



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA

Trabalho de conclusão de curso

**Estudo da conformação estrutural da albumina por
espectroscopia Raman**

Acadêmica: Franciele Zanoni
Orientadora: Prof^a. Dra. Francielle Sato

Maringá-PR

2018



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA

Trabalho de conclusão de curso

Estudo da conformação estrutural da albumina por espectroscopia Raman

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Departamento de Física,
da Universidade Estadual de Maringá,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de bacharel em Física

Acadêmica: Franciele Zanoni
Orientadora: Prof^a. Dra. Francielle Sato

Maringá-PR

2018

Sumário

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Introdução	1
1. Objetivo	3
2. Fundamentação Teórica	3
2.1 Proteínas e suas conformações.....	3
2.2 Proteína do ovo (Albumina).....	6
2.3 Espectroscopia Raman.....	8
2.3.1 Vibrações moleculares.....	10
2.3.1.1 Tipos de vibrações moleculares.....	12
2.4 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	13
3. Materiais e Métodos	15
3.1 Amostras de albumina.....	15
3.2 Espectroscopia Raman.....	15
3.2.1 Sistema de aquecimento para espectroscopia Raman.....	17
3.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	18
4. Resultados e Discussão	18
4.1 Análise Térmica.....	18
4.2 Espectroscopia Raman em temperatura ambiente.....	20
4.3 Espectroscopia Raman em função da temperatura.....	23
Conclusões	33
Referência Bibliográficas	34

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço à minha família e aos meus amigos de longa data, os quais mesmo à distância sempre se mostraram presentes, fornecendo o apoio e o amor incondicional para superar toda e qualquer dificuldade.

À Universidade Estadual de Maringá, por possibilitar novas amizades, interdisciplinaridades e a oportunidade de estudo na área de Física.

Agradeço também ao Departamento de Física e ao Comcap, por todo ensinamento e ajuda para a realização deste trabalho, em especial à minha orientadora Francielle Sato, por toda paciência, auxílio e incentivo, sendo estes essenciais para um maior amadurecimento, desenvolvimento científico e a permanência no curso.

E por último, mas não menos importante, às causas veganistas, cuja fizeram-me engajar fortemente neste assunto.

Resumo

A aplicação da espectroscopia Raman para estudos de aminoácidos em função da temperatura mostrou-se eficiente, assim como as análises térmicas com o Calorímetro Diferencial de Varredura (DSC). A espectroscopia por permitir a caracterização e identificação dos compostos referentes aos modos vibracionais da albumina da clara do ovo *in natura*, liofilizada e comercial, e as análises térmicas pela atribuição referente as taxas de degradação térmica das albuminas. Por meio da análise das deconvoluções gaussianas em regiões de interesse nos espectros Raman foram investigadas as posições e áreas das bandas atribuídas as estruturas α -hélice (amida I) e β -folha (amida III), as quais mostraram que mediante a variação de temperatura de 20 a 70 °C não ocorreu a transição da estrutura α -hélice para β -folha, mas sim um desordenamento destas estruturas, as quais alternaram sua predominância em diferentes temperaturas neste intervalo. Dentre as albuminas estudadas, a que mostrou maior discrepância de comportamento com relação à posição e à área dessas estruturas em função da temperatura foi a comercial, possivelmente por ser submetida a processos químicos e térmicos para fins comerciais. Tais processos também podem ter influenciado na clara de ovo manipulada em farmácia, a qual não foi submetida às análises térmicas por espectroscopia devido à ausência do pico atribuído à Fenilalanina.

Palavras-chave: Espectroscopia Raman, albumina, temperatura.

Introdução

Um dos alimentos de origem animal com alto teor protéico e de fácil acesso é o ovo. Como consequência, sua produção comercial para o consumo cresceu consideravelmente nos últimos anos em todo o mundo. No Brasil, o ovo tem se tornado cada vez mais presente na dieta diária dos brasileiros, mesmo seu consumo sendo inferior à média consumida em outros países [1].

Os ovos podem ser classificados em diferentes tipos e tamanhos, sendo em média, constituídos por aproximadamente 88 % de água e 12 % de proteínas [2]. Sua composição proteica é derivada de uma mistura de várias frações proteicas, porém, é a albumina, proteína encontrada na clara do ovo, que constitui a maior parte do peso do ovo [3].

São os aminoácidos presentes na albumina que otimizam o funcionamento e manutenção de nossos tecidos [4], e como consequência, o ovo tem se tornado uma fonte altamente proteica na ingestão de aminoácidos essenciais ao nosso organismo, seja na forma líquida, *in natura* ou em pó comercializada. Além disso, estudos comprovam que a albumina é altamente digestível, sendo superior até mesmo ao leite e a carne [4].

Por ser amplamente utilizados na comercialização de produtos, principalmente na confecção de bolos e seus derivados, e na suplementação para ganho ou perda de peso, chama nossa atenção por desempenhar uma determinada função biológica, seja no organismo ou em alimentos. Tal função não é mais exercida quando desnaturada, podendo ser até mesmo prejudicial à saúde. Portanto, nosso interesse é estudar a albumina da clara de ovo proveniente de processos diferentes para avaliar a conformação proteica mediante variações de fatores externos tal como a temperatura, visando também a compreensão do seu comportamento térmico com base na interação molecular, durante a transição da fase nativa à desnaturada.

Métodos de microscopia e ensaios biológicos são convencionais para o estudo de conformação de proteínas, dentre as quais destacam-se as técnicas espectroscópicas no infravermelho e no ultravioleta-visível (UV-vis) [5]. Na espectroscopia Raman utiliza-se o monitoramento do espalhamento inelástico que a radiação incidente sofre ao interagir com as moléculas da amostra, os quais fornecem informações sobre os modos vibracionais ou rotacionais das moléculas, provendo assim uma série de informações relacionada as estruturas secundárias polipeptídicas a partir da observação de suas bandas características [6].

Sob essa perspectiva, a espectroscopia Raman, que tem sido cada vez mais utilizada para a caracterização de compostos biológicos, no qual, não somente obtém informações sobre sua estrutura, e geometria molecular, como também destaca-se por sua aplicação em diferentes amostras [4, 7-8],

podendo ser utilizada para a identificação de substâncias orgânicas e inorgânicas e em análises de estruturas conformacionais que constituem uma proteína.

Métodos embasados em análises térmicas são capazes de analisar o comportamento térmico das proteínas por meio de detecções de mudanças de calor, associadas às propriedades físicas e químicas da amostra em função da temperatura e do tempo, portanto, podem servir como complemento em nível macroscópico, como é o caso do Calorímetro Diferencial de Varredura (DSC) [9].

Sendo assim, este trabalho de conclusão de curso objetivou a utilização do Calorímetro Diferencial de Varredura (DSC) e da espectroscopia vibracional Raman, os quais serviram para analisar as taxas de degradação térmicas das albuminas e para estudo das possíveis mudanças na conformação da proteína albumina *in natura*, comercial, liofilizada e albumina manipulada em farmácia, permitindo um estudo interdisciplinar relacionando conceitos físicos, biológicos e bioquímicos.

1. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi estudar as possíveis conformações da proteína albumina, a partir da clara de ovo de fresca, chamada de *in natura*, a clara de ovo liofilizada e clara de ovo em pó vendida em comércio local, chamada de comercial, mediante a variação de temperatura (20 a 70 °C) utilizando espectroscopia Raman e a Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC). Estudos posteriores visaram uma análise das conformações proteicas relativa à clara de ovo manipulada em farmácia. Os objetivos específicos foram compostos por: revisão bibliográfica sobre o tema do trabalho, aprendizado teórico e experimental acerca da espectroscopia vibracional, caracterização das albuminas em temperatura ambiente e análise térmica das mesmas, tanto por meio da espectroscopia Raman em função da temperatura quanto pela Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).

2. Fundamentação Teórica

Neste capítulo serão apresentados conceitos gerais sobre proteínas, em especial a albumina, bem como, sobre as técnicas utilizadas neste trabalho.

2.1 Proteínas e suas conformações

Todas as proteínas, independentemente de sua função biológica, são constituídas com o mesmo conjunto de 20 aminoácidos [10]. Caracterizados por um grupo amina (-NH) e um grupo carboxila (C=O) (Figura 2.1), diferem-se uns dos outros através de suas cadeias laterais ou grupos R.

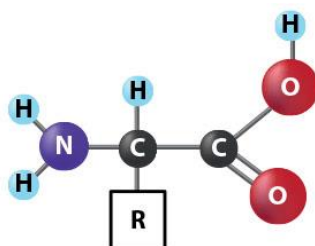


Figura 2.1: Representação da estrutura geral do aminoácido [10].

As proteínas são cadeias de aminoácidos, onde cada aminoácido está ligado aos seus vizinhos por ligação covalente. É através de uma sequência única de aminoácidos, denominada como peptídeos, distintos uns dos outros por sua sequência e números, que torna a proteína apta para executar sua determinada função no organismo [10].

Capazes de se unirem através de uma ligação peptídica, os aminoácidos formam peptídios e proteínas. Isto é, se unirmos covalentemente duas moléculas de aminoácidos, ocorrerá a ligação

peptídica, formando assim, um dipeptídeo. Com três moléculas de aminoácidos teremos um tripeptídeo e forma-se um polipeptídeo quando há o conjunto de muitos destes aminoácidos [10]. Uma ligação peptídica ocorre pela formação de água (reação de desidratação) de um grupo α - amino e um grupo α -carboxil entre dois aminoácidos [10], como mostra a Figura 2.2.

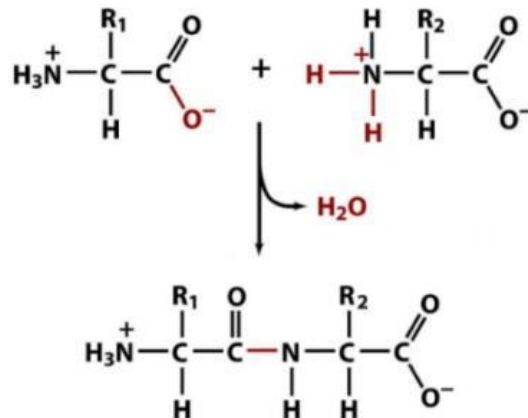


Figura 2.2: Representação esquemática da formação de uma ligação peptídica [1].

Tais sequências de aminoácidos acabam por originar uma proteína que podem ser classificadas em quatro níveis estruturais: Estrutura primária, estrutura secundária, estrutura terciária e estrutura quaternária (Figura 2.3).

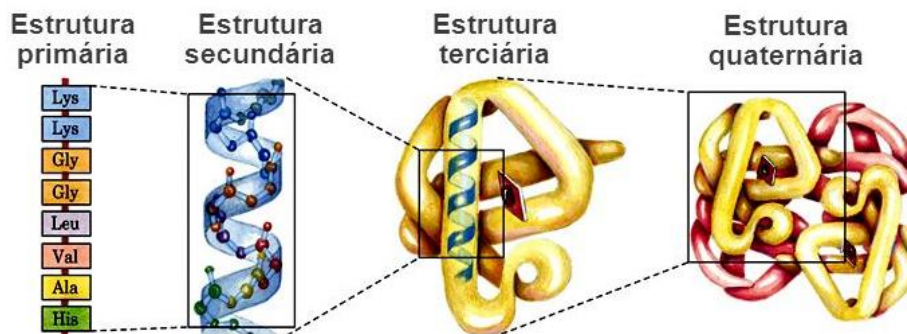


Figura 2.3: Representação das estruturas primária, estrutura secundária, dada pelo arranjo mais simples, isto é, conformação α -hélice, estrutura terciária e estrutura quaternária [13].

As proteínas, por estarem em seus estados nativos (conformação na qual a proteína existe em seu meio natural), começam a primeira etapa de sua vida na estrutura primária. É desta estrutura que dependem as funções biológicas das proteínas, pois a modificação de apenas um aminoácido, altera a estrutura primária e cria uma proteína diferente [11]. Esta proteína diferente pode ser inativa ou ter outra função biológica, no entanto, diferente da estrutura primária, representada por uma sequência linear de aminoácidos, as estruturas secundárias, terciárias e/ou quaternárias apresentam uma

estrutura espacial (tridimensional), onde suas moléculas são capazes de dobrar-se e enrolar-se em sua conformação proteica [10].

Resultante de ligações de hidrogênio que ocorrem entre o hidrogênio do grupo amino ($-NH$) e o oxigênio do grupo carbonila ($C=O$), a estrutura secundária, é caracterizada pela interação de seus aminoácidos, formando ligações intermoleculares através da cadeia polipeptídica que enovela-se sobre si mesma em formato de espiral. À esta conformação denomina-se α -hélice. Outro modelo estrutural diferente e estável para a proteína é a β -folha pregueada [11].

- Estrutura em α -hélice: A estrutura em α -hélice é o arranjo mais simples que uma cadeia polipeptídica pode assumir [10] (Figura 2.4 (A)). Nesse arranjo a cadeia de polipeptídeos é enrolada em torno de um eixo imaginário longitudinal (Figura 2.4 (B)), de modo que as cadeias laterais dos aminoácidos são projetadas para fora da hélice [12]. As ligações de hidrogênio entre as ligações peptídicas são fundamentais na estabilidade da hélice.
- Estrutura em β -folha pregueada: A estrutura em β -folha pregueada, assim como a α -hélice, também é sustentada pelas ligações de hidrogênio entre as cadeias polipeptídicas. Sendo estas as principais responsáveis pela estabilidade da estrutura. No entanto, sua formação se dá em forma de ziguezague, pois o esqueleto polipeptídico está estendido e arranjado paralelamente formando uma estrutura semelhante a pregas [10]. Uma representação da estrutura em β -folha pregueada comum em proteínas está mostrada na Figura 2.4 (C).

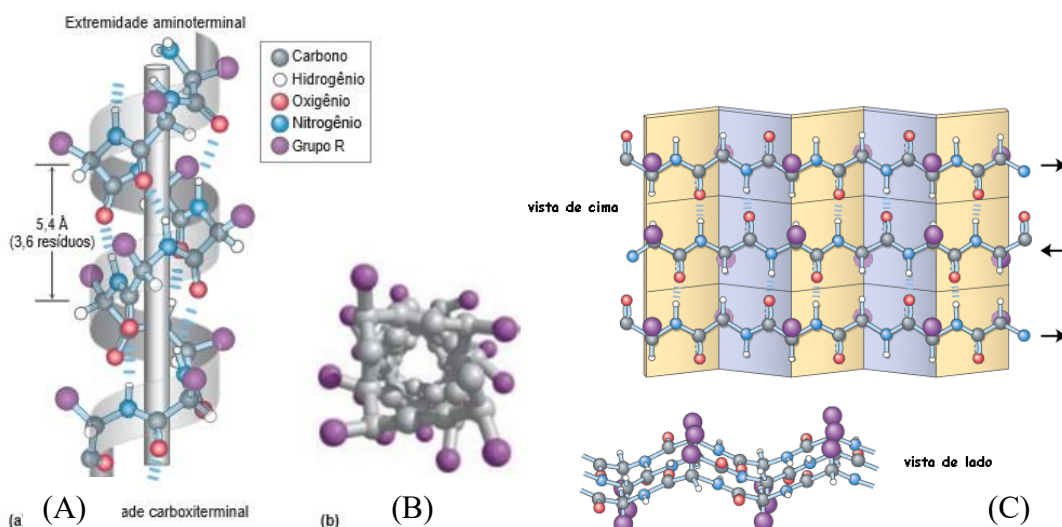


Figura 2.4: Representação da estrutura em α -hélice: (A) Estrutura em torno do eixo imaginário longitudinal; (B) visão transversal da hélice e (C) estrutura da β -folha [11].

Sendo a estrutura tridimensional completa do polipeptídeo, a estrutura terciária pode ser formada por vários tipos de estrutura secundária, de tal forma que sua estrutura está relacionada com o número de possibilidade de interações entre os grupos laterais, fazendo com que a proteína dobre-se ainda mais. Além dessa estrutura estão as proteínas que possuem mais de uma cadeia polipeptídica, caracterizadas pela estrutura quaternária. Embora a estrutura quaternária apresente um alto grau de enovelamento, alguns estudos sugerem a existência de estruturas mais complexas [10], porém, como a composição estrutural da albumina é aparentemente simples, um alto grau de complexidade em suas estruturas não se enquadra neste trabalho.

2.2 Proteína do ovo (Albumina)

Uma das proteínas de grande interesse, a albumina, está presente tanto no sangue quanto em alimentos, os quais utilizam amplamente sua composição para a comercialização de produtos por conta de seu alto valor nutricional e propriedades funcionais únicas. Uma mistura de aminoácidos contidas em suas proteínas torna a albumina altamente digestível, sendo superior até mesmo ao leite a carne [4].

Por conta de sua crescente implementação em nossas refeições ao longo dos anos, o ovo, podendo ser classificados em diversos tipos e tamanhos [14], é constituído por aproximadamente 88 % de água e 12 % de proteínas[2]. Sua composição proteica deriva de uma mistura de várias frações proteicas, de modo que o percentual de cada composição encontra-se na Tabela 2.1.

O teor percentual da constituição do ovo é, em média, de 65 % relativa à clara do ovo e 35 % à gema do ovo, e por conta de sua fácil separação as proteínas vêm sendo estudadas separadamente [15]. A clara do ovo é constituída principalmente pela ovalbumina que é rica em metionina, enquanto que a gema é constituída em maior quantidade pela ovovitellina, rica em arginina, lisina e leucina [16].

Porém, é a albumina, proteína encontrada na clara do ovo, constituída pela ovalbumina, conalbumina e ovomucóide, que constitui a maior parte do peso do ovo, cerca de 67% [3]. São os aminoácidos presentes na albumina que otimizam o funcionamento e manutenção de nossos tecidos [4], e como consequência, o ovo tem se tornado uma fonte altamente proteica na ingestão de aminoácidos essenciais ao nosso organismo.

Tabela 2.1 – Porcentagens aproximadas das respectivas composições proteicas constituintes do ovo [15].

Composição proteica do ovo inteiro (clara e gema)	
Ovalbumina	54 %
Conalbumina	13 %
Ovomucóide	11 %
Lisozima	3,5 %
Ovomucina	1,5 %
Flavoproteína	0,8 %
Ovoinibidor	0,1 %
Avidina	0,05 %
Proteínas não-identificadas	8 %

O alto teor proteico da albumina incentiva seu consumo, sendo cada vez mais presente em nossa dieta diária, seja *in natura* ou em pó comercializada. Sendo os ovos em pó comerciais, industrializados amplamente durante a segunda guerra mundial devido ao seu menor peso e tamanho, contribuindo assim, com a minimização das perdas em transportes provenientes da albumina *in natura* [4].

Observações sugerem que em climas tropicais uma degeneração em seu condicionamento e qualidade influenciam no sabor e compactação do pó, enquanto que em temperaturas mais amenas levam-se meses para que os efeitos da umidade interfiram em sua composição [4]. Em contrapartida, outras observações dão ênfase a uma maior vida útil dos ovos em pó, justamente por não necessitarem da refrigeração como a *in natura* [17]. Independentemente de seu estado físico ou tempo de vida, estudos mostram que a albumina comercial apresenta os mesmos aminoácidos essenciais que o ovo *in natura*, embora um menor teor de cistina seja notado [4].

No entanto, apesar de desempenhar uma determinada função biológica, seja no organismo ou em alimentos, pode ser prejudicial à saúde quando desnaturada, nesta conformação sua geometria molecular e funções biológicas são alteradas. Na desnaturação, perda da forma tridimensional de uma proteína (Figura 2.5), ocorre pela modificação de qualquer uma das estruturas espaciais, com exceção da estrutura primária, na qual os aminoácidos permanecem unidos na mesma sequência linear [11]. Desse modo, dependendo da estrutura espacial que constitui uma proteína, a desnaturação pode ser reversível, porém, para a albumina, ela é irreversível devido as mudanças de textura e cor quando aquecida. Alguns dos principais agentes físicos desnaturantes são causadas por: variações na temperatura, pH, luz e agitação [11].

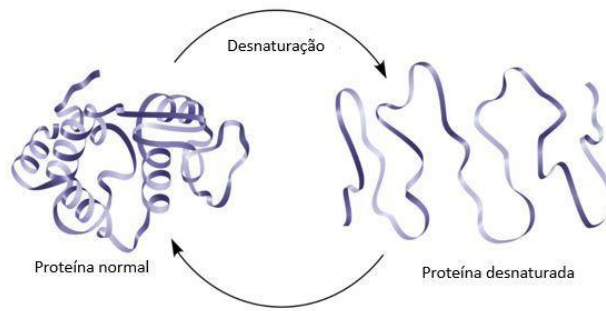


Figura 2.5: Representação espacial do processo de desnaturação de uma proteína normal [11].

Estudos sugerem que animais criados para fins de consumo humano que sofrem confinamento em condições inadequadas para sua criação, em locais específicos para tal fim, podem apresentar alterações na composição e qualidade em membros e órgãos destinados ao consumo, sendo em alguns casos, prejudiciais ao nosso organismo [18]. Em aves, os fatores de confinamento para produção de ovos, podem influenciar na composição e qualidade dos ovos [19, 1].

Tendo em vista a importância das proteínas de origem animal para a indústria de alimentos, o estudo de mudanças conformacionais nas mesmas, que podem decorrer com a variação de temperatura é de grande importância para saúde da sociedade, sendo os processos térmicos tanto no transporte quanto no período de criação ou produção um fator fundamental para as proteínas.

Neste viés métodos espectroscópicos são técnicas amplamente utilizadas para o estudo de macromoléculas, as quais dependem da interação radiação matéria. Dependendo da região espectral da radiação eletromagnética, é possível analisar proteínas em nível molecular, como no caso da região do infravermelho, que permite o estudo das vibrações moleculares dos componentes tanto de substâncias orgânicas como inorgânicas. Em particular, a espectroscopia vibracional Raman é uma técnica muito utilizada para o estudo de mudanças conformacionais em proteínas, o que motivou este trabalho de conclusão voltando sua aplicação para o estudo de possíveis mudanças conformacionais na albumina oriunda da clara de ovo em função da temperatura.

2.3 Espectroscopia Raman

Contribuições notáveis acerca da estrutura da matéria foram feitas a partir de métodos experimentais utilizando a espectroscopia, as quais nos fornecem informações das estruturas e interações moleculares que ocorrem quando a radiação interage com a matéria [20]. Em nível molecular, a interação da radiação com a matéria pode ocorrer por absorção, transmissão, reflexão ou espalhamento [21], podendo este último se elástico ou inelástico.

A espectroscopia Raman, relatado pela primeira vez em 1928 pelo físico indiano ChandrasekharaVankata Raman, é uma das espectroscopias que nos fornecem informações dos modos de vibração das moléculas com o material por espalhamento. Neste caso, a radiação, fração de energia absorvida, é espalhada inelasticamente e com frequência diferente da radiação incidente, de modo que a variação de frequência é dada pela diferença de energia entre dois estados vibracionais [21].

Portanto, há de ocorrer a absorção simultânea de um fóton incidente e a emissão de um fóton espalhado, podendo inicialmente a molécula se encontrar no estado fundamental ou excitado, sofrendo uma transição entre os níveis vibracionais da molécula.

Se o fóton não sofrer variação de frequência, pode resultar em um espalhamento elástico (Rayleigh), onde o fóton espalhado possui a mesma energia do fóton incidente. No entanto, se o fóton for espalhado com uma energia menor (Stokes) ou uma energia maior (anti-Stokes) que o fóton incidente, resulta em um espalhamento inelástico [20]. A Figura 2.6 representa estes mecanismos de espalhamento.

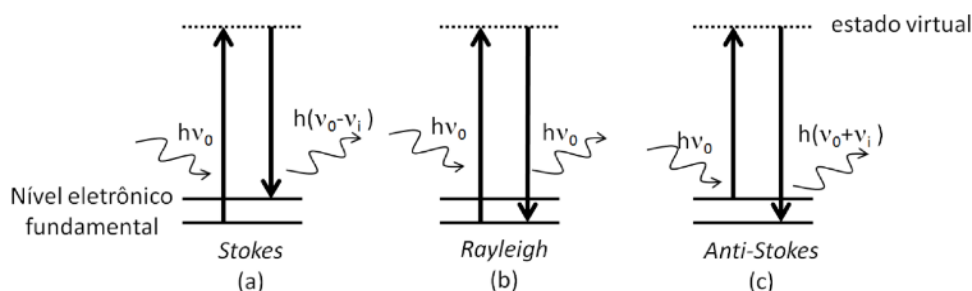


Figura 2.6: Mecanismos de espalhamento: (a) Raman Stokes; (b) Rayleigh; (c) Raman Anti-Stokes. Sendo $h\nu_0$ a energia do fóton que colide com a molécula, $h(\nu_0 + \nu_i)$ e $h(\nu_0 - \nu_i)$ são as energias de vibração da molécula [22].

No espalhamento Raman Stokes, a molécula, após sofrer espalhamento com um fóton, tem sua nuvem eletrônica perturbada pela componente de campo elétrico do fóton espalhado, de tal modo que passa por um processo de excitação do sistema indo de um estado fundamental para um nível de energia intermediário, chamado virtual, o qual só existe mediante a radiação incidente, e em seguida decai para um nível excitado. Já no espalhamento Rayleigh, ela atinge um nível virtual de energia, mas decai para o nível de energia inicial. Por fim, no espalhamento Raman anti-Stokes, a molécula que já se encontrava em um estado excitado, volta ao estado fundamental após o espalhamento com o fóton. A intensidade do sinal do espalhamento anti-Stokes é menor, pois é menor a probabilidade de se encontrar uma molécula em um estado excitado, porém os níveis vibracionais são os mesmos para o espalhamento Stokes e anti-Stokes. Para ambos os casos ocorre um deslocamento Raman que é dado pela diferença de energia entre os fótons espalhado e incidente, correspondendo às diferenças

de níveis de energias específicos para cada amostra [20].

Dependendo do tipo de espalhamento, correspondendo à criação de um fóton (Stokes) ou à destruição (absorção) do mesmo (anti-Stokes), ocasionará um deslocamento Raman acima e/ou abaixo da energia do fóton espalhado em relação ao fóton incidente. Assim, quando as moléculas apresentam pequena diferença de energia entre os diversos estados vibracionais ou rotacionais ocorre a radiação no infravermelho, de modo que um espectrômetro coleta a luz espalhada convertendo-o em forma de espectro, caracterizado por bandas definidas ou menos definidas conforme a região espectral.

Desse modo, para que o modo de vibração seja Raman ativo, isto é, presente espalhamento Raman, é necessário que durante a interação da radiação incidente (luz monocromática) com a molécula, a regra de seleção no efeito Raman seja satisfeita. Para isso deve ocorrer uma variação na polarizabilidade molecular devido ao campo elétrico incidente [23]. A polarizabilidade é definida como sendo o grau de deformação de uma ligação, portanto, as distribuições de carga positiva e negativa da molécula são influenciadas pelo campo elétrico, que por consequência de suas vibrações moleculares, deformam sua nuvem eletrônica, reemitindo radiação ao retornarem ao seu estado original.

O campo elétrico da radiação incidente \mathbf{E} induz um momento de dipolo \mathbf{P} na molécula, dado por: $\mathbf{P} = \alpha\mathbf{E}$, sendo α a polarizabilidade, de modo que ao ocorrer uma excitação vibracional durante o espalhamento fóton-molécula, a distribuição eletrônica da molécula pode ser alongada ou comprimida devido à radiação incidente resultando na variação da polarizabilidade.

2.3.1 Vibrações moleculares

O movimento da molécula no espaço, como um todo, é dado por translações do seu centro de massa, de forma que os átomos se movem em conjunto. Uma representação desses movimentos translacionais em três graus de liberdade, nas coordenadas x, y e z, é mostrada na Figura 2.7. Esse movimento conjunto ocorre tanto para rotações quanto para translações, porém, diferente da translação, a rotação de uma molécula tem seu centro de massa fixo, os quais movem-se um em relação ao outro [24]. São esses movimentos que fixam o centro de massa da molécula que denominamos vibrações moleculares.

Deformações angulares e alongamento de ligações são ocasionadas por tais movimentações moleculares, separando em modos normais de vibração de acordo com os níveis de energia [23]. Um modo normal de vibração é tal que, cada núcleo realiza uma oscilação harmônica simples em torno de sua posição de equilíbrio e os conjuntos de núcleos se movem em fase com mesma frequência,

porém o centro de massa da molécula como um todo não muda [23]. Os átomos em uma molécula podem também mover-se entre si, ou seja, um átomo pode sair do seu plano ou ter uma variação em seus comprimentos de ligações. Essas características estão relacionadas com movimentos de flexão e alongamento que são chamados de vibrações.

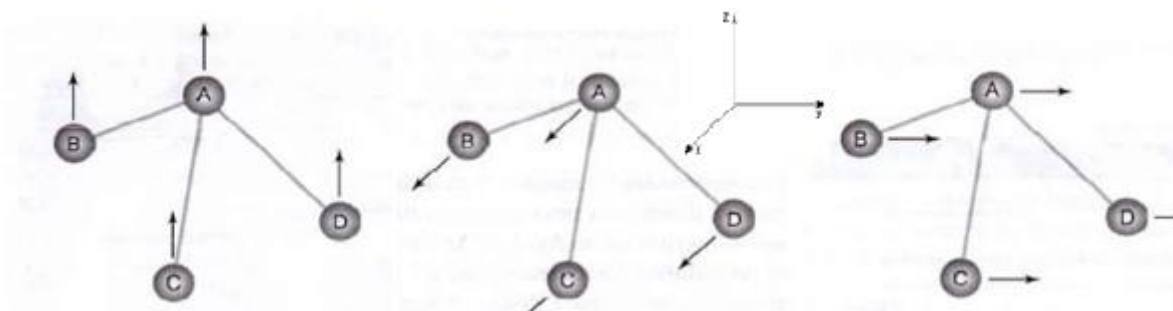


Figura 2.7 – Representação do movimento translacional da molécula como um todo, em três graus de liberdade [24].

Uma partícula que realiza um movimento translacional pode ser descrito por 3 coordenadas (x,y,z), de modo que haverá 3 graus de liberdade correspondentes às suas posições no espaço. Portanto, um sistema no qual há N átomos terá um total de $3N$ graus de liberdade relativo à posição de cada um desses átomos. Independente do movimento, seja o átomo não agrupado e livre em três dimensões ou ligados entre si, formando uma molécula, os $3N$ graus de liberdade continuarão existindo [24]. São estes graus de liberdades que nos dão informações acerca de seus modos normais de vibração [21].

Desse modo, para moléculas não lineares, haverá três graus de liberdade equivalentes à sua rotação e três graus de liberdade em torno de três eixos perpendiculares, logo tem-se $3N-6$ graus de liberdade para as vibrações (Figura 2.8 (b)). Para moléculas lineares não há rotação em torno do eixo internuclear, restando $3N-5$ graus de liberdade para as vibrações, essa falta é compensada por um grau de liberdade vibracional extra (Figura 2.8 (a)). Isso ocorre quando uma vibração é perpendicular à outra vibração de mesma frequência e mesma energia, provocando a degenerescência [21].

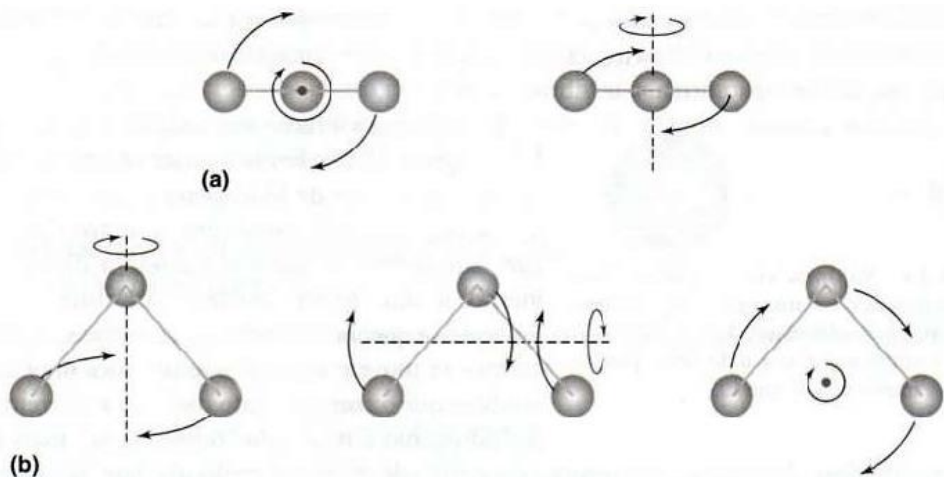


Figura 2.8: Representação das rotações nos $3N$ graus de liberdade: (a) duas para moléculas lineares e (b) três para moléculas não lineares [24].

Para moléculas diatômicas, lineares, tem-se apenas um único modo normal da ligação, de distensão e compressão alternadas, chamado de estiramento. O que representa um grau de liberdade vibracional, como mostrado na Tabela 2.2.

Tabela 2.2: Graus de liberdade para molécula monoatômica, molécula linear e molécula não-linear [21].

	Monoatômica	Molécula linear	Molécula não-linear
Translação (x, y, z)	3	3	3
Rotação (x, y, z)	0	2	3
Vibração	0	$3N-5$	$3N-6$
Total	3	$3N$	$3N$

2.3.1.1 Tipos de vibração molecular

Os modos de vibrações normais $3N-6$ e $3N-5$ que uma molécula apresenta podem ser classificados quanto ao tipo de vibração, podendo ser simétricas (estiramento em fase) ou assimétricas (estiramento fora da fase). As vibrações angulares podem ainda estar no plano ou fora do plano.

- No estiramento a vibração ocorre ao longo do eixo de ligação a qual resulta em um alongamento e encurtamento contínuo da ligação. Quando é simétrico, os átomos se afastam e se aproximam do átomo central ao mesmo tempo. Já as vibrações assimétricas ocorrem de forma alternada em relação ao seu átomo central, enquanto um átomo se afasta o outro se aproxima (Figura 2.9 (a)).
- Nas deformações angulares o movimento entre três átomos é resultante da variação entre seus ângulos de ligação. No plano, sua vibração simétrica resulta do movimento de dois átomos em direções opostas em relação ao átomo central, aumentando ou diminuindo seu

ângulo de ligação (movimento de tesoura s), movimentações angulares no mesmo sentido (balanço r) decorrem de vibrações assimétricas. Para fora do plano os átomos podem apresentar movimentos ora para frente e ora para trás do plano (abano w) ou na mesma direção (torção τ), indicando assim, vibrações simétricas e assimétricas, respectivamente (Figura 2.9 (b)).

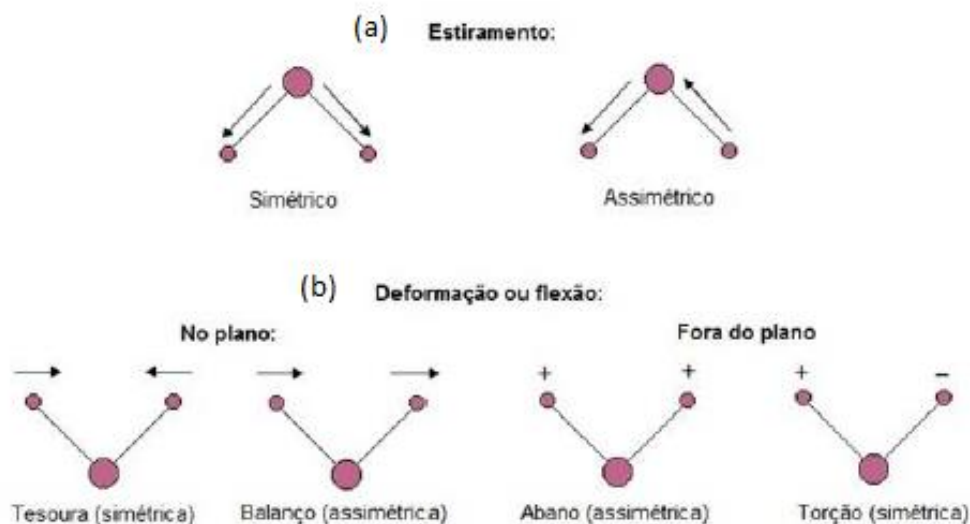


Figura 2.9: Modos de vibrações moleculares de estiramento e deformação [24].

2.4 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As macromoléculas, tais como as proteínas e os lipídeos, quando submetidas a uma indução de temperatura, possuem a capacidade de resistir a mudanças conformacionais, de modo que ocorra apenas uma reorganização estrutural resultante da absorção do calor [25]. Tal absorção são registradas por calorímetros. Sendo assim, análises térmicas são essenciais para análise do comportamento térmico de um material, pois é por meio de detecções de mudanças de calor, associadas às propriedades físicas e químicas de um material em função da temperatura e do tempo, que se pode analisar tais processos [9].

Existem diferentes técnicas voltadas para análises térmicas, dentre elas a Termogravimetria (TG) que tem como objetivo investigar a massa de uma amostra em função da temperatura e do tempo, a Análise Térmica Diferencial (DTA), que detecta mudanças na propriedade da amostra relacionando a alterações de temperatura e a Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) que analisa a diferença da taxa de fluxo de calor na amostra, permitindo a determinação de calor específico e entalpias de transformação de fase [26].

O princípio de medição na técnica de DSC se baseia na taxa de fluxo de calor, entre a amostra

e um material utilizado como referência, sujeitos a uma alteração de temperatura [9], portanto, mudanças ocasionadas no fluxo diferencial da amostra, sendo por absorção ou evolução do calor, nos fornecem picos, que nos diz à qual evento térmico se deve atribuir. À essa formação de picos damos o nome de transição de primeira ordem e isso ocorre quando o material está sujeito a uma transição, ocorrendo uma variação de entalpia, sendo endotérmica ou exotérmica [9]. Existem também as transições de segunda ordem, nos quais não apresentam picos nas curvas de DSC por consequência de sua entalpia não variável. No entanto, tais transições geram deslocamento na linha de base (Figura 2.10).

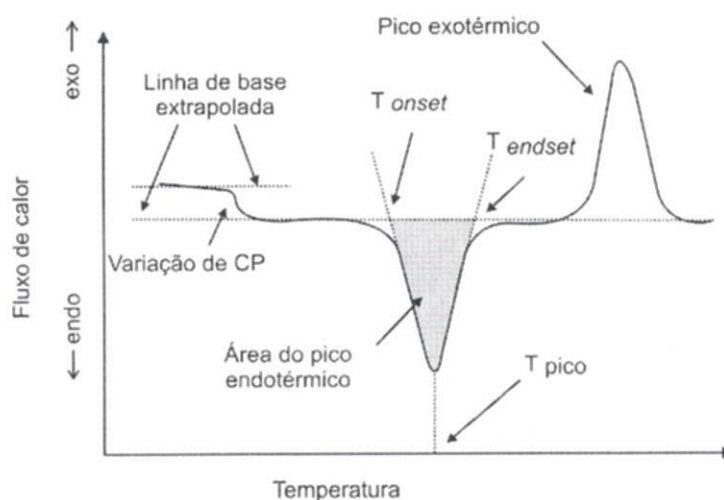


Figura 2.10 – Curva de DSC mostrando picos de primeira e segunda ordem [27].

A técnica de DSC é uma excelente técnica para a caracterização e estabilidade de uma proteína em sua forma nativa, podendo nos fornecer dados acerca da desnaturação térmica da mesma [25]. O sistema consiste de forma que a amostra e a referência são ambas dispostas sobre uma placa condutora e aquecidas a mesma temperatura, logo, a determinação e medição do fluxo de calor se dá por essa placa condutora e sensores térmicos, os quais captam a diferença de capacidade térmica entre a amostra e a referência [26]. A representação deste esquema está na Figura 2.11.

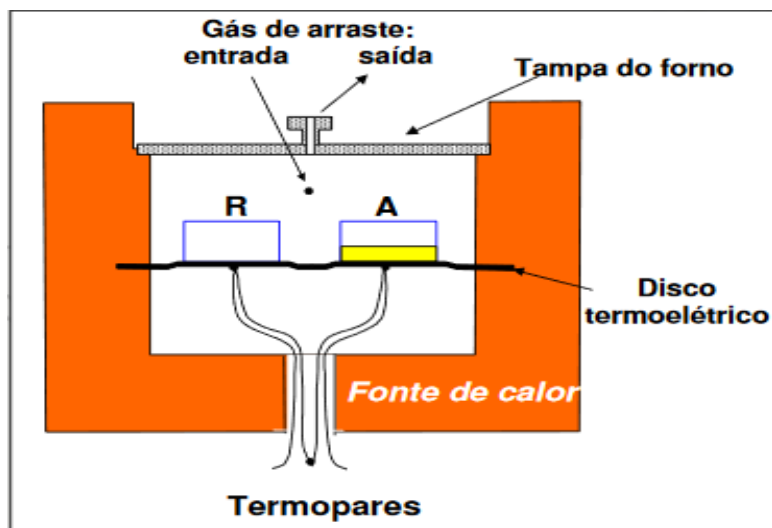


Figura 2.11 – Esquema de um analisador térmico de DSC por fluxo de calor [28].

3. Materiais e Métodos

Neste capítulo serão apresentadas as amostras utilizadas e as condições de medida para cada uma das técnicas empregadas neste trabalho.

3.1 Amostras de albumina

As amostras utilizadas neste trabalho foram de claras frescas de cinco ovos (*in natura*), sendo os ovos coletados de uma única ave devido as diversas variáveis quando analisadas as claras frescas avulsas, a clara de ovo liofilizada pela Profa. Dra. Paula Toshimi M. Pintro do Departamento de Agronomia/UEM, clara de ovo em pó adquirida no comércio local (comercial), porém sem procedência e valores nutricionais conhecidos e albumina de clara de ovo manipulada em farmácia de manipulação (manipulada). Todas as amostras, com exceção da manipulada, foram submetidas a análises por espectroscopia Raman em função de temperatura. Os espectros Raman das claras de ovos frescas apresentados são uma média de três amostras de ovos.

As amostras comercial, manipulada e *in natura* foram as únicas submetidas à análise térmica, sendo a quarta amostra de ovo utilizada para este fim e a quinta para fins de caracterização inicial.

3.2 Espectroscopia Raman

As análises foram realizadas utilizando excitação em 532 nm e 1064 nm sendo assim foi necessária a utilização de dois espectrômetros Raman: microscópio Raman confocal (SENTERRA,

Bruker, Alemanha) e por transformada de Fourier - FT-Raman (Bruker, Vertex 70v- Ram II module, Alemanha). A utilização de dois comprimentos de onda de excitação deu-se por dois fatores principais: (i) algumas amostras apresentavam luminescência para um dos dois comprimentos de onda prejudicando a aquisição do sinal Raman e (ii) a utilização do sistema de aquecimento para medidas *in situ* só foi possível utilizando o microscópio Raman devido ao espaço físico adequado para a montagem. Ambos os espectrômetros pertencem ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP-UEM). A seguir descrevemos alguns detalhes das configurações experimentais utilizadas com cada equipamento.

No microscópio Raman confocal (micro-Raman) (Figura 3.1 (a)), deve-se primeiramente destacar que somente a radiação dispersada pela área focada é detectada (plano confocal 2). Isso elimina a radiação dispersada por uma área menos focada (plano confocal 1), pois estas são bloqueadas pela abertura confocal. A abertura confocal pode ser na forma orifício ou fenda retangular, como mostrado na esquematização da Figura 3.1 (b).

Para a realização das medidas foi selecionado o comprimento de onda para excitação em 532 nm, com potência nominal de 20 mW, sendo focado na amostra por uma lente de magnitude de 20 x. Essa lente coleta o espalhamento Raman e o conduz ao detector (CCD). Uma fenda retangular de 50x1000 μm foi selecionada para a abertura confocal garantindo que camadas abaixo da superfície fossem medidas. Os dados espectrais foram adquiridos utilizando o programa OPUS® 7.2 configurado a uma resolução espectral de 3-5 cm^{-1} na região entre ~ 1700 -200 cm^{-1} , com 3 s de tempo de integração e uma média de 100 varreduras. Todas as amostras de albumina foram submetidas a este equipamento quando houve medidas em função de temperatura.

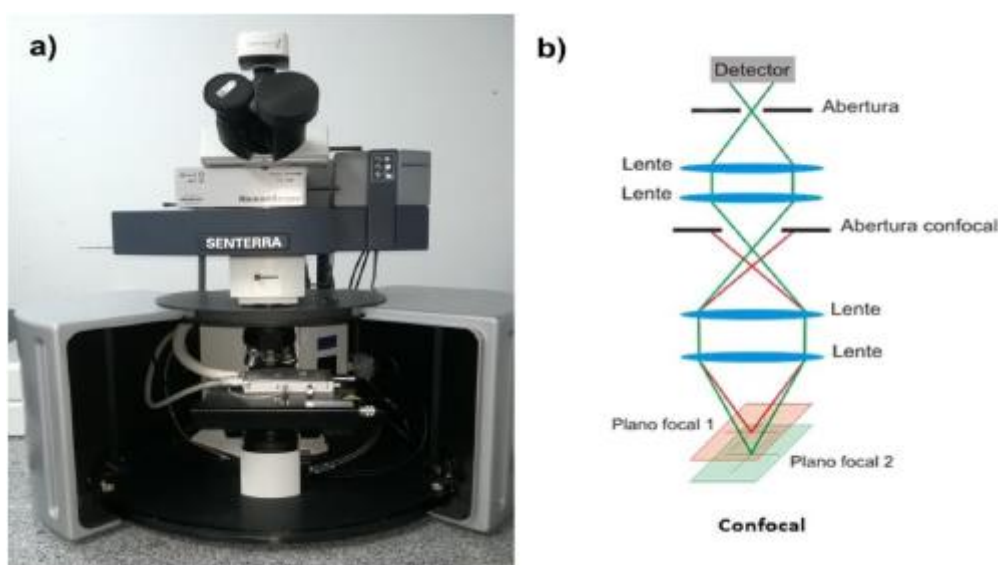


Figura 3.1: Espectrômetro Raman confocal (a). Figura esquemática do sistema confocal de captação de radiação (b)

[29].

No espectrômetro FT-Raman (Figura 3.2) foi utilizada excitação no comprimento de onda de 1064 nm com potência nominal de 500 mW. Os dados obtidos foram registrados por um computador via programa OPUS® 6.5, no qual os interferogramas são convertidos em espectros Raman por transformada de Fourier. A resolução espectral utilizada foi de 4 cm^{-1} , medidos entre $4000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$, configuradas para obter um espectro com média de 150 varreduras para as albuminas comercial e liofilizada e 200 varreduras para a albumina *in natura*, visto que por consequência de sua forma líquida maiores quantidades de ruídos eram apresentados quando submetida à médias de varreduras menores ou similares às outras amostras.

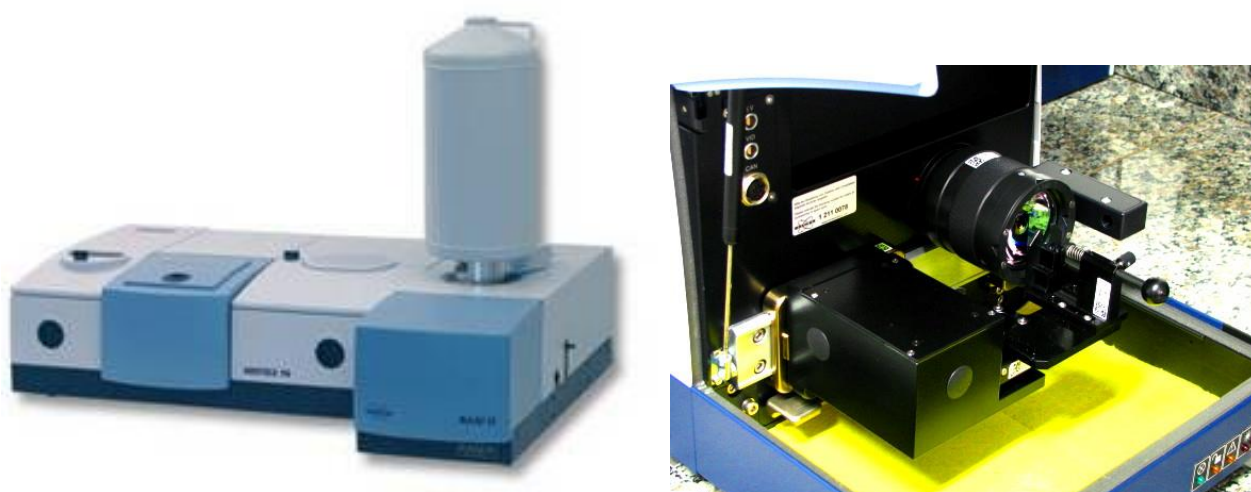


Figura 3.2: Espectrômetro FT-Raman e no seu compartimento de amostra [30].

3.2.1 Sistema de aquecimento para Espectroscopia Raman

As medidas foram feitas em um sistema de aquecimento composto de um controlador de temperatura (Lake-Shore, modelo 331), uma fonte de alimentação digital (Dawer PS-3003D) e um porta amostras em contato com um *peltier* (Figura 3.3). O porta amostra foi posicionado sobre a plataforma motorizada do microscópio Raman para a realização das medidas em função da temperatura.



Figura 3.3 – Sistema de aquecimento em conjunto com o Microscópio Raman.

A variação de temperatura foi de 20°C (temperatura ambiente) até 70 °C com incrementos de 5 em 5 °C, sendo o tempo para estabilização em cada temperatura de medida de aproximadamente 10 min. O limite máximo de temperatura foi limitado as condições de operação do *peltier* utilizado neste trabalho.

3.3 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As medidas foram realizadas em um calorímetro (Q20, TA instruments, USA) pelo Professor Dr. Guilherme Miranda Pereira do Departamento de Química/UEM no COMCAP-UEM. A amostra da albumina em pó comercial, manipulada e *in natura* foram condicionadas em porta amostra de alumina, sendo submetidas a uma taxa de aquecimento de 10°C/min, ocorrendo um processo de aquecimento e resfriamento num intervalo de temperatura ambiente à 200°C. A atmosfera de aquecimento foi controlada com um fluxo de ar de 50 ml/min.

4. Resultados e Discussão

4.1 Análise Térmica

Para determinar a temperatura na qual as amostras não sofressem degradação térmica, isto é, sem apresentarem uma discrepância de espectros entre uma temperatura à outra ao serem posteriormente submetidas as análises por espectroscopia Raman em função da temperatura, foi utilizada a técnica de DSC. Tal técnica foi utilizada para a albumina comercial, manipulada e *in natura*. Na albumina comercial foi observado no termograma (Figura 4.1) um pico de degradação

térmica próximo à 150 °C, próxima a temperatura de degradação térmica da albumina descrita na literatura em 145 °C [31], após sua degradação efeito térmico observado é irreversível, com pode ser observado na curva de resfriamento.

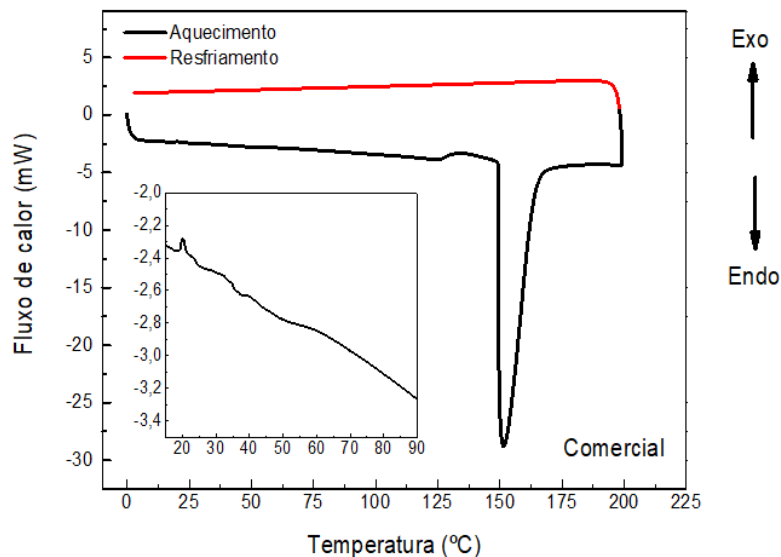


Figura 4.1 –Termograma de DSC da albumina comercial no intervalo de 0 à 200 °C.

Na Figura 4.1 há um detalhamento na região entre 15 e 90 °C, no qual pode-se observar um pico exotérmico, entre 18 e 22 °C e possíveis transições entre 23 e 65°C, porém estas características não estão descritas na literatura. O que foi relatado são picos endotérmicos em ~ 60 e 90 °C referentes a desnaturação de outras proteínas constituintes da albumina em clara de ovos frescos [32-33]. Entretanto, no termograma da clara de ovo comercial não foram observadas as mesmas temperaturas características, possivelmente o processo de produção da clara de ovo em pó comercial, que geralmente incluem pasteurização, eliminação de açúcares no ovo para evitar o escurecimento não-enzimático e desidratação [34], pode ter influenciado nos efeitos de desnaturação descritos para a clara de ovo *in natura*. Medições posteriores aferidas para a albumina manipulada (Figura 4.2) também não mostraram picos entre 60 e 90°C, indicando que os processos de produção podem influenciar na desnaturação protéica.

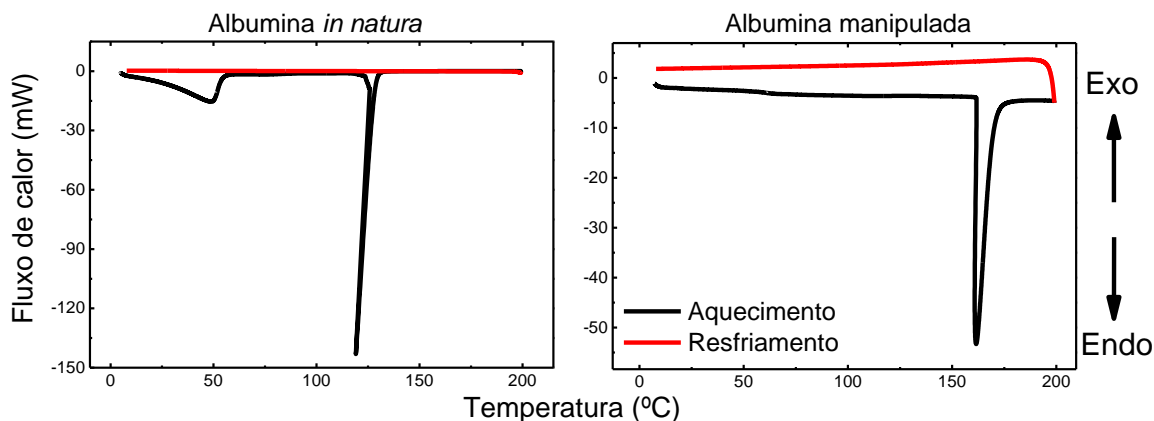


Figura 4.2 – Termograma de DSC nas albuminas *in natura* e manipulada no intervalo de 0 à 200 °C.

Na Figura 4.2 nota-se que a albumina *in natura* apresenta um pico de degradação próximo à 121 °C, enquanto que a albumina manipulada mostra-se mais relativa à comercial, de modo que sua degradação ocorre em torno de 160 °C. Possivelmente o processamento pelo qual as amostras em pó passaram são indicativos que realçam e influenciam em suas degradações, ocorrendo em tempos maiores e em temperaturas posteriores que a albumina *in natura*. Para a albumina *in natura* nota-se ainda um pico endotérmico, entre 10 à 60 °C, tal pico pode ser atribuído tanto ao DSC, induzido por um não equilíbrio inicial entre a amostra e a referência quando submetidas ao mesmo fluxo de calor ou mesmo ao processo de perda de água da albumina, o qual pode variar de ovo para ovo. Outra possível atribuição relaciona-se à uma transição de primeira ordem nas proximidades de 60 °C, relativa a uma desnaturação por partes de outras proteínas constituintes da albumina [32, 33].

4.2 Espectroscopia Raman em temperatura ambiente

A obtenção dos espectros em temperatura ambiente (~21 °C) das albuminas provenientes da clara do ovo, *in natura*, liofilizada e comercial se deu tanto por meio do FT-Raman quanto por Micro-Raman. O FT-Raman por apresentar menor contribuição quanto à luminescência, foi utilizado com o intuito de caracterizar os principais grupos funcionais que constituem as albuminas, entre a região espectral de 4000 à 400 cm^{-1} (Figura 4.3). Enquanto que o Micro-Raman foi utilizado posteriormente, com o intuito de analisar as albuminas mediante variação de temperatura, uma vez que a mesma medida não é possível no espectrômetro FT-Raman utilizado neste trabalho. Após as medidas com os comprimentos de onda de excitação em 532 nm e 1064 nm, Micro-Raman e FT-Raman, respectivamente, notamos que a contribuição da luminescência nos espectros Raman não prejudicaram as análises, sendo assim daqui em diante não diferenciamos os espectrômetros utilizados.

Comparando as bandas Raman observadas, às assinaturas espectrais encontradas na literatura científica, observou-se que grupos funcionais relativamente importantes na estruturação de aminoácidos, como o CH, CH₂ e CH₃, estavam presentes, assim como a fenilalanina (Phe), a tirosina (Tyr) e o triptofano (Trp), que constituem modos vibracionais simétricos em relação à cadeia lateral aromática [35]. Na Tabela 4.1 estão as posições dos centros (X_c) das principais bandas Raman e suas atribuições químicas para as albuminas estudadas neste trabalho.

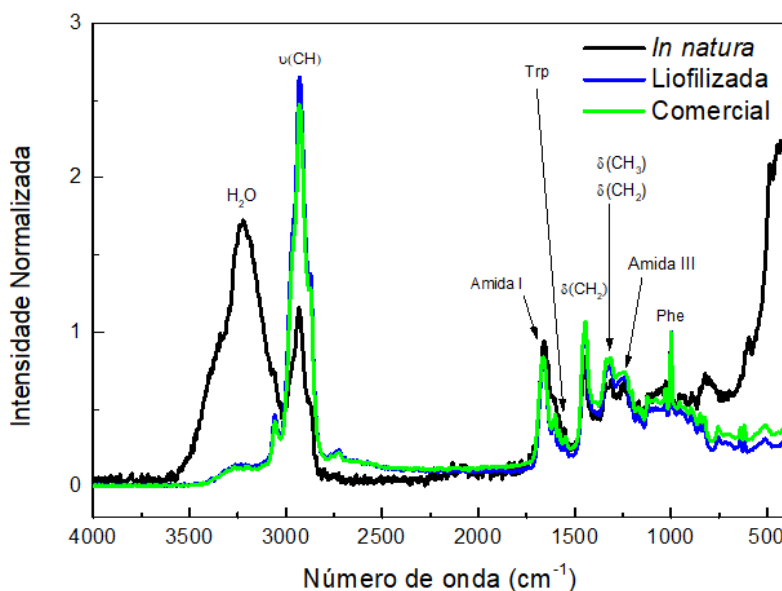


Figura 4.3 – Espectro Raman das albuminas *in natura*, liofilizada e comercial. Normalizados em intensidade na banda da Fenilalanina (Phe).

Na Figura 4.3 observa-se a intensa contribuição de água na albumina *in natura*, sendo ~88% do ovo constituído deste elemento, enquanto que uma menor contribuição nas demais albuminas derivam dos efeitos adversos da pasteurização, desidratação e liofilização.

Deslocamentos de bandas características entre as albuminas são observadas em toda a região espectral, os quais podem ser atribuídos às suas proteínas que derivam de claras ovos diferentes, porém, os mesmos grupos funcionais são observados entre si, mostrando que lhes é uma característica intrínseca.

A Figura 4.4 mostra um detalhamento da região espectral entre 1760-480 cm⁻¹, considerada a impressão digital de macromoléculas, na qual pode-se observar aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr, Trp) com bandas em 1612–1601, 1554, 1204, 1168, 999, 849, 824, ~639 e 617 cm⁻¹. Bandas provenientes de comprimento de número de onda mais baixo possuem uma melhor visualização na albumina comercial e liofilizada, visto que por consequência da solubilidade da albumina *in natura*, seu espalhamento Raman fica comprometido devido ao espalhamento elástico, tornando-se maior a presença de ruídos em toda a região espectral. As intensidades relativas dessas bandas estão

associadas aos correspondentes níveis de aminoácidos nas proteínas e no ambiente molecular à volta de seus grupos vibratórios [36], assim como a intensa banda atribuída à Phe em 999 cm^{-1} , associada ao anel de benzeno [6]. A Tabela 4.1 mostra as bandas Raman observadas para a albumina comercial, sendo esta considerada como um padrão de referência com relação as outras duas albuminas.

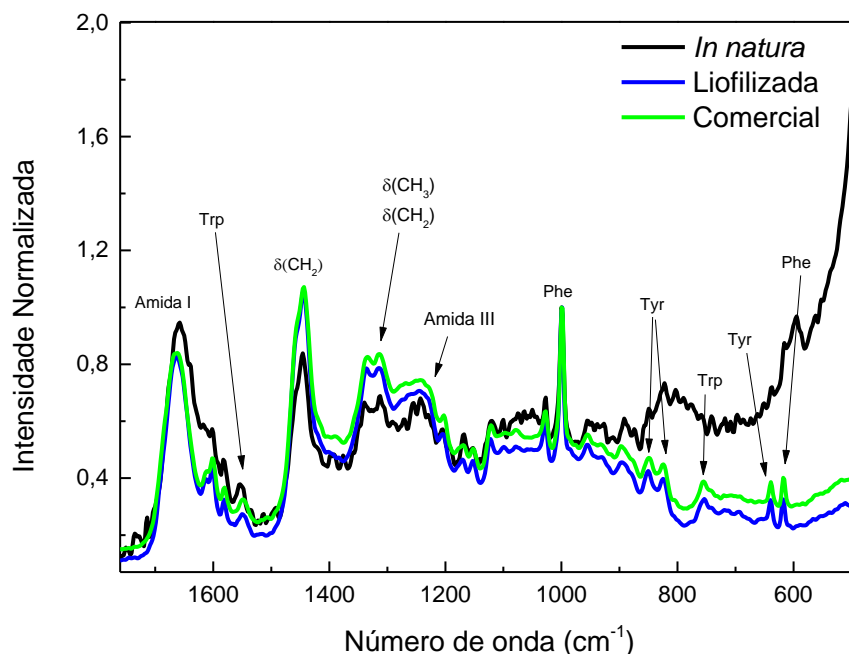


Figura 4.4 - Detalhe do espectro Raman das albuminas *in natura*, liofilizada e comercial na região aproximada de 1760-480 cm^{-1} . Normalizados em intensidade na banda da Fenilalanina (Phe).

Espectroscopia vibracional é sensível à estrutura e conformação molecular de proteínas, sendo o espectro de uma proteína constituído principalmente de bandas sobrepostas provindas de vibrações peptídicas. Sendo assim, há três principais regiões nos espectros Raman que associam-se às vibrações de uma proteína e correlacionam-se às suas conformações proteicas: A região de amida I ($1700\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$), proveniente do alongamento $\text{C}=\text{O}$; a região da amida III ($1230\text{-}1280\text{ cm}^{-1}$), dado pelas combinações em fase e deformações no plano N-H e C-H ; e a região da amida II, no qual não se mostra visível devido à ausência de excitação de ressonância [37]. Da mesma maneira que os aminoácidos aromáticos, a região que compreende as amidas também faz parte da impressão digital de proteínas (Figura 4.4).

O monitoramento das posições das bandas Raman características em tais regiões nos provém informações acerca de suas principais estruturas secundárias (α -hélice, β -folha, β -volta e randômica), que podem diferenciar-se em forma e posição. Devido à alta sensibilidade proteica, as regiões da amida I e III foram selecionadas para posteriores análises mediante variação de temperatura.

Tabela 4.1: Atribuição química e posição do centro (X_c) das principais bandas Raman [35, 36].

$X_c(\text{cm}^{-1})$	Atribuição química
2929	$\nu(\text{CH})$
1661	(C=O) Amida I: α -hélice
1602	$\nu(\text{C}=\text{C})$: Tyr, Trp, Phe
1580	Trp, Phe, Tyr
1547	Trp (anel de indol)
1445	$\delta(\text{CH}_2)$
1332	$\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH}_3)$
1233	Amida III
1205	Phe/Tyr
1170	$\delta(\text{CH}_2)$, Tyr
1152	$\delta(\text{NH}_3^+)$, $\delta(\text{CH})_{\text{anel}}$: Phe, Tyr
1121	$\nu(\text{C}-\text{C})$, $\nu(\text{CN})$: α -hélice
1098	$\nu(\text{CC})$, $\nu(\text{CN})$, $\delta(\text{CH})$
1079	$\nu(\text{CC})$, $\nu(\text{CN})$
1026	$\delta(\text{CH})$: Phe
999	$\delta(\text{CH})_{\text{anel}}$: Phe
955	$\nu(\text{CC})$, $\nu(\text{CN})$
930	$\nu(\text{CC})$, $\nu(\text{CH})$: α -hélice
897	$\nu(\text{CC})$, $\nu(\text{CH})$
849	$\delta(\text{CH})_{\text{anel}}$: Tyr
824	Tyr
754	Trp
639	Tyr
617	Phe

Símbolos: ν : estiramento; δ : deformação angular; s: simétrico; as: assimétrico;

4.3 Espectroscopia Raman em função da temperatura

Já nas medidas de espectroscopia Raman em função da temperatura, as quais foram feitas para temperaturas menores que o intervalo de degradação térmica obtido nos espectros de DSC, notou-se sem exceções, deslocamentos por toda a região espectral conforme o aumento de temperatura, além de suas estruturas microscópicas mostrarem-se muito distintas entre si. A Figura 4.5 apresenta espectros Raman em diferentes temperaturas. As variações de temperatura foram de 5 em 5 °C, porém para as análises utilizamos apenas os espectros em 20, 30, 40, 50, 60 e 70 °C, uma vez que as temperaturas intermediárias comportaram-se de modo similar.

Estudos de mudanças conformacionais em proteínas por espectroscopia Raman, usualmente se baseiam na observação dos comportamentos de duas bandas em específico, a banda de amida I (1650-1689 cm^{-1}) e amida III (1220-1280 cm^{-1}) [38-39], as quais foram analisadas neste trabalho, visto que

mudanças ocorriam por estas a regiões. As bandas Raman referentes à amida I e III são estimadas pela quantidade de estruturas secundárias de esqueletos polipeptídicos, sendo predominantemente, correlacionadas com as estruturas protéicas tridimensionais α -hélice (estrutura enrolada) e β -folha (estrutura planar), respectivamente [40].

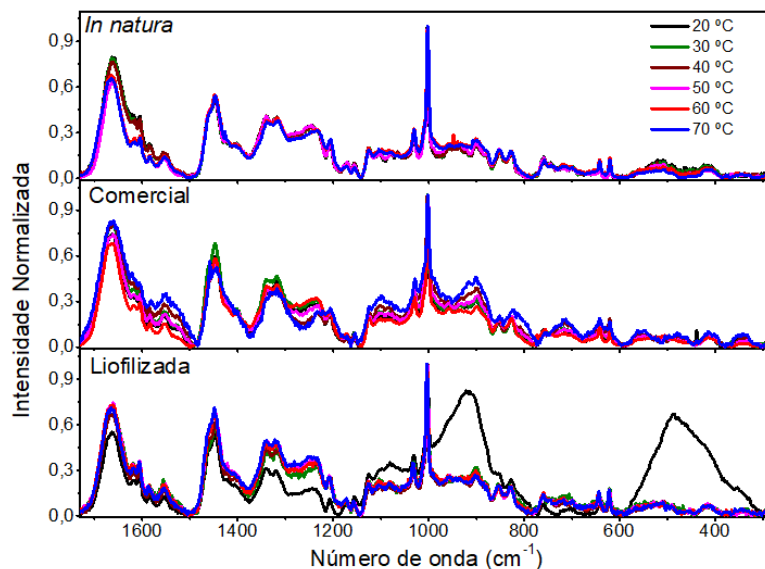


Figura 4.5 – Espectros Raman em função da temperatura, para a albumina *in natura*, comercial e liofilizada. Normalizados em intensidade na banda da Fenilalanina (Phe).

As bandas da amida I e III são compostas por sobreposições de bandas, as quais podem ser deconvoluídas por meio de funções matemáticas, de modo que a soma destas funções represente o espectro Raman obtido. Sendo assim, foi realizada a deconvolução com funções gaussianas na região da amida I e III permitindo assim a análise das estruturas proteicas secundárias presentes nestas bandas. Uma função gaussiana descreve matematicamente bem espectros Raman, os espectros não são constituídos de linhas espectrais estreitas, mas sim de formas alargadas cuja largura está relacionada com o princípio de incerteza entre diferença entre níveis vibracionais de energia e o tempo de vida.

Estruturas de α -hélice e β -folha na região da amida I estão, respectivamente, situadas próximas de 1645-1657 cm^{-1} e 1665-1680 cm^{-1} , enquanto que proteínas com alta concentração de estruturas randômicas são usualmente encontradas em torno de 1660 cm^{-1} [6]. Para a deconvolução gaussiana na amida I foram utilizadas cinco funções gaussianas centradas em sendo ~ 1555 , 1610, 1650, 1667-1670 e 1686 cm^{-1} atribuídas ao Triptofano, ligação $\nu\text{C}=\text{C}$, α -hélice, β -folha e β -volta, respectivamente [41-42]. As duas primeiras gaussianas foram adicionadas com o intuito de melhorar o ajuste na região da amida I. Os ajustes com as funções gaussianas na região da amida I para a albumina *in natura*, liofilizada e comercial são apresentadas nas Figuras 4.6, 4.7 e 4.8, respectivamente, sendo o centro e

a área das bandas laterais fixadas enquanto que o comportamento era analisado por meio das bandas referentes às estruturas α -hélice e β -folha.

Na região da amida III, estruturas β -folha e randômicas são exibidas em torno de 1238-1245 cm^{-1} e 1250 cm^{-1} , respectivamente. Bandas de α -hélice também são encontradas e situadas em 1270-1300 cm^{-1} , porém sua intensidade é relativamente baixa. Um alto teor dessa estrutura pode influenciar na ausência de um pico mais intenso nas demais regiões da amida [6]. Desta forma, as bandas da amida III obtidas neste trabalho tem maior contribuição de estruturas β -folha. Quantidades relativas de estruturas secundárias estão associadas pela referência espectral de proteínas cuja estruturas já são conhecidas [6]. Desse modo, adicionamos quatro gaussianas na região envolvendo a amida III (1216-1280 cm^{-1}), sendo seus centros em torno de: 1229 (estrutura β -folha antiparalela), 1240 (estrutura β -folha paralela), 1255 e 1279 cm^{-1} atribuídos a estrutura randômica e α -hélice, respectivamente [43]. Os ajustes com as funções gaussianas na região da amida III para a albumina *in natura*, liofilizada e comercial são apresentadas nas Figuras 4.9, 4.10 e 4.11, respectivamente.

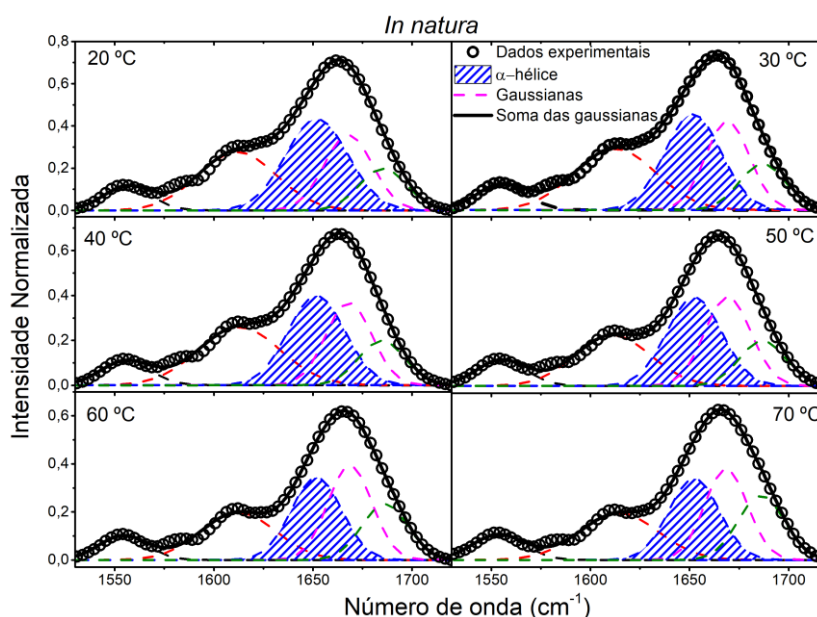


Figura 4.6 – Ajustes gaussianos na região da amida I para a albumina *in natura* em função da temperatura. A gaussiana em destaque indica a estrutura α -hélice.

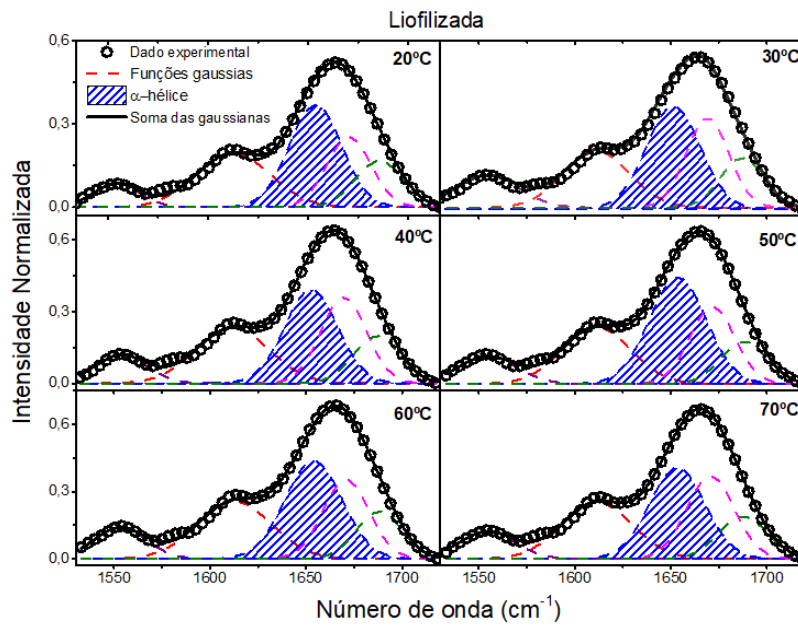


Figura 4.7 - Ajustes gaussianos na região da amida I para a albumina liofilizada em função da temperatura. A gaussiana em destaque indica a estrutura α -hélice.

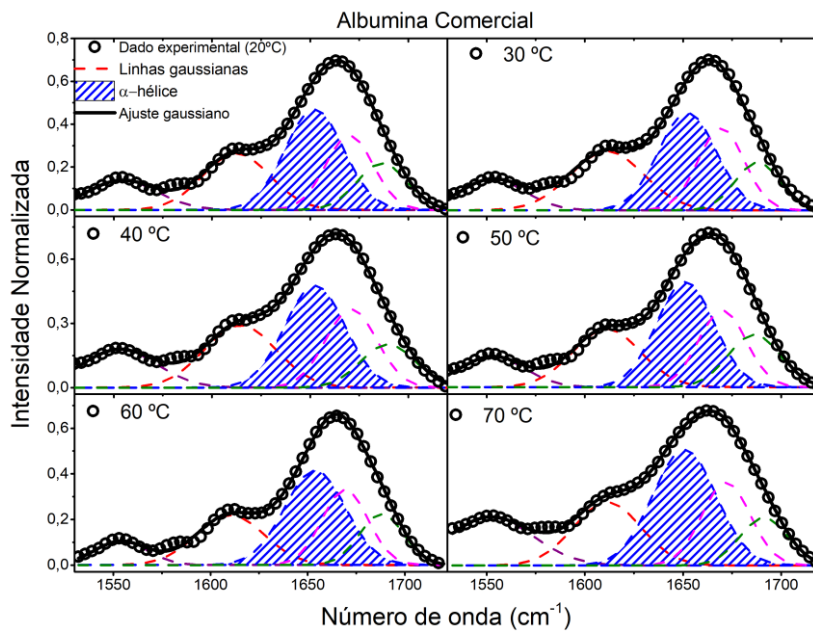


Figura 4.8 - Ajustes gaussianos na região da amida I para a albumina comercial em função da temperatura. A gaussiana em destaque indica a estrutura α -hélice.

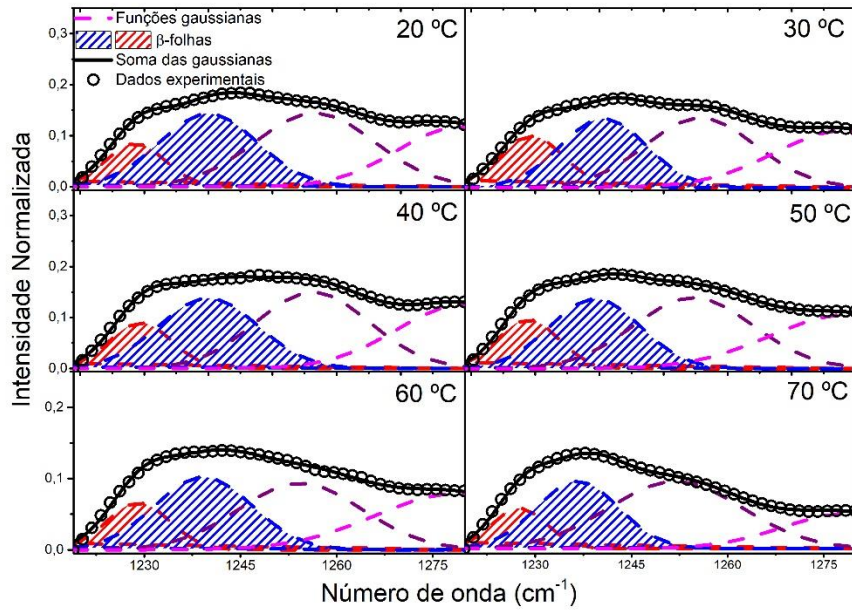


Figura 4.9 – Ajustes gaussianos na região da amida III para a albumina *in natura* em função da temperatura. As gaussianas em destaque indicam as estruturas β -folha antiparalela e paralela em vermelho e azul, respectivamente.

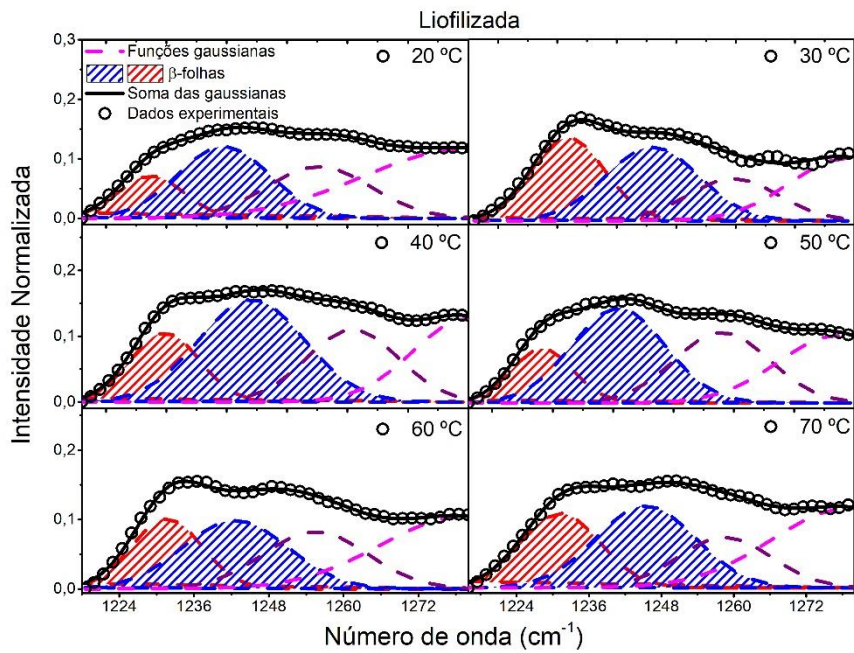


Figura 4.10 - Ajustes gaussianos na região da amida III para a albumina liofilizada em função da temperatura. As gaussianas em destaque indicam as estruturas β -folha antiparalela e paralela em vermelho e azul, respectivamente.

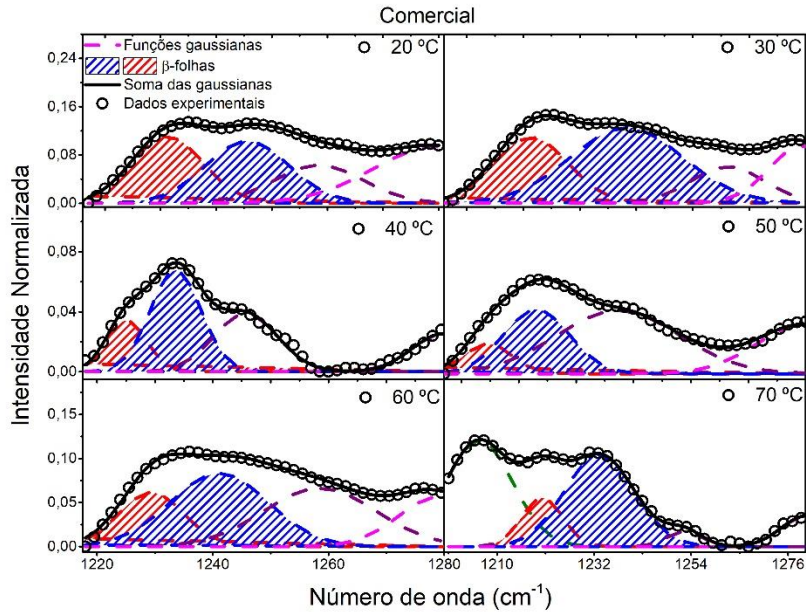


Figura 4.11 - Ajustes gaussianos na região da amida III para a albumina comercial em função da temperatura. As gaussianas em destaque indicam as estruturas β -folha antiparalela e paralela em vermelho e azul, respectivamente.

Na amida I, as estruturas β -folha e β -volta tem menor contribuição nos espectros Raman em comparação com a estrutura α -hélice [43], fato o qual pode atribuído as pontes de hidrogênio da estrutura α -hélice que são fortemente enoveladas e ligadas em seu interior [44], podendo ser mais Raman ativa.

Na amida III, a estrutura β -folha paralela é menos estável devido às suas distorções, em comparação com a sua antiparalela, no entanto, mostra-se relativamente bem comportada na albumina *in natura* e liofilizada, ou seja, não foram notados deslocamentos das gaussianas ou variações significativas de suas áreas, podendo este comportamento estar associado à preservação de suas pontes de hidrogênio entre as estruturas β -folha. Quando comparada as demais amostras, uma maior variação de estruturas conformacionais é observada na albumina comercial, no qual não somente a intensidade relativa à estrutura β varia como também a adição de uma quinta linha em 70 °C fez-se necessária devida às mudanças abruptas em toda a região da amida III. Tais mudanças espectrais são observadas também em 40 e 50 °C, porém sem introdução de novas linhas. Fatores como temperatura ou mesmo ao próprio processo em que a albumina passou para ser comercializada e seu prazo de validade [4], podem ter influências significativas em tais variações.

Para uma melhor avaliação das estruturas α -hélice e β -folha foram avaliadas as posições e áreas das gaussianas, ajustadas na região da amida I e III, para as amostras de albumina em função da temperatura, para isso foram elaboradas as Figuras 4.12 e 4.13, que mostram a posição da banda relacionada a α -hélice da amida I ($\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$) e as áreas das bandas das estruturas α -hélice (amida I

em $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$) e β -folha (amida III em ~ 1229 e 1240 cm^{-1}) em função da temperatura, respectivamente. Para a maioria das temperaturas, a banda característica da β -folha paralela, $\sim 1240\text{ cm}^{-1}$, apresentava maior amplitude, como mostram as gaussianas destacadas nas Figuras 4.9 a 4.11. Para melhor compreensão das conformações β -folha foi realizada a análise das áreas das bandas referentes às estruturas paralela e antiparalela, as quais foram somadas.

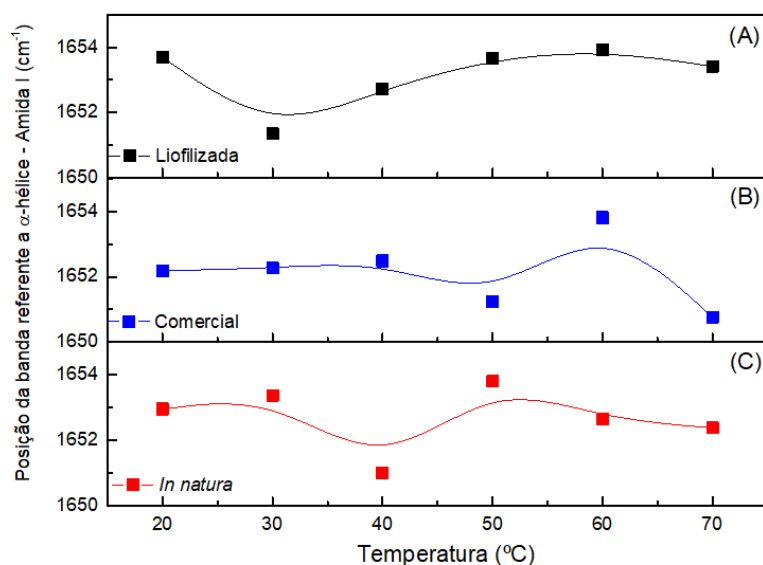


Figura 4.12 – Comportamento da posição da banda Raman referente à estrutura α -hélice na região da amida I em função da temperatura para as albuminas: (A) liofilizada, (B) comercial e (C) *in natura*.

Na Figura 4.12 nota-se que a estrutura α -hélice nas albuminas liofilizada, comercial e *in natura* que não há uma tendência evidente de deslocamentos das bandas Raman para maior ou menor número de onda em função da temperatura, mostrando que o efeito térmico não foi suficiente para resultar em deslocamentos definitivos para estrutura α -hélice. Painter e Koenig [43] relatam em seu trabalho sobre proteínas do ovo que os espectros Raman das proteínas ovalbumina, cobalamina e ovomucóide, as mais abundantes na clara, sofrem mudanças na região da amida I e III devido ao aquecimento em $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, nas quais o processo de desnaturação da clara do ovo é uma aglutinação da albumina devido à diminuição da interação da água com as proteínas, resultando em uma desordem em sua estrutura molecular, porém sem prejudicar o conteúdo protéico da albumina. Em processos de desnaturação as estruturas mais enoveladas se desenrolam perdendo assim sua função biológica. No trabalho de Painter e Koenig a citada desordem não resulta no completo desenovelamento das estruturas tridimensionais da proteína, mas sim em uma sutil mudança das estruturas, conseqüentemente uma sutil e não definitiva alteração em posições e amplitudes das bandas Raman referentes as estruturas, sendo assim ainda existem estruturas α -hélice e β -folha. Nossos resultados corroboram com os

achados de Painter e Koenig mostrando uma desorganização na estrutura proteica no intervalo de temperatura estudado.

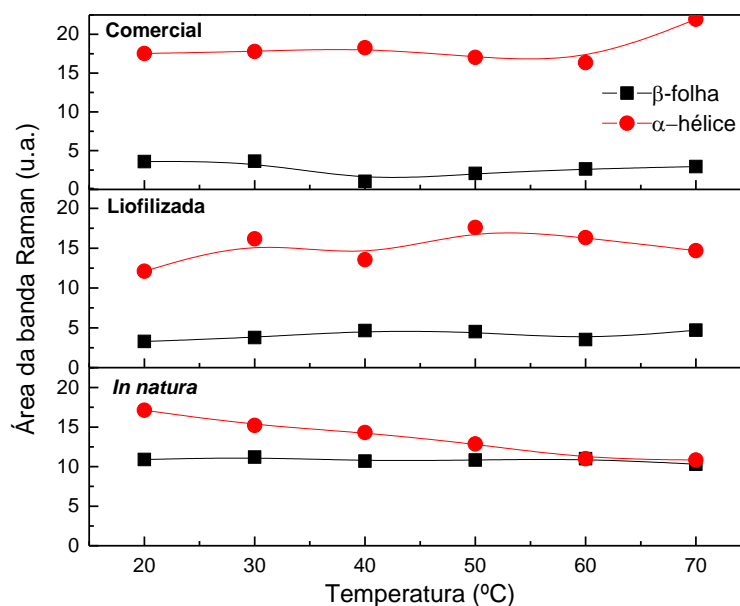


Figura 4.13 – Comportamento das áreas das bandas Raman referente à estrutura α -hélice (amida I em $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$) na região e das estruturas β -folha antiparalela e paralela (amida III em ~ 1229 e 1240 cm^{-1}) em função da temperatura. As bandas das estruturas β -folha paralela e antiparalela foram somadas.

A Figura 4.13 mostra que área da gaussiana referente à α -hélice é maior do que as da β -folha, nas amostras comercial e liofilizada e tem uma tendência de não variação com a temperatura, entretanto, para as amostras *in natura* há uma tendência de diminuição da estrutura α -hélice, enquanto que a estrutura β -folha tende a permanecer constante. A área da banda pode ser considerada representativa da quantidade de estruturas secundárias existentes na proteína [45], sendo assim podemos inferir que para as amostras comercial e liofilizada a proporção de estruturas α -hélice é maior do que as estruturas β -folha em todo intervalo de temperatura investigado, já para a amostra *in natura* essa proporção varia.

Alguns trabalhos da literatura indicam um comportamento de diminuição das estruturas α -hélice e aumento da estrutura β -folha quando as proteínas da clara do ovo são expostas a aumento de temperatura [6,43], entretanto nestes trabalhos as proteínas foram manipuladas de forma isolada e preparadas em solventes para monitoramento de pH e diluição, o que pode ter diferenciado dos resultados obtidos neste trabalho.

Por meio do comportamento das áreas das bandas Raman das estruturas α -hélice e β -folha observa-se nas amostras comercial e liofilizada, mínimas variações em função da temperatura, sugerindo a desorganização das estruturas protéicas e não uma desnaturação. Já para amostras *in*

natura as estruturas α -hélice tendem a diminuir, entretanto não foi observado um aumento nas estruturas β -folha, o que de acordo com a literatura científica é esperado no processo de desnaturação. As amostras *in natura* mostraram-se mais suscetíveis ao intervalo de temperatura estudado, possivelmente pela grande quantidade de água presente na amostra, que influencia no processo de aglutinação das moléculas de albumina durante o processo de aquecimento, já que ocorre interações químicas das moléculas de água com os demais componentes da clara do ovo. Outro aspecto a ser considerado é que um modo vibracional de deformação da molécula de água nos espectros Raman tem seu centro próximo à 1640 cm^{-1} [46], o qual poderia estar influenciando na análise da estrutura α -hélice na região da amida I em função da temperatura. Cabe ressaltar, que as amostras comercial e liofilizada estavam na forma em pó, o que consideramos que a contribuição de água é muito menor quando comparada a clara de ovo fresca.

As medidas com amostras de albuminas manipuladas em farmácia foram realizadas posteriormente as demais apresentadas, e a mesma não foi avaliada em função da temperatura devido aos espectros obtidos não estarem em concordância com a literatura, mostrando ausência ou diminuição do pico referente à fenilalanina $\sim 1004\text{ cm}^{-1}$, o qual é característico em espectros Raman de albumina. Na Figura 4.14 encontra-se os espectros Raman obtidos para duas albuminas manipuladas em duas farmácias de manipulação diferentes.

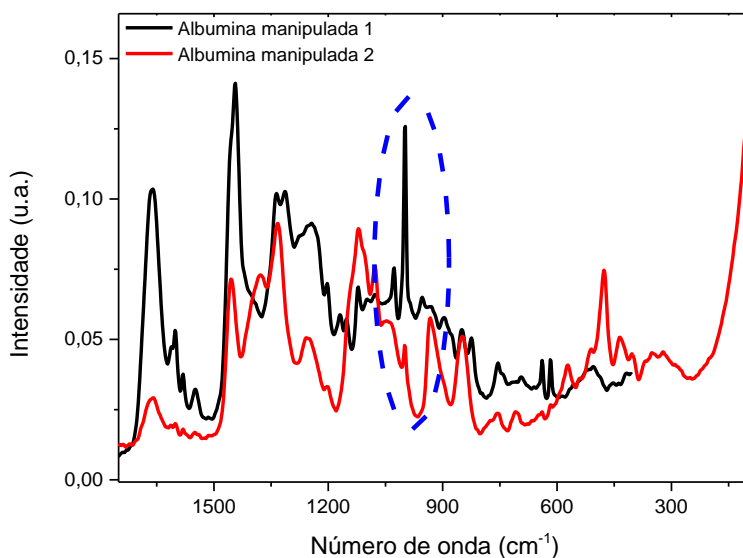


Figura 4.14 –Espectros FT-Raman para albuminas manipuladas. O círculo tracejado indica a região típica da banda da fenilalanina em espectros Raman.

Por ser um aminoácido aromático e hidrofóbico, a fenilalanina pode ser sensível à microambientes, porém tal sensibilidade não é suficiente para acarretar mudanças conformacionais de proteínas nessa banda [37]. Além disso, é razoavelmente não reativa, estando raramente envolvida

diretamente na função de uma proteína, embora gere o reconhecimento da mesma [47]. Entretanto, possui propriedades os quais proporcionam uma maior flexibilidade, hidrofobicidade e orientação à estrutura do anel, os quais favorecem suas interações de empilhamento [48].

Estudos mostram que a fenilalanina possui capacidade de gerar entidades estruturadas em β -folha de ordem superior [48], estando desse modo vinculadas à uma maior ou menor quantidade destas estruturas em uma proteína. Sendo assim, uma diminuição nesta banda implica em menores distribuições de estruturas β na albumina, o que por consequência, altera toda a sua conformação proteica, visto que as amidas I e III são formadas principalmente e predominantemente por tais estruturas.

Portanto, podemos pressupor que a banda relativa à fenilalanina é imprescindível para a conformação e composição da albumina, dado que sua presença e intensidade espectral são fatores característicos e marcantes para seu estudo, logo, alterações significativas nesta área induz à influência de agentes externos, estando o modo e a manipulação associados à sua diminuição/ausência. Com isso optamos neste trabalho em não avaliar as amostras manipuladas, por entender que as análises das estruturas proteicas poderiam estar sujeitas a interpretações errôneas.

Conclusões

Dessa forma, podemos concluir que com a espectroscopia Raman é uma metodologia que permitiu o estudo de conformações da proteína albumina presente em ovos em função da temperatura, mostrando sua versatilidade tanto em amostras orgânicas líquidas quanto em forma sólida. Com os resultados obtidos foi possível verificar que processos na indústria alimentícia ou farmacêutica, bem como a liofilização, na qual a amostra é submetida à temperatura próxima a do nitrogênio líquido para remoção de água, podem influenciar na conformação da proteína albumina, os quais puderam ser avaliados por meio de mudanças nos espectros Raman em função da temperatura.

Por meio da aplicação de funções gaussianas para deconvolução das regiões da amida I e III, obtendo posições e áreas das bandas referentes as estruturas β -folha e α -hélice foi possível observar que no processo de variação de temperatura entre 20 e 70 °C houve um possível desordenamento das estruturas.

As amostras *in natura* mostraram-se mais suscetíveis a variação de temperatura no intervalo estudado neste trabalho, possivelmente devido à ausência de estabilizantes, processos de produção ou reagente químicos, ou a grande presença de água em sua composição. Entretanto para nenhuma das amostras estudadas foi observado processo de desnaturação, o que pode ter ocorrido durante o processo de aquecimento foi uma desordem, não definitiva, entre as estruturas secundárias β -folha e α -hélice da albumina, sendo assim seu valor nutricional e funções biológicas não sofreram alterações significativas. Além disso, a não desnaturação pode ser atribuído a um bom resultado, justamente por não apresentar consequências prejudiciais à saúde quando consumida a albumina no dia a dia.

Referências bibliográficas

- [1] ALCANTARA, J. *Qualidade físico-química dos ovos comerciais: avaliação e manutenção de qualidade*. Seminário apresentado ao Curso de Doutorado em Ciência Animal - Universidade Federal de Goiás, p. 36, 2012.
- [2] WANG, W.; PALIWAL, J. *Conformation analysis of egg white under thermal gelation and determination of protein secondary structures using Raman Spectroscopy*. Escrito para CSBE/SCGAB – The Canadian Society for Bioengineering, p. 6, 2011.
- [3] SHARMA, D. Non-isothermal unfolding/denaturing kinetics of egg white protein. *J. Therm Anal Calorim*, p. 1139–1143, 2012.
- [4] KUPPUSWAMY, S.; SIRINIVASAN, M.; SUBRAHMANYAN, V. Proteins in foods. *Indian Council of Medical Research*, p. 167-177, 1958.
- [5] RODRIGUES, A.; GALZERANI, J. Espectroscopias de infravermelho, Raman e de fotoluminescência: potencialidades e complementaridades. *Rev. Bras. Ensino Física*, vol. 34, n. 4, p. 4309–9, 2012.
- [6] QIN, L. *Structural analysis of proteins in thermally induced ovalbumin and egg white gels*. Dissertação de mestrado, Department of Food, The University of British Columbia, p. 115, 1997.
- [7] BYLER, D.; SUSI, H. Application of computerized infrared and Raman spectroscopy to conformation studies of casein and other food proteins. *Journal of Industrial Microbiology*, p. 73-88, 1988.
- [8] HERALD, T.; SMITH, D. Heat-Induced Changes in the Secondary Structure of Hen Egg S-Ovalbumin. *J. Agric. Food Chem*, p. 1737-1740, 1992.
- [9] BILIADERES, C. G. Differential Scanning Calorimetry in Food Reserch - A review. *Food Chemistry*, p. 239-265, 1983.
- [10] NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 5. ed. [S.l.]: Artmed, 2011.
- [11] SOUZA, K. *Experimentos de Bioquímica*. Disponível em < http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/introducao_proteinas/introducao_proteinas_quatro.htm > Acesso em 01 de abril e 2018.
- [12] VOET, D.; VOET, J. G. *Bioquímica*. 4. ed. [S.l.]: Artmed, 2013.

- [13] ZANCHI, F. *Estrutura tridimensional de proteína*. Disponível em <http://www.bionorte.org.br/public/upl/doc/p6/doc_2356.pdf > Acesso em 10 de dezembro de 2017;
- [14] SERAFINI, S.; SOARES, J.; SILVA, K.; MANENTEBOIAGO, M. *Produção, estrutura e processamento de ovos*. SB Rural. Ed. 149, 2007.
- [15] PARKINSON, T. The chemical composition of eggs. *J. Sci. Fd Agric.*, v. 17, p. 101-111, 1966.
- [16] POULTRYHUB. *The avianegg*. Disponível em < <http://www.poultryhub.org/physiology/the-avian-egg/> > Acesso em: 25 de agosto de 2018.
- [17] OLIVEIRA, A. *Comercialização de ovos: classificação, rótulo, identificação e embalagens*. Disponível em: <<https://www.cpt.com.br/cursos-avicultura/artigos/comercializacao-de-ovos-classificacao-rotulo-identificacao-e-embalagens> >. Acesso em 14 de setembro de 2018.
- [18] OKABAYASHI, T. *A influência do estresse sobre a qualidade da carne*. Botucatu – SP, pag. 18, 2009.
- [19] SAKOMURA, N. *Manejo e processamento dos ovos*. Disponível em: < http://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/zootecnia/NILVAKAZUESAKOMURA/aula_9_proc_ovos_muda_descarte_e_custo.pdf > Acesso em: 25 de agosto de 2018.
- [20] ALCANTARA, P, J. *Espectroscopia molecular*. Departamento de Física – UFP, pag. 5, 2002.
- [21] SALA, O. *Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho*. 2. ed. [S.l.]: Unesp, 2008.
- [22] FARIA, D.; SANTOS, L. Uma demonstração sobre o espalhamento inelástico de luz: repetindo o experimento Raman. *Química Nova* v. 20, nº 3, 1997.
- [23] ANDO, R. A. *Espectroscopia Vibracional, Raman Ressonante e Eletrônica de Nitroderivados em Sistemas Conjugados*. Dissertação de Mestrado - Instituto de Química da Universidade de São Paulo, p. 144, 2005.
- [24] MARIN, E. P. *Espectroscopia de infravermelho e suas aplicações*. Trabalho de conclusão de curso, Universidade Estadual Paulista, p. 73, 2013.
- [25] MALVERN-PANALYTICAL. *Calorimetria de varredura diferencial (DSC)*. Disponível em: <<https://www.malvernpanalytical.com/br/Products/technology/microcalorimetry/differential-scanning-calorimetry> > Acesso em 03 de abril de 2018;
- [26] SKOOG, D.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. *Principles of instrumental analysis*, 5.ed. [S.l.]: Orlando: Harcourt Brace & Company, 1998;

- [27] ANÁLISES-TÉRMICAS. *Como analisar usando Análise Térmica Diferencial (DTA)*. Disponível em: <<http://www.analisestermicas.com.br/como-analisar-usando-analise-termica-diferencial-dta/>> Acesso em: 07 de abril de 2018;
- [28] TENTARDINI, E.; MATOS, T. Caracterização termofísica de materiais por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC). Disponível em: <http://www.propfis.org/index_arquivos/lectures/e1p12.pdf> Acesso em: 01 de dezembro de 2018;
- [29] BRUKER. *Senterra Microscope Raman*. Disponível em: <<https://www.bruker.com/pt/products/infrared-near-infrared-andramanspectroscopy/raman/senterra/overview.html>> Acesso em: 18 de fevereiro de 2018;
- [30] BRUKER. *Módulo FT-Raman RAM II*. Disponível em: <<https://www.bruker.com/pt/products/infrared-near-infrared-and-raman-spectroscopy/raman/ramii/overview.html>> Acesso em 28 de fevereiro de 2018;
- [31] DUAN, X.; LI, J.; ZHANG, Q.; ZHAO, T.; LI, M.; XU, X.; LIU, X. Effect of a multiple freeze-thaw process on structural and foaming properties of individual egg white proteins. *Food Chemistry*, p. 243-248, 2017.
- [32] WOOTTON, M.; HONG, N.; E THI, H. L. P. A Study of the Denaturation of Egg White Proteins during Freezing Using Differential Scanning Calorimetry. *Journal of Food Science*, p. 1336-1338, 1981.
- [33] FERREIRA, M.; HOFER, C.; RAEMY, A. A calorimetric study of egg white proteins. *Journal of thermal analysis*, v. 48, n. 3, p. 683–690, 1997.
- [34] 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.
- [35] OSTICIOLI, I.; NEVIN, A.; ANGLOS, D.; BURNSTOCK, A.; CATHER, S.; BECUCCI, M.; FOTAKIS, C. E CASTELLUCCI, E. Micro-Raman and fluorescence spectroscopy for the assessment of the effects of the exposure to light on films of egg white and egg yolk. *J. Raman Spectrosc*, p. 307–313, 2008.
- [36] SYNYTSYA, A.; JUDEXOVÁ, M.; HRUBÝ, T.; TATARKOVIC, M.; MISKOVICOVÁ, M.; PETRUZELKA, L.; E SETNICKA, V. Analysis of human blood plasma and hen egg white by chiroptical spectroscopic methods (ECD, VCD, ROA). *Anal Bioanal Chem*, p. 5441–5453, 2013.
- [37] CATALINA, D. Raman Spectroscopy for proteins. *HORIBA Scientific*. Disponível em: <http://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Documents/Raman/HORIBA_webinar_proteins.pdf> Acesso em: 27 de junho de 2018.

- [38] CHURCH, J.; POOLE, A.; WOODHEAD, A. The Raman analysis of films cast from dissolved feather keratin. *Vib. Spectrosc.* n. 53, p. 107-111, 2010.
- [39] BLANCH, E.; MCCOLL, I.; HECHT, L.; NIELSEN, K. E. BARRON, L. Structural characterization of proteins and viruses using Raman optical activity. *Vib, Spectrosc.* n. 35, p. 87-92, 2004.
- [40] BENEVIDES, J. M.; OVERMAN, S. A.; THOMAS, G. J. JR. Raman Spectroscopy of proteins. *Current Protocols in Protein Science*, p. 17.8.1-12.8.35, 2003.
- [41] KUZUHARA, A. Analysis of structural changes in bleached keratin fibers (black and white human hair) using Raman spectroscopy. *Biopolymers*, p. 506-514, 2006.
- [42] PUDNEY, P.; BONNIST, E.; MUTCH, K.; NICHOLLS, R.; RIELEY, H.; STANFIELD, S. Confocal Raman Spectroscopy of Whole Hairs. *Appl. Spectrosc.* p. 1408-1416, 2013.
- [43] PAINTER, P.C.; KOENING, J. L. Raman spectroscopic study of the protein of egg White. *Biopolymers*, v. 15, p. 2155-2166, 1976.
- [44] KNOOW.NET. *Enciclopédia temática*. Disponível em: <<http://knoow.net/ciencterravida/biologia/estruturas-em-helice/>> Acesso em: 26 de agosto de 2018.
- [45] PETERS, J.; LUCZAK, A.; GANESH, V.; PARK, E.; KALYANARAMAN, R. Protein secondary structure determination using drop coat deposition confocal Raman Spectroscopy. *Spectroscopy Volume 31*, I. 10, p. 31-39, 2016.
- [46] WANG, Z.; PAKOULEY, A.; PANG, Y.; DLOTT, D. Vibrational substructure in the OH stretching transition of water and HOD. *J. Phy. Chem.*, p. 9054-9063, 2004.
- [47] BETTS, M. RUSSEL, R. *Amino acid properties and consequences of substitutions. In Bioinformatics for Geneticists. 2003*. Disponível em: <<http://www.russelllab.org/aas/Phe.html>> Acesso em: 21 de outubro de 2018.
- [48] ANAND, B.; DUBEY, K.; SHEKHAWAT, D.; KAR, K. Intrinsic property of phenylalanine to trigger protein aggregation and hemolysis has a direct relevance to phenylketonuria. *ScientificReports*. 7:11146, 2017.