se sobre uma forma de transição, N-F, sendo que a forma F (flexível), é mais favorável quando ocorre uma redução abrupta do pH para valores menores que 4,0. A transição da forma F

na conformação da BSA para a E favorece ao desnovelamento das  $\alpha$ -hélices no domínio I, e a maior flexibilização (desdobramento) do domínio III (transição da forma N para F), principalmente em valores próximos ao pH 4,8 em solução de BSA 0,1%. Em pH menor que 3,5, observa-se a predominância da forma expandida da proteína (E). A transição da conformação N-F favorece à diminuição no conteúdo da estrutura ordenada (secundária), sendo que a BSA na forma de N é mais compacta em relação as demais formas, que tendem a serem mais expandidas (NUNES, 2016; FERREIRA, 2009; MICHNIK, et al., 2005).

Uma vez que a carga líquida da BSA pode ser alterada e até mesmo controlada pelo pH do meio, estudos da interação que envolve a BSA em diferentes valores de pH, com moléculas que apresentam funcionalidade, como o eugenol, que possui ação bactericida e ou bacteriostática, possui grande significância para a área de alimentos, pois permite avaliar e prever o valor de pH no qual a BSA como carreadora de eugenol, poderá ter maior estabilidade cinética e funcionalidade, bem como as possíveis finalidades deste nanossistema em diferentes segmentos da área alimentícia.

O pH é um fator que pode promover mudanças na densidade de cargas da BSA devido a protonação/desprotonação de grupos ionizáveis, bem como em sua carga líquida. Estas mudanças podem influenciar tanto as interações entre os segmentos da cadeia polipeptídica da BSA quanto as interações que esta proteína realiza com outras moléculas. (SILVA, 2015; KUN et al., 2009).

Nunes (2016), além de avaliar os parâmetros já reportados nesta questão de qualificação, também analisou o efeito da interação entre a BSA e o cinamato de metila (CM), pela mesma técnica de DLS, sobre as propriedades de superfície da proteína em diferentes valores de pH (3,5; 5,0 e 7,4), e evidenciou que a interação BSA-CM não teve contribuição de interação eletrostática, mas decorrente da mudança na conformação da BSA em função do pH, equalizando com os resultados preliminares obtidos.

Em suma, o efeito da temperatura e do pH do meio pode influenciar em diferentes propriedades na conformação da proteína e nas características da BSA como carreadora, tais como, energia de ligação, entropia, entalpia, sítios de ligação (interação estequiométrica), potencial zeta, diâmetro hidrodinâmico, dentre outras.

Estas mudanças podem influenciar de maneira significativa nas características da BSA em sua forma de interagir e carrear o eugenol, podendo

favorecer ou desfavorecer esta interação, e conseqüentemente influenciar na estabilidade e funcionalidade deste nanosistema(BSA-E) em decorrência das características de meio, tal como o pH e ou a temperatura.

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Percebe-se a importância do estudo da interação da BSA com o eugenol em detrimento a diferentes condições do meio, uma vez que durante o processamento de alimentos, a matriz alimentícia poderá passar por diferentes operações que podem alterar a temperatura e o pH.

Desta forma, o estudo da interação BSA-eugenol e das possíveis modificações na conformação e característica de BSA como carreadora, poderá possibilitar em melhores alternativas para que este sistema (BSA-E), possa apresentar maior estabilidade cinética e funcionalidade, ferramentas de grande importância para futuras aplicações tecnológicas para a área de alimentos.

## REFERÊNCIAS

ANJOS, J. L. V. et al. On the interaction of bovine serum albumin with ionic surfactants: Temperature induced EPR changes of a maleimide nitroxide reflect local protein dynamics and probe solvent accessibility. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 88, n. 1, p. 463–470, 2011.

BARACAT-PEREIRA, M.C. **Bioquímica de proteínas: fundamentos estruturais e funcionais**. Editora UFV, ed 1, Brasil, 2014. 298 p.

BANIPAL, T. S. et al. Physicochemical aspects of the energetics of binding of sulphanic acid with bovine serum albumin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 170, p. 214–225, 2017.

BOCCATO, V. R. C. Metodologia da pesquisa bibliográfica na área odontológica e o artigo científico como forma de comunicação. **Rev. Odontol. Univ. Cidade São Paulo**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 265-274, 2006.

CARTER, D. C.; HO, J. X. Structure of serum albumins. **Advances in Protein Chemistry**, v. 45, p. 153–203, 1994.

CELEJ, M. S. et al. Ligand-induced thermostability in proteins: Thermodynamic analysis of ANS-albumin interaction. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1750, n. 2, p. 122–133, 2005.

FERREIRA, E, S. **Interação da albumina do soro bovino ( BSA ) com substratos sintéticos**. 2009. 132 f. Tese (Doutorado em Ciência) - Universidade Federal de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2009.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Advanced Dairy Chemistry – Proteins**. 3rd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.

HE, X. M.; CARTER, D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. **Nature**, v. 358, n. 6383, p. 209–215, 1992.

INDYK, H. et al. An optical biosensor-based immunoassay for the determination of bovine serum albumin in milk and milk products. **International Dairy Journal**, v. 47, p. 72–78, 2015.

JATTINAGOUDAR, L. et al. Evaluation of the binding interaction between bovine serum albumin and dimethyl fumarate, an anti-inflammatory drug by multispectroscopic methods. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 156, p. 164–171, 2016.

KUN, R. et al. Isothermal titration calorimetric studies of the pH induced conformational changes of bovine serum albumin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 96, n. 3, p. 1009–1017, 2009.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**, 3a ed., Springer Science, 2006.

LIVNEY, Y. D. Milk proteins as vehicles for bioactives. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 15, n. 1–2, p. 73–83, 2010.

MICHNIK, A. et al. Stability of bovine serum albumin at different pH. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 80, p. 399–406, 2005.

MOREIRA, M. B. et al. Investigação da supressão de fluorescência de soro albumina bovina e humana por complexo de rutênio. **Química Nova**, v. XY, p. 1–6, 2014.

NUNES, N.M. **Termodinâmica de interação entre ácido cinâmico e cinamato de metila e albumina do soro bovino**. 2016. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2016.

PARK, K. Albumin: A versatile carrier for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 157, n. 1, p. 3, 2012.

REZENDE, J.P. **Nanossensor de polidiacetileno/copolímero tribloco para detecção de albumina do soro bovino**. 2015. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2017.

SILVA, C.E.L. Termodinâmica de interação entre betacaroteno e proteínas do leite. 2015. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2015.

TAYEH, N. et al. Fluorescence spectral resolution of tryptophan residues in bovine and human serum albumins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** **Journal of Pharmaceutical and Biomedical**, v. 50, p. 107–116, 2009.

ZHANG, Y.; ZHONG, Q. Effects of thermal denaturation on binding between bixin and whey protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 30, p. 7526–7531, 2012.

ZHAO, D. et al. Delivery of folate-decorated paclitaxel-loaded bovine serum albumin nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, p. 669–677, 2010.