

Determinação do sítio preferencial da albumina do soro bovino para interação com luteína por meio da técnica de espectroscopia de fluorescência

Paulo Henrique Costa Paiva^{1*}, Luis Henrique Mendes da Silva², Márcia Cristina Teixeira Ribeiro Vidigal³, Maximiliano Soares Pinto⁴, Ana Clarissa dos Santos Pires³

¹Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – ILCT; ²Universidade Federal de Viçosa – DEQ; ³Universidade Federal de Viçosa – DTA; ⁴Universidade Federal de Minas Gerais – ICA Montes Claros/MG

* e-mail: paulohcp@epamig.br

1. INTRODUÇÃO

A albumina do soro bovino (BSA) é uma típica proteína do soro do leite e contém dois resíduos de triptofano: Trp₁₃₄ e Trp₂₁₃. Estes aminoácidos emitem fluorescência quando excitados a 295 nm (JAHANBAN-ESFAHLAN; PANAHI-AZAR; SAJEDI, 2016). Se a BSA interagir com pequenas moléculas em regiões próximas aos fluoróforos, sua fluorescência intrínseca diminui com o aumento da concentração do ligante (LELIS et al., 2017). Portanto, a supressão de fluorescência é uma técnica capaz de estudar o processo de interação BSA/luteína.

2. OBJETIVOS

Determinou-se, por meio da técnica de espectroscopia de fluorescência, o sítio preferencial da BSA para interação com luteína, carotenoide com reconhecidas propriedades bioativas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

BSA (> 98% m/m), ibuprofeno (> 98% m/m), digitoxina (> 92% m/m), varfarina (> 99% m/m), dimetilsulfóxido (DMSO) (> 99% m/m), Na₂HPO₄ (> 99% m/m) e NaH₂PO₄·H₂O (> 99% m/m) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Polióxido de etileno (PEO) grau analítico (massa molar 1500 g mol⁻¹) e Li₂SO₄·H₂O (> 99% m/m) foram comprados da Synth (São Paulo, SP, Brasil). Luteína purificada, a partir de luteína (> 5% m/m) fornecida pela DSM Nutritional Products (Kaiseraugst, AG, Switzerland), de acordo com Paiva et al. (2020). Para preparar a solução tampão pH 7,4 foram utilizadas Na₂HPO₄ (0,077 mol L⁻¹), NaH₂PO₄·H₂O (0,023 mol L⁻¹) e água deionizada.

3.2. MÉTODOS

Foi realizado um experimento de interação competitiva usando marcadores de sítio para os sítios I, II e III da BSA (varfarina, ibuprofeno e digitoxina, respectivamente). As concentrações de BSA e de cada marcador foram constantes (5 µM) e foi realizada uma titulação de supressão de fluorescência da BSA com luteína em pH 7,4 e 25°C. Alíquotas de 40 µL de solução estoque de luteína (5,0x10⁻⁴ mol.L⁻¹) contendo 8% (v/v) de DMSO foram adicionadas à solução proteica de modo a atingir concentrações entre 0 e 57 µM. O comprimento de onda de excitação foi de 295 nm e os espectros foram registrados no intervalo de 296-450 nm para cada concentração de luteína. Foi determinada a constante de interação (K_b) para BSA/luteína, na ausência e presença de cada marcador, por meio da equação de Scatchard (KSENOFONTOV; BOCHAROV; ANTINA, 2019) (Eq. 1):

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = n \log K_b - n \log \frac{1}{[Q_t] - \frac{(F_0 - F)}{F_0} [BSA]} \quad (\text{Eq. 1})$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta os espectros de fluorescência da BSA na presença de concentrações crescentes de luteína (0 – 57 µM) em pH 7,4 e 25 °C.

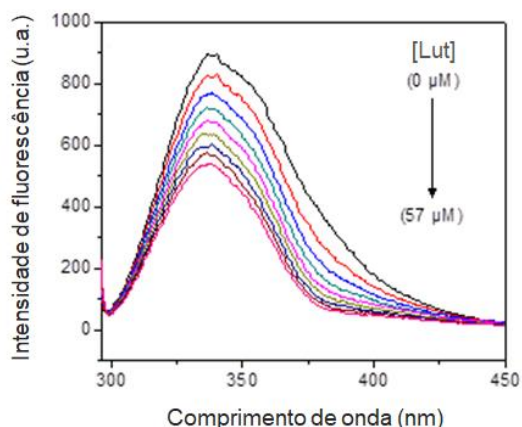


Figura 1 - Espectros de emissão de fluorescência da BSA (5 μM) na presença de concentrações crescentes de luteína em pH 7,4 (25 $^{\circ}\text{C}$). A seta indica um aumento na concentração de luteína ([Lut]) de 0 a 57 μM (0, 8, 16, 23, 30, 37, 44, 50 e 57 μM). Fonte: Paiva et al. (2020).

Para a interação BSA/luteína, K_b diminuiu mais na presença de digitoxina (-8,77%), comparado com ibuprofeno (-2,63%) e varfarina (-0,88%), conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Constantes de interação (K_b) obtidas a partir do experimento de interação competitiva para a formação de complexo BSA/luteína em pH 7,4 e 25 $^{\circ}\text{C}$.

Marcador de sítio	$K_b \pm \text{DP}^*$ ($\times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$)	R^2
Sem marcador de sítio (branco)	$1,14 \pm 0,05$	0,9954
Varfarina	$1,13 \pm 0,01$	0,9977
Ibuprofeno	$1,11 \pm 0,02$	0,9924
Digitoxina	$1,04 \pm 0,01$	0,9980

* DP é o desvio padrão de duas repetições com duplicata.

Estes resultados sugeriram que a luteína interage preferencialmente no sítio III da BSA, correspondente ao subdomínio IB. O sítio III é predominantemente hidrofóbico, entretanto, também apresenta resíduos de tirosina₁₆₀ e ácido glutâmico₁₄₀ (RAHMAN; AFRIN; TABISH, 2018), que provavelmente formam ligações de hidrogênio com os grupos hidroxilas em cada extremo da cadeia de polieno da luteína.

5. CONCLUSÕES

Sendo a BSA uma importante proteína carreadora de compostos hidrofóbicos, este estudo é fundamental para a ciência da formação do complexo BSA/luteína, que pode otimizar a aplicação da luteína na indústria de alimentos ao aumentar a sua solubilidade e estabilidade físico-química.

6. AGRADECIMENTOS

À CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro, e à empresa DSM por fornecer a luteína.

7. REFERÊNCIAS

- JAHANBAN-ESFAHLAN, A.; PANAHI-AZAR, V.; SAJEDI, S. Interaction of glutathione with bovine serum albumin: Spectroscopy and molecular docking. **Food Chemistry**, v. 202, p. 426–431, 2016.
- KSENOFONTOV, A. A.; BOCHAROV, P. S.; ANTINA, E. V. Interaction of tetramethyl-substituted BODIPY dye with bovine serum albumin: Spectroscopic study and molecular docking. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 368, n. September 2018, p. 254–257, 2019.
- LELIS, C. A. et al. Binding thermodynamics of synthetic dye Allura Red with bovine serum albumin. **Food Chemistry**, v. 217, p. 52–58, 2017.
- PAIVA, P. H. C. et al. Influence of protein conformation and selected Hofmeister salts on bovine serum albumin/lutein complex formation. **Food Chemistry**, v. 305, n. May 2019, p. 125463, 2020.
- RAHMAN, Y.; AFRIN, S.; TABISH, M. Interaction of pirenzepine with bovine serum albumin and effect of β -cyclodextrin on binding: A biophysical and molecular docking approach. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 652, n. June, p. 27–37, 2018.