**Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos**

Atividade antioxidante da vanilina e do ácido vanílico e o efeito da complexação por proteínas do soro do leite na desativação de radicais e ferrilmioglobina em condições simulando o trato gastrointestinal

Silvia Helena Libardi

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como um dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências. Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso

São Carlos
2010

*Aos meus amados pais José e Maria e meus queridos irmãos
Andréia, Luís e Paulo.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso pela sua dedicada orientação, agradável convivência e principalmente pela sua paciência.

Ao professor Júlio César Borges pelas discussões, colaboração e amizade.

Ao professor Gilberto e seu aluno Eduardo pelo auxílio com os experimentos de RMN.

Aos professores Douglas W. Franco e Benedito do Santos Lima-Neto pela agradável convivência.

Aos amigos do grupo de inorgânica e analítica e LDQA pela agradável e valiosa amizade.

Aos companheiros da turma de 2003 do IQSC e demais anos pela inesquecível convivência nos anos de graduação.

À minha cunhada Suelen.

A todos os membros da CCP.

À Silvia e à Andréia por sua eficiência e simpatia.

À Veroneide pela assistência e prontidão.

Às funcionárias Dani e Maria pela amizade.

Ao Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio).

Ao CNPq e CAPES pelas bolsas concedidas e à FAPESP pelo auxílio financeiro.

Feliz é aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.
(Cora Coralina)

Resumo

O presente trabalho procurou investigar influência da presença de proteínas do soro do leite na atividade antioxidante da vanilina e ácido vanílico frente ao radical DPPH• e a espécie de ferro hipervalente ferrilmioglobina MbFe(IV)=O em meio simulando o trato gastrointestinal. A constante de associação (K_A) entre a vanilina e a β -lactoglobulina (BLG) foi determinada utilizando-se as técnicas de espectroscopia de emissão molecular ($K_A = 400 \pm 12 \cdot 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$) e microcalorimetria ($K_A = 5,6 \pm 0,3 \cdot 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$) ambas em tampão fosfato com $C_{H^+} = 10^{-7,4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e força iônica 0,32 (NaCl). Para a interação entre a vanilina e albumina de soro bovino (BSA) encontrou-se o valor de $340 \pm 13 \cdot 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ em meio de tampão fosfato com $C_{H^+} = 10^{-6,4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e força iônica 0,32 (NaCl), obtido por espectroscopia de emissão molecular. Constatou-se pela técnica de microcalorimetria que a complexação possui caráter exotérmico e as contribuições de interações hidrofóbicas para a complexação são fracas. A reatividade da vanilina e ácido vanílico com o radical DPPH• foi investigada em meio de emulsão aquosa Tween-20® com $C_{H^+} = 10^{-2,0} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Os resultados obtidos demonstraram que a vanilina não pode ser considerada um bom antioxidante frente ao DPPH• ($k_{298} = 1,42 \pm 0,04 \cdot 10^{-1} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), no entanto, o ácido vanílico apresentou maior reatividade frente ao radical DPPH• ($k_{298} = 17,1 \pm 0,3 \cdot 10^{-1} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). A presença das proteínas BLG e BSA nas reações de redução do radical DPPH• pela vanilina e ácido vanílico conduziu a um efeito antagônico na constante de velocidade de reação. Os parâmetros termodinâmicos do estado de transição da reação com DPPH• apresentaram valores relativamente altos de entalpia de ativação e moderados valores de entropia de ativação: $\Delta H^\ddagger_{298} = 34,0 \pm 0,3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ para a vanilina e $46,2 \pm 0,1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ no complexo com BSA e $51,0 \pm 0,6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ no complexo com BLG, valores negativos de entropia $\Delta S^\ddagger_{298} = -147,4 \pm$

$0,9 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, $-105,3\pm 0,5 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ e $-90\pm 2 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ respectivamente. Os valores de entalpia e entropia de ativação encontrados para o ácido vanílico foram: $\Delta H^{\ddagger}_{298} = 19,6\pm 0,2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $10,2\pm 0,03 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $37,6\pm 0,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para os complexos com BSA e BLG respectivamente e valores negativos de entropia $\Delta S^{\ddagger}_{298} = -174\pm 0,5 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, $-206,0\pm 0,1 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ e $-116\pm 1 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$. A partir destes valores de entalpia e entropia de ativação o mecanismo de redução do radical DPPH $^{\bullet}$ foi atribuído a um processo de abstração de átomo de hidrogênio (HAT/PCET). A reação de desativação da espécie MbFe(IV)=O pela vanilina apresentou constante de velocidade de $k_{298} = 57\pm 1 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ sendo superior quando comparada ao ácido vanílico $k_{298} = 15\pm 1 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, fato este atribuído as cargas totais, negativa, do redutor e da proteína nas presentes condições experimentais. Observa-se um efeito antagônico da complexão da vanilina pelas proteínas na atividade antioxidante frente à ferrilmioglobina, onde o efeito reduziu, mas não impediu a reação de transferência de elétrons por esfera-externa à longa distância. Em contrapartida, a presença das proteínas BLG e BSA não influenciaram a reatividade do ácido vanílico frente à espécie MbFe(IV)=O. Os parâmetros de ativação encontrados para a reação de redução da MbFe(IV)=O com a vanilina apresentaram valores de $\Delta H^{\ddagger}_{298} = 58,8\pm 0,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $\Delta S^{\ddagger}_{298} = -14\pm 1 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, $\Delta H^{\ddagger}_{298} = 45,5\pm 0,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $\Delta S^{\ddagger}_{298} = -60\pm 1 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, $\Delta H^{\ddagger}_{298} = 68,6\pm 0,4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $\Delta S^{\ddagger}_{298} = 17\pm 1 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ para vanilina “livre”, complexo com BSA, e complexo com BLG respectivamente. Para a redução com ácido vanílico foram determinados os seguintes valores de entalpia e entropia de ativação: $\Delta H^{\ddagger}_{298} = 41,8\pm 0,2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $\Delta S^{\ddagger}_{298} = -82,4\pm 0,7 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, $\Delta H^{\ddagger}_{298} = 37,7\pm 0,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $\Delta S^{\ddagger}_{298} = -96\pm 1,0 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, $\Delta H^{\ddagger}_{298} = 53,5\pm 0,2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $\Delta S^{\ddagger}_{298} = -44\pm 1,0 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ para vanilina “livre”, complexo com BSA, e complexo com BLG respectivamente.

Abstract

The present study evaluate the influence of the presence of whey proteins in the antioxidant activity of vanillin and vanillic acid towards the DPPH• radical species and the hypervalent iron species ferrylmyoglobin, MbFe(IV)=O under conditions simulating the gastrointestinal tract. The association constant (K_A) between vanillin and β -lactoglobulin (BLG) was obtained using molecular emission spectroscopy ($K_A = 400 \pm 12 \cdot 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$) and microcalorimetric titration ($K_A = 5.6 \pm 0.3 \cdot 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$) both in phosphate buffer $C_{H^+} = 10^{-7.4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and ionic strength 0.32 (NaCl). For the interaction between vanillin and bovine serum albumin (BSA) it was founded value of $340 \pm 13 \cdot 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ in phosphate buffer with $C_{H^+} = 10^{-6.4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and ionic strength 0.32 (NaCl), as obtained by molecular emission spectroscopy. It was founded by microcalorimetry titration that the complexation has a exothermic character and the contributions of hydrophobic interactions for complexation are weak. The reactivity of vanillin and vanillic acid toward DPPH• radical was studied in aqueous emulsion using Tween-20® with $C_{H^+} = 10^{-2.0} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The results show that vanillin can not be considered a good antioxidant ($k_{298} = 1.42 \pm 0.04 \cdot 10^{-1} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), however vanillic acid show higher reactivity than vanillin towards the radical DPPH• ($k_{298} = 17.1 \pm 0.3 \cdot 10^{-1} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). The presence of the proteins BLG and BSA in the reduction reactions of the DPPH• radical by vanillin and vanillic acid led to an antagonic effect in the reaction rate constant. The thermodynamic parameters for the transition state of the reaction with DPPH• showed relatively high values of enthalpy of activation and moderately negative entropy of activation: $\Delta H^\ddagger_{298} = 34.0 \pm 0.3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ for vanillin and $46.2 \pm 0.1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ for complex with BSA and $51.0 \pm 0.6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ for complex with BLG, negatives values of entropy $\Delta S^\ddagger_{298} = -147.4 \pm 0.9 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$, $-105.3 \pm 0.5 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ and $-90 \pm 2 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ respectively. The values of enthalpy and entropy of activation

found for vanillic acid were: $\Delta H_{298}^{\ddagger} = 19.6 \pm 0.2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $10.2 \pm 0.03 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ and $37.6 \pm 0.3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ for BSA and BLG respectively and negative values of entropy $\Delta S_{298}^{\ddagger} = -174 \pm 0.5 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, $-206.0 \pm 0.1 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ and $-116 \pm 1 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$. From these values of enthalpy and entropy of activation the mechanism of radical DPPH $\cdot$ reduction was assigned to a process of hydrogen atom transfer (HAT/PCET). The deactivation reaction of the MbFe(IV)=O species by vanillin shown rate constant of $k_{298} = 57 \pm 1 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, which it is higher than vanillic acid $k_{298} = 15 \pm 1 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. This fact is assigned to the total negative charges of the reductor and the protein under the experimental conditions. It is observed an antagonistic effect of the complexation of vanillin by proteins in the antioxidant activity, in which the effect diminish, but not avoid the long range electron transfer by out-sphere reaction. On the other hand, the presence of BLG and BSA do not affect the reactivity of vanillic acid towards the MbFe(IV)=O species. The activation parameters found for the reduction of MbFe(IV)=O by vanillin revealed values of $\Delta H_{298}^{\ddagger} = 58.8 \pm 0.3 \text{ kJmol}^{-1}$ and $\Delta S_{298}^{\ddagger} = -14 \pm 1 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, $\Delta H_{298}^{\ddagger} = 45.5 \pm 0.3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $\Delta S_{298}^{\ddagger} = -60 \pm 1 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, $\Delta H_{298}^{\ddagger} = 68.6 \pm 0.4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ and $\Delta S_{298}^{\ddagger} = 17 \pm 1 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ for free vanillin, complex with BSA and complex with BLG respectively. For the reduction by vanillic acid it were with the following values of enthalpy and entropy of activation: $\Delta H_{298}^{\ddagger} = 41.8 \pm 0.2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ and $\Delta S_{298}^{\ddagger} = -82.4 \pm 0.7 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, $\Delta H_{298}^{\ddagger} = 37.7 \pm 0.3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ and $\Delta S_{298}^{\ddagger} = -96 \pm 1.0 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, $\Delta H_{298}^{\ddagger} = 53.5 \pm 0.2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ and $\Delta S_{298}^{\ddagger} = -44 \pm 1.0 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ for free vanillin, complex with BSA and complex with BLG respectively.

Lista de Figuras

- Figura 1** - Principais formas de ação dos antioxidantes no trato gastrointestinal adaptado da referência. 21
- Figura 2** - Estrutura molecular dos principais componentes responsáveis pelas características sensoriais do aroma de baunilha. 23
- Figura 3** - Estrutura cristalográfica da BLG a pH 7,1. Figura desenhada com o software PyMOL a partir do número de identificação 1BSQ no Protein Data Bank. 24
- Figura 4** - Estrutura cristalográfica da HSA a pH 5,0 . Figura desenhada com o software PyMOL a partir do número de identificação 1BM0 no Protein Data Bank. 26
- Figura 5** - Mioglobina de coração de cavalo, em destaque, porfirina com núcleo de ferro pH 6,96 . Figura desenhada com o software PyMOL a partir do número de identificação 1NZ2 no Protein Data Bank. 28
- Figura 6** - Ciclo catalítico típico de enzimas peroxidases. 29
- Figura 7** - Envolvimento da metmioglobina em processos de 1 ou 2 elétrons na peroxidação lipídica⁴⁷. 30
- Figura 8** - Estrutura cristalográfica da BLG a pH 7,1²⁹ . Figura desenhada software WebLab ViewerLite a partir do número de identificação 1BSQ no Protein Data Bank. Aminoácido triptofano foi destacado. 39
- Figura 9** - Estrutura cristalográfica da HSA a pH 5,0³³ . Figura desenhada software WebLab ViewerLite a partir do número de identificação 1BM0 no Protein Data Bank. Os aminoácidos em evidência são relativos à posição dos triptofanos na proteína BSA. 40
- Figura 10** - Figuras A, B e C ilustram a supressão de fluorescência de $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de BLG na presença de diferentes concentrações de vanilina ($0 - 200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), nas concentrações hidrogeniônicas de $10^{-7,4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $10^{-6,4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $10^{-2,0} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente. Em destaque o gráfico de $\log[(F_0-F)/F]$ versus $\text{Log}[L]$. 43
- Figura 11** - Espectro eletrônico de absorção da vanilina na concentração de $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em meio aquoso (pH 2,0 e 7,4). 45
- Figura 12** - Gráfico de F_0/F versus [Vanilina] (Equação de Stern-Volmer) para a BLG e vanilina a temperatura de 15°C e 35°C . 47
- Figura 13** - Gráfico de F_0/F versus [Vanilina] (Equação de Stern-Volmer) para a BSA e vanilina a temperatura de 25°C e 40°C . 48

Figura 14 - Gráfico de F_0/F versus [Vanilina] (Equação de Stern-Volmer) para a supressão de fluorescência de $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de BLG na presença de diferentes concentrações de vanilina (0 – 200) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, nas concentrações hidrogeniônicas de $10^{-7,4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $10^{-6,4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $10^{-2,0} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. 49

Figura 15 - Figuras A e B ilustram a supressão de fluorescência de $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de BSA na presença de diferentes concentrações crescentes de vanilina (0 - 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); nas concentrações hidrogeniônicas de $10^{-6,4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $10^{-2,0} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Em destaque o gráfico de $\log[(F_0-F)/F]$ versus $\text{Log}[L]$. 51

Figura 16 - Os gráficos A, B e C demonstram a supressão de fluorescência de $1\cdot\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de BLG na presença de diferentes concentrações de vanilina (0 - 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), em meio aquoso nas concentrações hidrogeniônicas de $10^{-7,4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $10^{-6,4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $10^{-2,0} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. No qual foi utilizado o modelo da descrito pela Equação 8. 53

Figura 17 - Os gráficos A e B demonstram a supressão de fluorescência de $1\cdot\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de BSA na presença de diferentes concentrações de vanilina (0 - 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), em meio aquoso nas concentrações hidrogeniônicas de $10^{-6,4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $10^{-2,0} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. No qual foi utilizado o modelo da descrito pela Equação 8. 54

Figura 18 - Titulação microcalorimétrica de uma solução de $178,9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BLG com uma solução $49,56 \text{ mmol L}^{-1}$ de vanilina em tampão fosfato (pH = 7,4, I = 0,32 (NaCl) em diferentes temperaturas. 57

Figura 19 - Variação do ΔH em função da temperatura de titulação de uma solução de $178,9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BLG com uma solução $49,56 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de vanilina em tampão fosfato (pH = 7,4, I = 0,32 (NaCl) para determinação experimental do valor de ΔC_p . 58

Figura 20 - Curva de dissociação da vanilina na concentração de $49 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ em meio aquoso (tampão fosfato, pH = 7,4, I = 0,32 (NaCl) a temperatura de 25°C). 59

Figura 21 - Espectro de dicroísmo circular da BLG na concentração de $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e adição de $5\text{-}250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de vanilina, tampão fosfato, pH = 7,4, I = 0,32 (NaCl) a temperatura de 25°C . 61

Figura 22 - Espectro eletrônico de absorção e estrutura molecular do radical DPPH $^\bullet$ realizados em meio de emulsão aquosa de Tween-20 $^\circ$ com concentração hidrogeniônica de $10^{-2,0} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e concentração de DPPH $^\bullet$ de $2,9\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. 63

Figura 23 - Espectro eletrônico de absorção no intervalo de 300-800 nm da reação entre $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de vanilina com $2,9\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de DPPH $^\bullet$ a $25\pm 0,1^\circ\text{C}$ em meio de

emulsão aquosa com concentração hidrogeniônica de $10^{-2,0} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Intervalo de aquisição de cada espectro foi de 5 minutos. Inserto: decaimento da banda em 525 nm da reação entre $6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de vanilina e $2,7\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ a $25 \pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em meio de emulsão aquosa Tween-20[®] com concentração hidrogeniônica de $10^{-2,0} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. 64

Figura 24 - Absorbância em 525 nm em função do tempo para a reação de $14 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de vanilina e $3,0\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de DPPH[•] a $25 \pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em meio de emulsão aquosa Tween-20[®] com concentração hidrogeniônica de $10^{-2,0} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. 65

Figura 25 - Relação entre velocidades iniciais e concentração de vanilina a $25 \pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em meio de emulsão aquosa de Tween-20[®] com concentração hidrogeniônica de $10^{-2,0} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. 66

Figura 26 - Variação da absorção no comprimento de onda de 525 nm com o tempo para a reação de $6,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido vanílico e $2,5\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de DPPH[•] a $25 \pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em meio de emulsão aquosa Tween-20[®] com concentração hidrogeniônica de $10^{-2,0} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. 71

Figura 27 - Gráfico de k_{obs} versus [ácido vanílico] reação entre ácido vanílico e DPPH[•] a $25 \pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em meio de emulsão aquosa Tween-20[®] com concentração hidrogeniônica de $10^{-2,0} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. 72

Figura 28 - Estruturas representando o equilíbrio entre as formas do ânion radical estável formado a partir do ácido vanílico. 73

Figura 29 - Espectro eletônico de absorção das espécies MbFe(III) na concentração de $1,3\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e sua forma oxidada MbFe(IV)=O na concentração de $1,16\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, em tampão fosfato $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $I = 0,32$ (NaCl) concentração hidrogeniônica de $10^{-7,4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. 74

Figura 30 - Espectro eletrônico de diferença de absorbância obtido para a reação da espécie MbFe(IV)=O na concentração de $6,7\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e vanilina na concentração de $2\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em tampão fosfato $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $I = 0,32$ (NaCl) concentração hidrogeniônica de $10^{-7,4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, intervalo de tempo de 10 s entre cada aquisição. 75

Figura 31 - Variação da absorção no comprimento de onda de 580 nm em função da evolução temporal da reação de uma solução contendo $3,1\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de MbFe(IV)=O e $0,7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de vanilina em tampão fosfato $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $I = 0,32$ (NaCl) com concentração hidrogeniônica de $10^{-7,4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (linha preta) em comparação ao decaimento natural da ferrilmioglobina ($6,7\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (linha vermelha). 76

Figura 32 - Gráfico de k_{obs} versus [vanilina] da reação entre diferentes concentrações de vanilina e uma solução contendo $3,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MbFe(IV)=O a $25 \pm 0,1$ °C em tampão fosfato $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $I = 0,32$ (NaCl) com concentração hidrogeniônica de $10^{-7,4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 77

Figura 33 - Espectro eletrônico de diferença de absorbância obtido para a reação da espécie MbFe(IV)=O na concentração de $6,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e ácido vanílico na concentração de $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em tampão fosfato $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $I = 0,32$ (NaCl) concentração hidrogeniônica de $10^{-7,4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, intervalo de tempo de 10 s entre cada aquisição. 80

Figura 34 - Variação da absorção no comprimento de onda de 580 nm em função da evolução temporal da reação de uma solução contendo MbFe(IV)=O na concentração de $7,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e ácido vanílico na concentração de $8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em tampão fosfato $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $I = 0,32$ (NaCl) com concentração hidrogeniônica de $10^{-7,4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em comparação ao decaimento natural da ferrilmioglobina ($6,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) (linha vermelha). 81

Figura 35 - Gráfico de k_{obs} versus [ácido vanílico] reação entre ácido vanílico em diferentes concentrações e uma solução de MbFe(IV)=O na concentração de $7,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ a $25 \pm 0,1$ °C em tampão fosfato $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $I = 0,32$ (NaCl) concentração hidrogeniônica de $10^{-7,4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 82

Lista de tabelas

Tabela 1 - Classificação dos compostos fenólicos de acordo com a unidade básica de carbono, adaptado da referência ¹²	18
Tabela 2 - Valores do coeficiente de absorvidade molar, ϵ ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) nos comprimentos de onda de excitação e emissão	46
Tabela 3 - Constante de associação e número de sítios ligantes determinados através da equação de Stern-Volmer	49
Tabela 4 - Constantes de associação (K_A) e dissociação (K_D) em meio aquoso com diferentes concentrações hidrogeniônicas.	55
Tabela 5 - Valores de constantes de dissociação para a interação entre quercetina e BSA proposta por outros autores	56
Tabela 6 - Parâmetros termodinâmicos e K_A para titulação microcalorimétrica da solução de BLG de concentração $178,9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ com solução de vanilina $49,56 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	58
Tabela 7 - Valores de ΔH de diluição da vanilina e constante de dissociação a diferentes concentrações de vanilina em diferentes temperaturas	60
Tabela 8 - Constantes de dissociação e associação entre vanilina e BLG em diferentes condições utilizando-se diferentes técnicas analíticas	62
Tabela 9 - Constantes de velocidade bimolecular ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) da reação entre a vanilina e seus complexos com o radical DPPH• a diferentes temperaturas em meio de emulsão aquosa Tween-20® com concentração hidrogeniônica de $10^{-2,0} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$	67
Tabela 10 - Parâmetros de ativação para a reação de redução do radical DPPH• pela vanilina e seus complexos com BSA e BLG	68
Tabela 11 - Constantes de velocidade bimolecular ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) da reação entre o ácido vanílico e seus complexos com o radical DPPH• a diferentes temperaturas em meio de emulsão aquosa de Tween-20® com concentração hidrogeniônica de $10^{-2,0} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$	72
Tabela 12 - Parâmetros termodinâmicos para o estado de transição para reações entre ácido vanílico e seus complexos com proteínas e o radical DPPH•	73

Tabela 13 - Constantes de velocidade bimolecular ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) da reação entre a vanilina e seus complexos com MbFe(IV)=O a diferentes temperaturas em tampão fosfato $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $I=0,32$ (NaCl) e concentração hidrogeniônica de $10^{-7,4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 77

Tabela 14 - Parâmetros termodinâmicos para o estado de transição para reações entre vanilina e seus complexos com proteínas e a espécie reativa MbFe(IV)=O 79

Tabela 15 - Constantes de velocidade bimolecular ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) da reação entre o ácido vanílico e seus complexos com MbFe(IV)=O a diferentes temperaturas em tampão fosfato $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $I=0,32$ (NaCl) concentração hidrogeniônica de $10^{-7,4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 82

Tabela 16 - Parâmetros termodinâmicos para o estado de transição para reações entre ácido vanílico e seus complexos com proteínas e a espécie reativa MbFe(IV)=O 84

Abreviações

BLG - β -lactoglobulina

BSA - do inglês bovine serum albumin

Cys - cisteína

DPPH[•] - Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

ET – do inglês *electron transfer*

HO[•] - radical hidroxila

HSA - do inglês human serum albumin

ITC - do inglês *isothermal titration calorimetry*

MbFe(III) - proteína mioglobina

MbFe(IV)=O - proteína ferrilmioglobina

MbFe(IV)=O[•] - radical perferrilmioglobina

NHE - do inglês *normal hydrogen electrode*

RO[•] - radical alcóxila

RO₂[•] - radical peróxila

SPET - do inglês *sequential proton electron transfer*

Trp - triptofano

PCET - do inglês *proton coupled electron transfer*

HAT - do inglês *hydrogen atom transfer*

NAD - do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*

Sumário

Resumo

Abstract

Lista de figuras

Lista de tabelas

Abreviações

1. Introdução	17
1.1. Bebidas Lácteas Aromatizadas	22
1.2. Proteínas do Soro do Leite	23
1.3. Mioglobina e Atividade de Pseudoperoxidase	26
2. Objetivos e Justificativa	31
3. Materiais e Métodos	32
3.1. Reagentes	32
3.2. Espectroscopia de Emissão Molecular	32
3.3. Cinética da Reação entre os Compostos Fenólicos e seus Complexos com Proteínas do Soro do Leite com o Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•)	34
3.4. Cinética da Reação entre os Compostos Fenólicos e seus Complexos com Proteínas do Soro do Leite com espécies de Ferro Hipervalente (MbFe(IV)=O)	35
3.5. Titulação Microcalorimétrica	36
4. Resultados e Discussões	37
4.1. Espectro de Emissão Molecular – Complexos Proteína-Composto Fenólico	37
4.2. Cinética de Redução do Radical DPPH•	62
4.2.1. Experimentos de redução do radical DPPH• pela vanilina	63
4.2.2. Experimentos de redução do radical DPPH• pelo ácido vanílico	70
4.3. Cinética de Redução da Espécie Ferro – Heme Hipervalente	74
4.3.1. Reações envolvendo vanilina.	74
4.3.2. Reações envolvendo ácido vanílico.	80
5. Conclusões	84
6. Referências Bibliográficas	86

1. Introdução

Um vasto número de estudos epidemiológicos sugere a influência de fatores da dieta na causa ou prevenção de diversas doenças, incluindo câncer, doenças coronárias, má formação congênita e catarata^{1,2,3}. Há uma forte evidência que dietas ricas em frutas e vegetais, tal como a dieta mediterrânea⁴, estão associadas à baixa incidência de doenças cardiovasculares e do câncer. Entre os diversos microconstituintes de vegetais e frutas, os compostos fenólicos se encontram como possíveis mediadores destes efeitos benéficos na prevenção destas doenças. Inúmeros benefícios à saúde estão atrelados ao consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos tais como, a ação antitumoral⁵, antimicrobiana⁶, ação preventiva a doenças cardiovasculares⁷ e degenerativas⁸. A correlação entre a ingestão de compostos fenólicos e seus efeitos benéficos à saúde, principalmente relativos à prevenção do câncer, vem sendo descrita por vários estudos epidemiológicos^{9,10}. Considerando o fator nutricional, a biodisponibilidade destes compostos fenólicos na dieta passa a ser um aspecto crucial de seu papel na prevenção de doenças, bem como a sua atividade biológica e mecanismo de ação.

Composto fenólico tem como definição qualquer substância contendo pelo menos um anel aromático com ao menos um grupo hidroxila ligado a este anel¹¹. Os compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário das plantas, nas quais exibem inúmeras funções fisiológicas dentre elas a ação antimicrobiana, coloração (proteção e atração), aroma em folhas e frutos, e também propriedade estrutural como a proporcionada pela lignina. Os compostos fenólicos podem ser classificados de acordo com as unidades de carbono ligadas ao anel aromático de seis membros, Tabela 1¹².

Tabela 1 - Classificação dos compostos fenólicos de acordo com a unidade básica de carbono, adaptado da referência¹²

Unidades de Carbono	Estrutura
C_6	<div> </div> <div> Fenol Simples Benzoquinonas </div>
C_6C_1	<div> </div> <div> Ácidos Fenólicos Acetofenonas </div>
C_6C_2	<div> </div> <div> Ácidos Fenilacético </div>
C_6C_3	<div> </div> <div> Hidroxinamantos Fenil Propeno Cumarina Chalcona </div>
C_6C_4	<div> </div> <div> Naftoquinonas </div>
$C_6C_1C_6$	<div> </div> <div> Xantonas </div>
$C_6C_2C_6$	<div> </div> <div> Stilbenos Antraquinonas </div>

Continuação da Tabela 1.

Flavonoides

Lignana

Taninos Condensados

Taninos Hidrolisáveis

Em sua grande maioria os compostos fenólicos não são encontrados em sua forma livre nos alimentos, mas sim como ésteres de glicosídeos ou na forma de oligômeros e polímeros¹³. Na forma de éster de glicosídeo, oligomérica ou polimérica, os compostos fenólicos têm a sua absorção no trato gastrointestinal prejudicada devido ao aumento da massa molecular¹³. Geralmente compostos fenólicos de menor massa molecular possuem maior absorção pelo organismo humano¹⁴. Rice-Evans et al.¹⁵ encontrou a presença da forma glicosilada de flavonas no plasma sanguíneo, porém, o mecanismo de absorção pelo trato intestinal destas gliconas ainda não foi elucidado. A concentração de compostos fenólicos no plasma sanguíneo após a ingestão de alimentos dificilmente ultrapassa 1 μM , enquanto que no lúmen intestinal sua concentração é elevada e da ordem de mM ¹⁶. Em vias gerais, podemos dizer que a grande maioria dos compostos fenólicos da dieta é rapidamente eliminada na urina e bile e apenas um número muito pequeno é capaz de ser absorvido no intestino.

Desta forma, a simples ingestão de um alimento rico em compostos fenólicos não garante sua biodisponibilidade, para tal deve-se conhecer o metabolismo, a absorção, o tempo de meia vida efetiva, os mecanismos de ativação e inativação e a excreção do composto pelo organismo.

Alternativamente a baixa biodisponibilidade, podemos considerar que o consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos tem um impacto direto na mucosa do intestino, protegendo-a contra o estresse oxidativo ou a ação de carcinógenos. A Figura 1 ilustra os possíveis locais de ação antioxidante por compostos fenólicos no trato gastrointestinal.

Figura 1 - Principais formas de ação dos antioxidantes no trato gastrointestinal adaptado da referência¹⁷.

O trato gastrointestinal é freqüentemente exposto a altas concentrações de pró-oxidantes, como por exemplo, íons de ferro e cobre presentes na dieta e em alguns suplementos alimentares. Estes íons podem reagir com peróxidos e hidroperóxidos, produtos de oxidação comumente encontrados em alimentos, em reações do tipo Fenton e assim produzir radicais reativos¹⁸. Quantidades elevadas de H_2O_2 (podendo chegar a 100 μM) podem ser encontradas em algumas bebidas

como chás e café, principalmente solúvel¹⁹, levando a formação do radical^{*} HO[•] (E = 2,4 V vs. NHE). Portanto, podemos considerar o trato gastrointestinal como um dos principais sítios de ação de antioxidantes^{†20} naturalmente presentes em alimentos tais como frutas e verduras.

1.1. Bebidas Lácteas Aromatizadas

As atuais tendências de mercado colocam em foco a funcionalidade de alguns alimentos tais como bebidas lácteas[‡] contendo compostos bioativos em sua formulação. Os ácidos ômega-3 e fitoesteróis que reduzem os níveis de colesterol, e os flavonóides que atuam na prevenção de câncer de mama, cólon e próstata, estão sendo adicionados à formulação de produtos lácteos para a produção de alimentos funcionais²¹.

Entretanto, o uso de aditivos com o objetivo de agregar características funcionais ao alimento coloca em questões à influência dos demais constituintes presentes no produto, em especial as proteínas do soro do leite, sobre a funcionalidade destes aditivos. Em recentes estudos Serafini et al.²² demonstrou que flavonóides, em especial a epicatequina, presente no chocolate tem sua absorção reduzida pela presença de leite no produto e conseqüentemente baixo teor no plasma sanguíneo.

A baunilha é reconhecidamente o aromatizante mais empregado na indústria de alimentos e cosméticos no mundo²³. A produção anual do extrato natural de baunilha chega a 1,2 t em Madagascar, maior produtor mundial.²⁴

^{*} O termo radical é definido como qualquer espécie estável ou transiente que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, ou seja, momento de *spin* não nulo, $S \neq 0$.

[†] Qualquer substância que quando presente em baixas concentrações comparável com um substrato susceptível à oxidação retarda significativamente ou até inibe a oxidação deste substrato.

[‡] Segundo o MAPA, bebida láctea é o produto obtido a partir de leite ou leite reconstituído e/ou derivados de leite, reconstituídos ou não, fermentado ou não, com ou sem adição de outros ingredientes, onde a base láctea represente pelo menos 51% m/m do total de ingredientes. A bebida láctea é composta por uma mistura de soro de leite, resultante da fabricação de queijos, e leite; em geral sem composição nutricional definida.

O aroma natural de baunilha é extraído através do processamento das favas de uma orquídea do gênero *Vanilla*. Existem mais de 110 espécies identificadas, mas apenas três possuem interesse comercial: a *Vanilla pampoua*, *Vanilla tahitensis* e *Vanilla planifolia*²⁴. Os compostos ativos de aroma responsáveis pelas características sensoriais da baunilha são os seguintes fenóis simples: vanilina (3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído) 2 % m/m; 4-hidroxibenzaldeído 0,2 % m/m; 4-hidroxibenzilmetileter 0,02 % m/m; ácido acético 0,02 % m/m; e ácido vanílico com teor aproximado de 0,01 % m/m^{23,24}. A Figura 2 ilustra a estrutura molecular dos compostos fenólicos majoritários presentes no extrato de baunilha.

Figura 2 - Estrutura molecular dos principais componentes responsáveis pelas características sensoriais do aroma de baunilha.

1.2. Proteínas do Soro do Leite

O leite bovino é basicamente composto de água 86,6 %, gordura 4,1 %, proteínas 3,6 % e lactose 5 %²⁵. As proteínas do leite podem ser classificadas em dois grupos: o primeiro grupo corresponde às caseínas (α , β e κ) que representam

80 % do conteúdo protéico total do leite e o segundo grupo corresponde às chamadas proteínas do soro (“whey proteins”) e é constituído principalmente pela β -lactoglobulina (BLG), representando 50 % das proteínas do soro e 12 % do total de proteínas totais do leite bovino.²⁶

A BLG possui 168 resíduos de aminoácidos, estrutura globular com massa molecular de 18,4 kDa e ponto isoelétrico de 4,8²⁷. A estrutura secundária da β -lactoglobulina (BLG) é majoritariamente composta de β -folhas (54%) e α -hélices (17%). Sua estrutura tridimensional apresenta um sítio hidrofóbico em forma de cálice e por este motivo pertencente à família das lipocalinas, proteínas com função de transporte. Entretanto, a real função da BLG ainda não foi definida.²⁸ A Figura 3 ilustra a estrutura tridimensional da β -lactoglobulina.

Figura 3 - Estrutura cristalográfica da BLG a pH 7,1²⁹. Figura desenhada com o software PyMOL a partir do número de identificação 1BSQ no Protein Data Bank.

O sítio hidrofóbico da estrutura tridimensional tem seu acesso controlado pela concentração hidrogeniônica do meio; baixos valores de pH promovem o fechamento do sítio, enquanto que valores mais altos permitem a exposição do sítio, possibilitando a interação com diversas moléculas. Este mecanismo pode ser um indício da atividade desta proteína como sendo de transporte e proteção de pequenas moléculas através do trato gastrointestinal. Os filhotes de mamíferos que se alimentam do leite materno, teriam as substâncias ingeridas “protegidas” por este mecanismo de complexação por inclusão, para serem liberadas e absorvidas em locais específicos do trato gastrointestinal onde o pH é maior^{30,31}.

A BLG bovina assume diferentes formas de agregação em sua estrutura quaternária de acordo com o pH do meio. Em concentrações hidrogeniônicas abaixo de $10^{-3,5}$ e acima de $10^{-7,5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ assume a conformação de monômero, entre $10^{-3,5}$ e $10^{-5,5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ octâmero e entre $10^{-5,5}$ e $10^{-7,5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dímero²⁶.

A albumina de soro bovino (BSA) representa cerca de 10 % do total de proteínas do soro do leite bovino²⁶. Sua cadeia de aminoácidos é composta de 583 unidades totalizando a massa molecular de 66,4 kDa, e seu ponto isoelétrico é 5,15. Em contraste a BLG, a estrutura secundária da BSA é caracterizada por um alto conteúdo de α -hélice (~51%) e quase nenhuma estrutura β . A estrutura tridimensional da albumina, Figura 4, sofre mudanças em sua conformação, principalmente quando não se encontra em condições fisiológicas o que dá origem a quatro isômeros para a forma normal (N) da BSA, são eles: *fast* (F) a pH 4,0; *extended* (E) pH abaixo de 3,0; *basic* (B), próximo a pH 8 e *aged* (A), pH próximo a 10³². Durante a transição entre a forma N para F encontra-se as formas de monômero, dímero e tetrâmero em pH 3,75, 3,60, e 3,40 respectivamente. Em valores de pH > 6,7 encontra-se como dímero³².

Figura 4 - Estrutura cristalográfica da HSA a pH 5,0³³. Figura desenhada com o software PyMOL a partir do número de identificação 1BM0 no Protein Data Bank.

As albuminas BSA e HSA (albumina de soro humano) possuem inúmeras funções biológicas além de manter o equilíbrio fisiológico do sangue, exibem importante função de transporte de ácidos graxos, vitaminas e hormônios³².

1.3. Mioglobina e Atividade de Pseudoperoxidase

Estudos epidemiológicos realizados durante as últimas décadas colocaram em evidência a relação direta entre o alto consumo de carne vermelha e a incidência de câncer no trato gastrointestinal^{34,35}. Este fato é atribuído à formação das espécies reativas ferrilmioglobina (MbFe(IV)=O) e perferrilmioglobina ($\bullet\text{MbFe(IV)=O}$)

resultantes da reação do pigmento da carne metmioglobina (MbFe(III)) com peróxidos e hidroperóxidos no sistema digestivo³⁶.

A mioglobina é uma proteína globular encontrada no sarcoplasma das células musculares. A sua concentração está geralmente na faixa de $2\text{-}7 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso úmido e é dependente de vários fatores como a espécie animal, tipo de músculo, condições ambientais, idade e dieta do animal³⁷. A massa molecular da mioglobina é de $16,95 \text{ kDa}$ e é constituída por 153 resíduos de aminoácidos com pequenas variações dependendo da espécie animal³⁸. A estrutura secundária da proteína é majoritariamente α -hélice (75 %) composto por oito seções de hélices com 3 a 23 resíduos, denominados de A a H proporcionando a proteína uma estrutura compacta com dimensões aproximadas de $45 \times 35 \times 25 \text{ \AA}$ ³⁹. A mioglobina consiste de uma parte protéica, globina, na qual um grupo heme está localizado dentro de um bolsão (fenda) hidrofóbico. O grupo prostético heme possui um átomo de ferro central o qual é responsável pelas múltiplas funções da mioglobina relacionadas a reações redoxes e complexação de ligantes³⁸. A Figura 5 ilustra uma visão tridimensional da estrutura da mioglobina incluindo o grupo prostético, protoporfirina IX.

Figura 5 - Mioglobina de coração de cavalo, em destaque, porfirina com núcleo de ferro pH 6,96⁴⁰. Figura desenhada com o software PyMOL a partir do número de identificação 1NZ2 no Protein Data Bank.

A catálise clássica mediada por peroxidases envolve a oxidação da enzima férrica por hidroperóxidos a espécies hipervalentes conhecidas como composto I, no qual o centro metálico se encontra com o estado de oxidação duas unidades acima da enzima em repouso⁴¹. O composto I oxida um co-substrato por transferência de um elétron para formar o composto II que retorna ao estado inicial de repouso após oxidar uma segunda molécula de co-substrato^{41,42}, Figura 6. Ambas as espécies hipervalentes são potentes oxidantes sendo o potencial de redução da espécie MbFe(IV)=O , Composto II, de 0,9 V vs. ENH (pH = 7) e da espécie $^{\bullet}\text{MbFe(IV)=O}$, Composto I, superior a 0,9 V vs. ENH porém, o valor exato não é conhecido⁴³.

Figura 6 - Ciclo catalítico típico de enzimas peroxidases.

No tocante de atividade de pseudoperoxidase, a diferença de função biológica entre a mioglobina e as peroxidases (transporte de dioxigênio vs. catálise de reações redox) é decorrente da interação das proteínas com o grupo heme e com potenciais substratos. As espécies hipervalentes de mioglobina perferrilmioglobina, $\bullet\text{MbFe(IV)=O}$, e a ferrilmioglobina, MbFe(IV)=O , são os compostos de mioglobina análogos ao Composto I e II das enzimas peroxidase, respectivamente. Estas espécies hipervalentes são formadas pela reação do pigmento marrom da carne metmioglobina, MbFe(III) , com hidroperóxidos e outros potentes agentes oxidantes em meio neutro e soluções alcalinas. A espécie MbFe(IV)=O pode também ser formada pela reação direta do pigmento, vermelho, MbFe(II) com hidroperóxidos. Em ambas as espécies hipervalentes, o centro metálico de Fe encontra-se no estado de oxidação +4 com seu sexto sítio de coordenação ocupado por um grupo oxo e para a espécie $\bullet\text{MbFe(IV)=O}$, a qual é uma espécie com um estado de oxidação superior a ferrilmioglobina, o segundo equivalente de oxidação está presente como um radical localizado no fragmento globina.

A reatividade da espécie heme-Fe(IV)=O foi investigada pelo uso de vários substratos redutores^{44,45,46} e um perfil característico em função da concentração hidrogeniônica do meio foi observado, indicando o envolvimento da espécie de ferro hipervalente em um equilíbrio prótico ($\text{MbFe(IV)=O, H}^+ \leftrightarrow \text{MbFe(IV)=O} + \text{H}^+$)⁴⁷. A carga efetiva do centro reacional em um meio de cloreto é +1,0; obtido pela análise cinética do efeito salino na auto-redução catalítica da espécie MbFe(IV)=O através da teoria de Bjerrum-Brondsted⁴⁷. A forma protonada, MbFe(IV)=O, H^+ , apresenta valores de pKa determinados entre 4,9–5,3 dependendo do redutor utilizado. Assim, é esperado que o próton aumente a reatividade da espécie ferro hipervalente por um simples efeito de aumento na carga positiva, que facilita a transferência de elétrons do redutor⁴⁷. Conseqüentemente, a protonação da espécie MbFe(IV)=O leva a uma maior reatividade frente a substratos redutores e a uma maior atividade pró-oxidativa em sistemas com alta concentração hidrogeniônica em especial no trato gástrico (pH = 1,6 no estômago). Espécies derivadas da metmioglobina podem ainda funcionar como agente catalisador de processos oxidativos envolvendo a transferência de 1 ou 2 elétrons, como representado na Figura 7.

Figura 7 - Envolvimento da metmioglobina em processos de 1 ou 2 elétrons na peroxidação lipídica⁴⁷.

2. Objetivos e Justificativa

O atual aumento da competitividade nas diferentes cadeias agro-industriais, tanto no mercado doméstico quanto internacional, tem forçado produtores e indústrias a desenvolverem produtos de melhor qualidade no tocante a segurança alimentar, rastreabilidade e propriedades sensoriais. Neste sentido um dos maiores desafios da indústria é o desenvolvimento de produtos que combinem conveniência, “frescor”, e benefícios à saúde. O trato gastrointestinal é constantemente exposto a ação de espécies oxidantes originárias da dieta. Durante a redução catalítica de hidroperóxidos, a mioglobina (pigmento da carne) é transitoriamente ativada a espécies heme de ferro hipervalentes, perferrilmioglobina e ferrilmioglobina, as quais são conhecidamente potentes oxidantes capazes de lesionar a mucosa gastrointestinal. Assim, alimentos ricos em antioxidantes podem promover a proteção da mucosa intestinal de lesões decorrentes do desbalanço redox da dieta.

O presente trabalho teve como principal objetivo verificar a influência da presença de proteínas do soro do leite na atividade antioxidante de compostos fenólicos, em particular derivados da vanilina, frente a espécies oxidantes em meio mimetizando o trato gastrointestinal e alimentos de base láctea.

Os objetivos específicos são relacionados abaixo:

- evidenciar as interações entre as principais proteínas do soro do leite (β -lactoglobulina e albumina sérica) e os compostos fenólicos (vanilina e ácido vanílico) majoritários na composição do aroma de baunilha, principal flavorizante na indústria alimentícia;
- prover um conhecimento detalhado da influência da interação proteína-composto fenólico na cinética de captação de radicais e na desativação do pigmento

hipervalente; condições encontradas em dietas ricas em carne vermelha e em produtos de base láctea.

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes

Albumina de soro bovino (pureza > 90 %), catalase de fígado bovino, β -lactoglobulina (pureza > 90 %), e mioglobina de coração de cavalo (pureza > 90 %) foram obtidas da Sigma-Aldrich. A proteína mioglobina foi purificada por meio de filtração em coluna Sephadex G-25 como descrito na literatura⁴⁴. O ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico (pureza de 98 %), 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (pureza de 99 %), peróxido de hidrogênio (30 % v/v), radical 2,2 – difenil-1-picril-hidrazila (pureza de 98 %), e o surfactante polioxietileno monolaureto de sorbitol (Tween - 20[®]) foram obtidos da Sigma-Aldrich e utilizados sem prévio tratamento. Os sais utilizados KHPO_4 , KH_2PO_4 , e NaCl foram todos de grau analítico e fornecidos pela J. T. Baker. Os solventes de grau HPLC etanol e clorofórmio foram obtidos da Tedia e utilizados sem prévio tratamento. A água utilizada foi previamente destilada e posteriormente deionizada em um sistema Milli-Q Millipore Co. ($18,2 \text{ M}\cdot\Omega\cdot\text{cm}$ T = 25 °C).

3.2. Espectroscopia de Emissão Molecular

Os experimentos de emissão molecular foram conduzidos em um espectrofluorímetro Hitach modelo F-4500 utilizando-se de cubetas de quartzo (Hellma GmbH & Co.KG) com quatro faces polidas e de caminho óptico de 1,0 cm; todos os experimentos foram realizados com controle de temperatura utilizando-se

de um banho termostático Nova Ética modelo 521/3D. Para a proteína BLG os experimentos foram executados com abertura de fenda de excitação e emissão de 10 nm e para a proteína BSA as aberturas de fenda para a excitação e emissão foram de 5 nm. O comprimento de onda de excitação para ambas as proteínas foi 280 nm e a emissão foi registrada no intervalo de 295 – 500 nm.

As soluções estoque das proteínas BSA e BLG foram preparadas nas concentrações de $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em tampão fosfato $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ com pH = 7,4 ou 6,4 (I = 0,32; NaCl) ou em solução de HCl $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. A solução estoque de vanilina com concentração de $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ foi preparada em tampão fosfato $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ com pH = 7,4 ou 6,4 (I = 0,32; NaCl) ou em solução de HCl $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ambas contendo 20 % de etanol. O experimento para a determinação da constante de dissociação, K_D , foi realizado variando-se a concentração analítica (C_a) do composto fenólico (0 - $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) e mantendo-se a concentração de proteína constante em $1 \cdot \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

As concentrações analíticas das soluções estoque foram aferidas por espectroscopia eletrônica de absorção a partir dos valores de absortividade molar reportados na literatura ou determinados experimentalmente:

BSA $\epsilon_{280\text{nm}} = 4,45 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ³²; BLG $\epsilon_{280\text{nm}} = 1,76 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ⁴⁸
MbFe(III) $\epsilon_{525\text{nm}} = 7,7 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; ácido vanílico
 $\epsilon_{260\text{nm}, \text{pH} 2,0} = 1,1 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; ácido vanílico,
 $\epsilon_{260\text{nm}, \text{pH} 7,4} = 8,7 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; vanilina $\epsilon_{340\text{nm}, \text{pH} 2,0} = 5,5 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;
vanilina $\epsilon_{340\text{nm}, \text{pH} 7,4} = 1,4 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.3. Cinética da Reação entre os Compostos Fenólicos e seus Complexos com Proteínas do Soro do Leite com o Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•])

A reação do radical DPPH[•] com a vanilina e o ácido vanílico, na ausência ou presença de proteínas do soro do leite (BLG e BSA), foi investigada em meio aquoso na presença de micelas de Tween-20[®] por espectroscopia eletrônica de absorção. Para tanto se utilizou de um espectrofotômetro Hitach modelo U-3501e de celas de quartzo com dois compartimentos (Hellma GmbH & Co.KG), caminho óptico de 1,0 cm, para mistura rápida dos reagentes (tempo de mistura ~ 1s). Todos os experimentos foram realizados com a temperatura controlada por um banho termostático da Nova Ética modelo 521/3D e acuracidade de 0,1 °C.

As soluções do radical DPPH[•] em meio aquoso de micelas de Tween-20[®] com $C_{H^+} = 10^{-2,0} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ foram preparadas conforme o seguinte procedimento: dissolveu-se a massa requerida de DPPH[•] no mínimo volume de clorofórmio, adicionou-se lentamente sobre agitação vigorosa o volume requerido de solução aquosa de Tween-20[®] ($C_{\text{Tween-20}} = 4,0 \cdot 10^{-2} \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) com pH = 2,0 ajustado com HCl 12 mol·L⁻¹. Evaporou-se o clorofórmio da solução através de um fluxo de argônio sendo o volume final aferido com a solução aquosa de Tween-20[®]. A concentração analítica do radical DPPH[•], $C_{\text{DPPH}^{\bullet}} = 6,50 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, foi então corrigida por espectrofotometria UV-Vis ($\epsilon_{525\text{nm}} = 1,25 \cdot 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

As soluções estoque de vanilina ($C_{\text{vanilina}} = 8,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e de ácido vanílico ($C_{\text{vanílico}} = 1,0 \cdot 10^{-1} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) foram preparadas pela direta dissolução do sólido em etanol e o volume ajustado com solução aquosa de Tween-20[®] ($C_{\text{Tween-20}} = 4,0 \cdot 10^{-2} \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) com $C_{H^+} = 10^{-2,0} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (HCl). O teor final de etanol na solução foi de 20 %. A concentração analítica de vanilina nos experimentos variou de $2 - 15 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e

de ácido vanílico de $2,5 - 14,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, mantendo-se sempre condição de pseudo-primeira ordem com relação ao radical.

As soluções estoques de proteína BLG e BSA foram preparadas na concentração de $8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e a sua concentração analítica verificada espectrofotometricamente. O complexo proteína-fenol foi preparado mantendo a concentração de proteína constante a $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. A concentração analítica de vanilina nos experimentos variou de $2 - 9 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e de ácido vanílico de $2,5 - 17,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, mantendo-se sempre condição de pseudo-primeira ordem com relação ao radical.

3.4. Cinética da Reação entre os Compostos Fenólicos e seus Complexos com Proteínas do Soro do Leite com espécies de Ferro Hipervalente (MbFe(IV)=O)

Síntese do pigmento hipervalente MbFe(IV)=O

Preparou-se uma solução $0,2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ da proteína metmioglobina (MbFe(III)) em tampão fosfato $5,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ com pH 7,4 e força iônica 0,32 ajustada com NaCl, a qual foi submetida a purificação em coluna recheado com Sephadex G-25 de dimensões 5 x 1 cm. Após o procedimento de purificação, a concentração analítica de MbFe(III) foi determinada espectrofotometricamente ($\epsilon_{525\text{nm}} = 7,70 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Posteriormente, o pigmento hipervalente, MbFe(IV)=O , foi gerado por oxidação da metmioglobina (MbFe(III)) com H_2O_2 em excesso (1:3) e a reação de oxidação terminada após 3 minutos com a adição de $10 \mu\text{L}$ de uma solução $47,4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de catalase. A concentração da espécie MbFe(IV)=O foi então determinada espectrofotometricamente como descrito por Carlsen et al.⁴⁶:

$$[\text{MbFe(IV)=O}] = -62(A_{490\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) + 242 (A_{650\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) - 123 (A_{580} - A_{700\text{nm}})$$

Cinética de desativação da Ferrilmioglobina (MbFe(IV)=O)

A concentração típica de ferrilmioglobina nos experimentos cinéticos foi de $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. As soluções de BSA, BLG, vanilina e ácido vanílico foram preparadas conforme descrito no item anterior. O complexo proteína – fenol foi preparado com a concentração de proteína constante ($2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$). A concentração analítica de vanilina nos experimentos variou de 0 a $9 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e do ácido vanílico 0 a $12 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, sempre obedecendo condições de pseudo-primeira ordem em relação ao pigmento hipervalente. O decaimento da espécie ferrilmioglobina foi monitorado em 580 nm em um espectrofotômetro Hitach modelo U4100 e as reações conferidas em celas de quartzo com dois compartimentos (Hellma GmbH & Co.KG), caminho óptico de 1,0 cm, para mistura rápida dos reagentes (tempo de mistura $\sim 1\text{s}$). Todos os experimentos foram realizados com a temperatura controlada por um banho termostático da Nova Ética modelo 521/3D.

3.5. Titulação Microcalorimétrica

Os experimentos de titulação microcalorimétrica foram realizados em um microcalorímetro MicroCal modelo VP-ITC alocado no Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria do Laboratório Nacional de Biociências (LNbio) – Campinas - SP. Os experimentos foram realizados em tampão fosfato $5,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ com pH 7,4, força iônica de $0,32 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ajustada com NaCl e contendo 5 % de etanol.

Uma solução de $178,9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de BLG foi preparada e submetida à diálise exaustiva no próprio tampão em que foi preparada. A concentração da solução de BLG foi determinada utilizando-se o método descrito por Edelhoch⁴⁹. A solução de proteína foi titulada com solução de $49,56 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de vanilina em regime de

injeções diferenciais, em um total de 35 injeções, variando-se o volume de 1 - 15 μL , até a completa saturação dos sítios para a obtenção das curvas calorimétricas.

4. Resultados e Discussões

4.1. Espectro de Emissão Molecular – Complexos Proteína-Composto Fenólico

A espectroscopia de emissão molecular é largamente empregada para avaliar parâmetros relativos à interação entre proteínas e seus ligantes, por meio da supressão de fluorescência^{50,51}. A sonda de fluorescência em proteínas comumente monitorada é o aminoácido residual triptofano. Os dados obtidos destes experimentos são relativos aos fenômenos que ocorrem próximos à sonda de fluorescência e não refletem todo o ambiente. Porém, alguns autores não consideram que os fenômenos de supressão são relativos aos arredores do triptofano e assumem a supressão da fluorescência como um efeito global além de não considerarem a natureza da supressão (estática ou dinâmica)⁵². Outro erro recorrente está relacionado ao fato de certas moléculas supressoras de fluorescência absorverem fração de radiação luminosa nos mesmos comprimentos de onda de excitação e emissão ocasionando uma importante fonte de erros⁵². Desta maneira, a correção do efeito de filtro interno deve ser realizada considerando a absorção de radiação luminosa inerente ao aumento da concentração do ligante para ambos os comprimentos de onda de excitação e emissão.

Com o intuito de avaliar a formação do complexo entre as proteínas do soro do leite (BLG e BSA) com os dois principais compostos fenólicos do aroma de baunilha, nominalmente vanilina e ácido vanílico, utilizamos da espectroscopia de emissão molecular e como sonda o aminoácido triptofano presente em ambas as

proteínas e o qual a emissão molecular domina o espectro de fluorescência na região do UV.

A BLG possui duas unidades do aminoácido triptofano residual (Trp19 e Trp61), sendo que a unidade Trp19 está presente próxima ao sítio hidrofóbico, mais internamente localizado e protegido da camada de solvente. Já a outra unidade (Trp61) está próxima a ponte de dissulfeto Cys66-Cys160 e encontra-se na superfície da proteína, em contato com o solvente, como pode ser visualizado na Figura 8. Por estas razões, a fluorescência intrínseca da BLG pode ser atribuída exclusivamente ao resíduo de triptofano Trp19, já que a contribuição do Trp61 para a intensidade de fluorescência é muito pequena devido à sua localização na estrutura terciária da BLG ⁵³.

Figura 8 - Estrutura cristalográfica da BLG a pH 7,1²⁹. Figura desenhada software WebLab ViewerLite a partir do número de identificação 1BSQ no Protein Data Bank. Aminoácido triptofano foi destacado.

A BSA também possui duas unidades de triptofano residual, uma das unidades, o triptofano Trp212 está localizado no bolsão hidrofóbico da proteína, e a outra, o triptofano Trp134, está localizado na superfície, ou seja, na região hidrofílica da molécula, como pode ser observado na Figura 9. Da mesma forma, como atribuído para a BLG podemos assumir a fluorescência intrínseca da BSA como derivada exclusivamente do resíduo Trp212, o qual se encontra inclusa no bolsão hidrofóbico.

Figura 9 - Estrutura cristalográfica da HSA a pH 5,0³³. Figura desenhada software WebLab ViewerLite a partir do número de identificação 1BM0 no Protein Data Bank. Os aminoácidos em evidência são relativos à posição dos triptofanos na proteína BSA.

Assim, quando há a interação de moléculas com a BLG ou com a BSA, a fluorescência do resíduo triptofano é alterada dependendo do impacto desta interação na conformação da proteína ou da proximidade do ligante com a sonda⁵⁴. Deste modo, para a interação entre (n) moléculas de ligante (L), supressor de fluorescência, com a proteína (P) podemos escrever a reação de supressão de fluorescência abaixo:

A constante de ligação, K_A , pode então ser descrita pela seguinte equação de equilíbrio:

$$K_A = \frac{[L_n P]}{[L]^n [P]} \quad (1)$$

onde, $[L]$ e $[P]$ são as concentrações analíticas do supressor (ligante) e da proteína, respectivamente. $[L_n P]$ é a concentração do complexo, não-fluorescente, formado entre o fluoróforo e o ligante. O valor de $[P_0]$ proporciona a concentração total de proteína, Equação 2.

$$[L_n P] = [P_0] - [P] \quad (2)$$

Desta forma temos:

$$K_A = \frac{[P_0] - [P]}{[L]^n [P]} \quad (3)$$

Como a intensidade de fluorescência do fluoróforo, triptofano, é proporcional ao teor de proteína e descrita pela equação:

$$\frac{[P]}{[P_0]} \propto \frac{F}{F_0} \quad (4)$$

onde, F_0 é a intensidade de fluorescência da amostra sem a adição do composto fenólico, ligante, e F é a intensidade de fluorescência na presença do ligante, respectivamente. Consequentemente, podemos através dos dados de supressão de fluorescência em função da concentração do ligante (L) estimar a constante de ligação no complexo proteína-composto fenólico, Equação 3. A partir da equação 3 podemos então escrever:

$$\text{Log} \left[\frac{(F_0 - F)}{F} \right] = \text{Log} K_A + n \text{Log} [L] \quad (5)$$

Deste modo, o gráfico de $\text{Log}[(F_0 - F)/F]$ versus $\text{Log}[L]$ é linear e permite o cálculo do número de sítios ligantes (n) através do coeficiente angular da reta.

A formação do complexo BLG-vanilina foi verificada experimentalmente pela supressão de fluorescência da proteína quando titulada com vanilina, como se pode ver na Figura 10. A Figura 10 ilustra os espectros de emissão de fluorescência de uma solução de $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de BLG na ausência e na presença de diferentes concentrações de vanilina ($0 - 200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) em diferentes condições de concentração hidrogeniônica e a temperatura de $25 \pm 0,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Figura 10 - Figuras A, B e C ilustram a supressão de fluorescência de 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de BLG na presença de diferentes concentrações de vanilina (0 - 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), nas concentrações hidrogeniônicas de $10^{-7.4}$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $10^{-6.4}$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $10^{-2.0}$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente. Em destaque o gráfico de $\log[(F_0 - F)/F]$ versus $\log[L]$. Concentrações de vanilina utilizadas (a-i) 0, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente.

Como observado na leitura da Figura 10, a intensidade do máximo de fluorescência, na ausência de vanilina, aumenta proporcionalmente com a concentração hidrogeniônica do meio. Este efeito pode ser explicado em decorrência do mecanismo de abertura do cálice hidrofóbico controlado pelo valor de pH do meio. Em condições ácidas com $C_{H^+} = 10^{-2,0} \text{ mol L}^{-1}$ ocorre o fechamento do sítio hidrofóbico³⁰ levando a diminuição da exposição do Trp19 ao solvente (H_2O) e como consequência o aumento do rendimento quântico de fluorescência. Entretanto, em concentrações hidrogeniônicas entre $10^{-6,4} \text{ mol L}^{-1}$ e $10^{-7,4} \text{ mol L}^{-1}$ o cálice hidrofóbico encontra-se aberto e, portanto o Trp19 é exposto ao solvente diminuindo a intensidade de emissão³⁰. Nota-se na Figura 10, que a adição de vanilina a uma solução de BLG em meio aquoso de tampão fosfato na concentração hidrogeniônica de $10^{-7,4} \text{ mol L}^{-1}$ promoveu o deslocamento do máximo de fluorescência da proteína centrado em 332 nm para comprimentos de onda de maior energia ($\Delta\lambda_{\text{máx}} = -7,2 \text{ nm}$). Entretanto, em meio aquoso com $C_{H^+} = 10^{-6,4} \text{ mol L}^{-1}$ e $10^{-2,0} \text{ mol L}^{-1}$ observa-se o deslocamento do máximo de fluorescência para comprimentos de onda de menor energia $\Delta\lambda_{\text{máx}} = +6 \text{ nm}$ e $\Delta\lambda_{\text{máx}} = +12 \text{ nm}$, respectivamente. Este comportamento pode ser atribuído a mudança de ambiente químico em que os aminoácidos Trp19 e Trp61, alterações sutis na estrutura terciária, sofrem à medida que a concentração analítica de vanilina aumenta.

A constante de associação entre a vanilina e as proteínas BSA e BLG foram determinadas utilizando-se a mesma abordagem da equação de Stern-Volmer:

$$\boxed{\text{Log} \left[\frac{(F_0)}{F_0 - F} \right] = \frac{1}{fK_A[L]} + \frac{1}{f}} \quad (6)$$

Onde, F_0 é a intensidade de fluorescência, F é a intensidade de fluorescência na presença do ligante, K_A é a constante de associação e f é a fração de fluoróforo

acessível ao ligante L. Entretanto, a vanilina possui absorção em comprimento de onda ao redor de 280-330 nm o que significa que a fração da radiação luminosa de excitação e emissão poderia ser absorvida pela vanilina (Figura 11). Fato este também propriamente observado pela leitura do espectro da Figura 10, onde se observa concomitante ao aumento da concentração de vanilina, o aparecimento de banda de emissão molecular centrada em 425 nm referente à fluorescência do supressor. Para considerar este efeito nos cálculos, foi utilizado o modelo proposto por Epps et al.⁵⁵, no qual as correções foram feitas de acordo com a Equação 7, onde F_{exp} é a intensidade de fluorescência obtida experimentalmente, ϵ_{ex} e ϵ_{em} , são os coeficientes de absortividade molar da vanilina nos comprimentos de onda de excitação e emissão do triptofano.

$$F = F_{\text{exp}} e^{-2,303(\epsilon_{\text{em}} + \epsilon_{\text{ex}})lL_0} \quad (7)$$

Figura 11 - Espectro eletrônico de absorção da vanilina na concentração de 50 μmol·L⁻¹ em meio aquoso (pH 2,0 e 7,4).

Os coeficientes de absorvidade molar da vanilina, em função da concentração hidrogeniônica do meio, nos comprimentos de onda de excitação e emissão da sonda fluorescente (Trp) foram utilizados para a correção do efeito de filtro interno estão reportados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores do coeficiente de absorvidade molar, ϵ ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) nos comprimentos de onda de excitação e emissão

λ (nm)	pH 2,0 ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)	pH 7,4 ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)
280	10079	5826
340	5478	14182
332	6389	12590

A Figura 12 apresenta a relação de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência da BLG por vanilina em diferentes concentrações hidrogeniônicas. Observa-se que o aumento da concentração hidrogeniônica proporciona um aumento na supressão da fluorescência possivelmente em função do acesso da molécula de vanilina ao Trp19 ser dependente da abertura ou fechamento do sítio hidrofóbico⁵⁶. No entanto, em condições de $C_{H^+} = 10^{-7,4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ a proteína está com carga total negativa ($pI = 4,8$) e a vanilina ($pK_a=7,4$)⁵⁷ está com 50 % de sua concentração analítica na forma aniônica e portanto efeitos de repulsão eletrostática podem diminuir o acesso da vanilina à proteína.

O fenômeno de supressão de fluorescência pode ter duas diferentes origens, a supressão estática ou supressão dinâmica⁵⁴. A supressão estática foi evidenciada obtendo-se a relação de Stern-Volmer em diferentes temperaturas. Como pode ser observado nas Figuras 12 e 13, quando a temperatura aumenta há uma diminuição no coeficiente angular das retas. O coeficiente angular diminui devido ao aumento da supressão pela complexação formando uma espécie que não possui emissão. Este dado é essencial, pois caso a supressão fosse de natureza dinâmica, o

complexo proteína-fenol não é formado e a supressão ocorre apenas em processo cinético e colisional. Corroborando com indícios de supressão estática estão os valores de constante de velocidade específica da supressão do estado singleto excitado, k_q , determinados experimentalmente pela abordagem de Stern-Volmer, considerando o $\tau = 1,4$ ns para BLG⁵⁶, com valores de $2,07 \cdot 10^{13} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $2,2 \cdot 10^{13} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $1,57 \cdot 10^{13} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, para os valores de $C_{H^+} = 10^{-2,0} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $10^{-6,4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e $10^{-7,4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ respectivamente. Estes valores de k_q superiores ao valor esperado para reações bimoleculares controlados por difusão em meio aquoso indicam que o processo de desativação do estado singleto excitado ocorre em meio confinado e que o fluoróforo e o supressor estão em contato próximo.

Figura 12 - Gráfico de F_0/F versus [Vanilina] (Equação de Stern-Volmer) para a BLG na concentração de $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e vanilina (0-60) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ a temperatura de 15°C e 35°C.

A análise da linearidade da supressão de fluorescência em função da concentração analítica de vanilina acima de $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Figura 14) indica um

aumento brusco da supressão em condições de elevados teores de vanilina. Este fato sugere que a proteína possui dois fluoróforos com constantes de supressão próximas, Trp19 e Trp61, e neste caso o aumento do teor de vanilina promove alterações sutis no ambiente químico do Trp19 passando este a contribuir assim para o fenômeno de fluorescência.

Figura 13. Gráfico de F_0/F versus [Vanilina] (Equação de Stern-Volmer) para a BSA na concentração de $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e vanilina a temperatura de 25°C e 40°C.

Figura 14 - Gráfico de F_0/F versus [Vanilina] (Equação de Stern-Volmer) para a supressão de fluorescência de $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de BLG na presença de diferentes concentrações de vanilina ($0 - 200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), nas concentrações hidrogeniônicas de $10^{-7,4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $10^{-6,4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $10^{-2,0} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

As constantes de associação e números de sítio ligantes determinados experimentalmente para a interação entre a vanilina e as proteínas BSA e BLG são reportados na Tabela 3.

Tabela 3 - Constante de associação e número de sítios ligantes determinados através da equação de Stern-Volmer

Proteína / Ligante	pH	$K_A (\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	n
BLG / Vanilina	7,4	$(400 \pm 12) \cdot 10^2$	$1,45 \pm 0,09$
	6,4	$(470 \pm 9) \cdot 10^2$	$1,29 \pm 0,09$
	2,0	$(330 \pm 13) \cdot 10^2$	$1,47 \pm 0,06$
BSA / Vanilina	6,4	$(340 \pm 13) \cdot 10^2$	$1,46 \pm 0,03$
	2,0	$(360 \pm 11) \cdot 10^2$	$1,42 \pm 0,09$

A Figura 15 contém os espectros de supressão de fluorescência da BSA através de adições sucessivas de vanilina. Como se pode notar pela leitura do

espectro da Figura 15, na ausência de supressor, o máximo de emissão de fluorescência centrado em 340 nm (Trp134), em condições próximas ao meio fisiológico, é deslocado para 329 nm. Este deslocamento pode estar associado a alterações da estrutura terciária da proteína, visto que em valores de $C_{H^+} = 10^{-6,4}$ mol·L⁻¹ a BSA assume a estrutura terciária na forma Normal (N) e para $C_{H^+} = 10^{-2,0}$ mol·L⁻¹ a estrutura terciária assume a forma Expandida (E) proporcionando uma maior exposição das unidades do aminoácido triptofano ao solvente³². Também é observado que o rendimento quântico de fluorescência aumenta quando da dissolução da proteína em meio de tampão com condições próximas as de meio fisiológico³². Outra alteração visível no espectro é o deslocamento do máximo de emissão para valores de comprimento de onda de menor energia em função do aumento da concentração analítica de vanilina no meio titulado. Este deslocamento sugere alterações da estrutura terciária da BSA no sentido de diminuir ainda mais a exposição do Trp134 ao solvente ou então em função do recobrimento da superfície da proteína pela vanilina excluindo a água da primeira esfera de solvatação proporcionando ao Trp212 um ambiente mais hidrofóbico. Neste ultimo caso, o Trp212 passa também a contribuir para a fluorescência da proteína, sendo assim, a emissão observada seria a soma das emissões dos dois resíduos de triptofano (Trp134 e Trp212).

Figura 15 - Figuras A e B ilustram a supressão de fluorescência de 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de BSA na presença de diferentes concentrações crescentes de vanilina (0 - 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); nas concentrações hidrogeniônicas de $10^{-6,4}$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $10^{-2,0}$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente. Em destaque o gráfico de $\log[(F_0 - F)/F]$ versus $\log[L]$. Concentrações de vanilina utilizadas (a-i) 0, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente.

Com a finalidade de comparação e validação da metodologia empregada no presente trabalho para determinação das constantes de afinidade e número de sítios ligantes, os dados de supressão de fluorescência foram submetidos à outra forma de tratamento matemático. Para utilizar tal tratamento foi considerado o número de sítios ligantes igual a um e o modelo de interação seguindo o modelo de uma isoterma de Langmuir, Equação 8.

$$\Delta F = \frac{[(F_0 - F_\infty)L_0]}{K_D + L_0} \quad (8)$$

onde, a variação da intensidade ΔF representa a subtração da fluorescência corrigida pelo efeito de filtro interno F do valor de intensidade na ausência de vanilina F_0 . e F_∞ representa a emissão de fluorescência quando da total saturação dos sítios pelo ligante. Assim, para o cálculo de K_D utilizamos do ajuste não linear à Equação 8.

Figura 16 - Os gráficos A, B e C demonstram a supressão de fluorescência de $1 \cdot \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de BLG na presença de diferentes concentrações de vanilina ($0 - 200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), em meio aquoso nas concentrações hidrogeniônicas de $10^{-7,4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $10^{-6,4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e $10^{-2,0} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. No qual foi utilizado o modelo descrito pela Equação 8.

Figura 17 -Os gráficos A e B demonstram a supressão de fluorescência de $1 \cdot \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de BSA na presença de diferentes concentrações de vanilina ($0 - 200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), em meio aquoso nas concentrações hidrogeniônicas de $10^{-6,4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e $10^{-2,0} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. No qual foi utilizado o modelo da descrito pela Equação 8.

A Tabela 4 apresenta os dados de constante de associação (K_A) e dissociação (K_D) calculados através do emprego da Equação 8 para os complexos proteína-fenol. As constantes de associação e dissociação calculadas pelo emprego da Equação 8 são da mesma ordem de grandeza das constantes obtidas através da abordagem pela equação de Stern-Volmer modificada.

Tabela 4 - Constantes de associação (K_A) e dissociação (K_D) em meio aquoso com diferentes concentrações hidrogeniônicas.

Proteína / Ligante	pH	K_A ($L \cdot mol^{-1}$)	K_D ($mol \cdot L^{-1}$)
BLG / Vanilina	7,4	$(5,0 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$(2,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$
	6,4	$(5,2 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$(1,9 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$
	2,0	$(4,5 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$(2,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$
BSA / Vanilina	6,4	$(4,5 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(2,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$
	2,0	$(4,5 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$(2,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$

Comparando-se os dados apresentados nas Tabelas 3 e 4, nota-se uma pequena diferença nas constantes de associação para a BLG com alterações no pH do meio. Esta diminuição do valor de K_A para $C_{H^+} = 10^{-2} \text{ mol} \cdot L^{-1}$ para a interação entre a BLG e a vanilina quando comparado ao valor para condições com $C_{H^+} = 10^{-6,4} \text{ mol} \cdot L^{-1}$ sugere a influência da abertura do cálice hidrofóbico na constante de associação.

Em vista de validar a metodologia empregada, mas com base na comparação com dados reportados na literatura, foram realizados experimentos para determinar os parâmetros da interação entre a proteína BSA e a quercetina, pois a determinação da constante de ligação neste sistema vem sendo alvo de vários estudos^{58,59,60}. Os valores reportados na literatura e o calculado experimentalmente pelo presente protocolo estão listados na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores de constantes de dissociação para a interação entre quercetina e BSA proposta por outros autores e pelo presente trabalho

Condições Experimentais		K_D ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
Rawel et al. ^{58,60}	Tampão Heps $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,0	$3,9\cdot 10^{-6}$
	Tampão Tampão Heps $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6,0	$9,1\cdot 10^{-6}$
	Tampão Tampão Heps $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 5,0	$1,5\cdot 10^{-5}$
	Tampão Tampão Heps $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 5,0	$24\cdot 10^{-6}$
Dufour et al. ⁵⁹	Tampão fosfato $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,4; 100mM NaCl	$7,46\cdot 10^{-6}$
	pH 5,0	$1,16\cdot 10^{-6}$
Presente trabalho	Tampão Fosfato $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6,4 força iônica 0,2	$1,0\cdot 10^{-5}$
	Tampão Fosfato $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,0 força iônica 0,2	$1,5\cdot 10^{-5}$

Os valores obtidos no presente trabalho são próximos aos valores descritos na literatura e levando-se em consideração as diferenças entre as condições experimentais empregadas podemos considerar os resultados equivalentes suportando desta forma nossa abordagem metodológica.

Para avaliar o efeito global da interação entre a BLG e a vanilina utilizou-se a técnica de microcalorimetria (ITC) que permitiu constatar que a natureza da interação entre a vanilina e a BLG é de caráter exotérmico ($\Delta H < 0$), Figura 18. Podemos assim, escrever seguinte equilíbrio:

Figura 18 - Titulação microcalorimétrica de uma solução de $178,9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BLG com uma solução $49,56 \text{ mmol L}^{-1}$ de vanilina em tampão fosfato ($\text{pH} = 7,4$, $I = 0,32$ (NaCl)) em diferentes temperaturas.

A Figura 19 ilustra a variação da entalpia de associação da vanilina com a BLG em função da temperatura, onde pelo coeficiente angular da reta foi possível determinar o valor de $\Delta C_p = -244 \text{ cal}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$. O baixo valor calculado de ΔC_p nos permite inferir que o efeito global das interações hidrofóbicas neste sistema é considerado fraco e, portanto não se observa com o aumento da temperatura o deslocamento do equilíbrio no sentido da formação do complexo.

Figura 19 - Variação do ΔH em função da temperatura de titulação de uma solução de $178,9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BLG com uma solução $49,56 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de vanilina em tampão fosfato ($\text{pH} = 7,4$, $I = 0,32$ (NaCl)) para determinação experimental do valor de ΔC_p .

A Tabela 6 contém o sumário dos dados termodinâmicos obtidos para a interação entre a vanilina e a BLG obtidos por titulação microcalorimétrica.

Tabela 6 - Parâmetros termodinâmicos e K_A para titulação microcalorimétrica da solução de BLG de concentração $178,9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ com solução de vanilina $49,56 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

Parâmetro	11,6 °C	25,6 °C	35 °C
$K_A (\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	$(7,0\pm 1)\cdot 10^2$	$(5,6\pm 0,3)\cdot 10^2$	$(4,8\pm 0,3)\cdot 10^2$
$\Delta H (\text{cal}\cdot\text{mol}^{-1})$	$(-5,0\pm 6,0)\cdot 10^3$	$(-9,0\pm 5,0)\cdot 10^3$	$(-14,0\pm 9)\cdot 10^3$
$\Delta S (\text{cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1})$	-5	-17	-33
$\Delta H_{\text{Total}} (\text{cal}\cdot\text{mol de injetante}^{-1})$	-4873	-7088	-10753

Os dados apresentados na Tabela 6 referentes à entalpia de associação visivelmente possuem elevada incerteza. Neste contexto, uma importante fonte de incerteza na determinação experimental do valor de ΔH da interação entre vanilina e BLG está associada ao inerente processo de dissolução da vanilina na solução titulada Figura 20. Desta forma foram realizados experimentos para avaliar a magnitude dos parâmetros relativos ao efeito de dissolução de vanilina na solução

titulada, demonstrando que a dissolução da vanilina é um processo fortemente endotérmico (Figura 20). Este efeito pode ser explicado através dos resultados obtidos por Bogdan et al.⁶¹ que demonstraram através de experimentos de ressonância magnética nuclear a existência de auto-associação da vanilina em solução aquosa.

Figura 20 - Curva de dissociação da vanilina na concentração de 49 mmol·L⁻¹ em meio aquoso (tampão fosfato, pH = 7,4, I = 0,32 (NaCl) a temperatura de 25 °C).

Conforme leitura dos dados contidos na Figura 20, podemos assumir que a dissolução da vanilina no meio titulado tem caráter endotérmico em função da presença de moléculas agregadas quando em alta concentração, ao passo que em soluções mais diluídas o efeito endotérmico de dissolução é desprezível. O calor de diluição da vanilina em água pura, reportado por Noubigh et al.⁶² é de 6,5 kcal·mol⁻¹, valor este consideravelmente alto. A Tabela 7 apresenta os valores de K_d dos

agregados de vanilina e seus respectivos calores de dissociação em função do teor de vanilina em solução e da temperatura.

Tabela 7 - Valores de ΔH de diluição da vanilina e constante de dissociação a diferentes concentrações de vanilina em diferentes temperaturas

C_0 (mmol·L ⁻¹)	T (°C)	ΔH (cal·mol ⁻¹)	K_d (mmol)
3,08	25	2929	3,98
27,5	25	4810	9,61
49,6	15	6336	22,0
49,6	25	6028	17,3
49,6	35	6187	13,6

A espectroscopia de dicroísmo circular foi utilizada como uma técnica auxiliar para investigar transições estruturais na proteína quando da presença de vanilina. Como podemos notar na leitura do espectro de dicroísmo circular ilustrado na Figura 21, não há alterações com relação à estrutura secundária da BLG mesmo quando da presença de altos teores do ligante vanilina.

Figura 21 - Espectro de dicroísmo circular da BLG na concentração de $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e adição de 5-250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de vanilina, tampão fosfato, pH = 7,4, I = 0,32 (NaCl) a temperatura de 25°C .

A Tabela 8 resume os valores de K_A para a interação entre a vanilina e a BLG em função da técnica empregada para sua determinação em conjunto com os valores reportados na literatura. Em uma primeira vista, os valores parecem ser contraditórios, porém uma análise mais cuidadosa permite observar que os fenômenos espectroscópicos como os detectados pela espectroscopia de absorção eletrônica e emissão molecular demonstram convergência. No entanto, estes dados obtidos por métodos espectroscópicos diferem dos obtidos através de métodos de natureza termodinâmica (cromatografia de afinidade e microcalorimetria). Ao nosso ver, este fato se deve ao tipo de interação que cada técnica está mensurando, a microcalorimetria e a cromatografia de afinidade reportam interações não específicas na superfície da proteína e seus dados portanto refletem um processo

de interação global. Já os métodos espectrofotométricos fornecem informações a respeito de interações específicas relativas às imediações da sonda, triptofano, e não são sensíveis aos fenômenos que ocorrem na superfície da proteína.

Tabela 8 - Constantes de dissociação e associação entre vanilina e BLG em diferentes condições utilizando-se diferentes técnicas analíticas

Referência	Condições experimentais	K_A (L·mol ⁻¹)	K_D (mol·L ⁻¹)	Técnica
Reiners ⁶³	pH=7,2, cloreto de sódio, $\mu = 0,3$.	$3,2 \cdot 10^2$	$3,1 \cdot 10^{-3}$	cromatografia de afinidade
Mikheeva ⁶⁴	água, 0,2 molL ⁻¹ de NaCl.	$5,8 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^{-4}$	UV-Vis
	Água	$1,7 \cdot 10^4$	$5,9 \cdot 10^{-5}$	UV-Vis
Relkin ⁶⁵	água pH=6,0.	$8 \cdot 10^4$	$1,25 \cdot 10^{-5}$	Fluorimetria
Presente trabalho	tampão fosfato	$5 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^{-5}$	Fluorimetria
	pH=7,4, I = 0,32	$5,7 \cdot 10^2$	$1,76 \cdot 10^{-3}$	Microcalorimetria

4.2. Cinética de Redução do Radical DPPH•

O radical DPPH• ($E^0_{1/2} = 0,42$ vs. NHE) é um radical estável, possui reatividade similar a radicais peroxila, apresenta intensa banda de absorção eletrônica na região do visível ($\epsilon_{525} = 1,25 \cdot 10^4$), e quando reduzido apresenta banda de absorção na região do visível deslocada para o azul (DPPH₂, $\lambda = 310$ nm). Em função destas propriedades é comumente utilizado como modelo de radical peroxila (ROO•) em teste de capacidade e atividade antioxidante.

A estrutura molecular do radical DPPH• e seu espectro eletrônico de absorção estão apresentados na Figura 22.

Figura 22 - Espectro eletrônico de absorção e estrutura molecular do radical DPPH• realizados em meio de emulsão aquosa de Tween-20® com concentração hidrogeniônica de $10^{-2,0} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e concentração de DPPH• de $2,9\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

4.2.1. Experimentos de redução do radical DPPH• pela vanilina

Em um primeiro momento procurou-se determinar a estequiometria da reação entre o DPPH• e a vanilina. Para fins de comparação com dados reportados por Brand-Williams et al.⁶⁶ a estequiometria da reação entre vanilina e o radical DPPH• foi calculada a partir de titulação espectrofotométrica obtendo-se a proporção de 1:29 (DPPH• : vanilina), valor este ligeiramente inferior ao reportado por Brand-Williams et al.⁶⁶.

No intuito de mimetizar condições do trato gastrointestinal, os experimentos cinéticos envolvendo o composto fenólico vanilina e o radical DPPH• foram realizados em meio de emulsão aquosa de Tween-20® com concentração hidrogeniônica de $10^{-2,0} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Nestas condições, é esperada uma maior reatividade do radical DPPH• em função da protonação do nitrogênio N-5 e consequentemente menor delocalização eletrônica do elétron desemparelhado.

Figura 23 - Espectro eletrônico de absorção no intervalo de 300-800 nm da reação entre $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de vanilina com $2,9\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de DPPH• a $25\pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em meio de emulsão aquosa com concentração hidrogeniônica de $10^{-2,0} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Intervalo de aquisição de cada espectro foi de 5 minutos. Inseto: decaimento da banda em 525 nm da reação entre $6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de vanilina e $2,7\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ a $25\pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em meio de emulsão aquosa Tween-20® com concentração hidrogeniônica de $10^{-2,0} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Os experimentos cinéticos da reação entre DPPH• e a vanilina demonstraram que a velocidade da reação é considerada lenta, cerca de 12 horas para a completa redução do radical (Figura 23) mesmo quando o redutor está em excesso de 100 vezes. Em função da lenta reação entre a vanilina e o radical DPPH• e da reversibilidade em baixos teores de vanilina, selecionamos o método das velocidades iniciais para o tratamento cinético deste sistema⁶⁷. O método das velocidades iniciais permite o cálculo das constantes de velocidade, conhecendo-se as velocidades iniciais e variando-se a concentrações analíticas de um dos

reagentes, assim a reação é acompanhada até o consumo de um determinado reagente ou formação de um produto atinja no máximo 10%.^{67,68}

A Figura 24 ilustra um típico gráfico de absorbância *versus* tempo para os primeiros 10% de consumo do radical DPPH• utilizado para o cálculo da constante de velocidade observada pelo método das velocidades iniciais. As constantes de velocidade observada, k_{obs} , são obtidas pela razão entre o coeficiente angular do gráfico de absorbância *versus* tempo (Figura 24) e a concentração analítica inicial do radical DPPH•. A partir dos dados de k_{obs} em função da concentração analítica de vanilina obtém-se uma correlação linear, Figura 25, expressa pela equação $k_{obs} = k_1 + k_2[\text{vanilina}]$. Onde k_{obs} = constante de velocidade observada, k_1 = constante de velocidade do decaimento natural do radical DPPH• e k_2 é a constante de velocidade bimolecular para a redução do radical DPPH• pela vanilina e é obtida pelo coeficiente angular da reta.

Figura 24 - Absorbância em 525 nm em função do tempo para a reação de 14 mmol·L⁻¹ de vanilina e 3,0·10⁻⁵ mol·L⁻¹ de DPPH• a 25±0,1 °C em meio de emulsão aquosa Tween-20® com concentração hidrogeniônica de 10^{-2,0} mol·L⁻¹.

Após a determinação das velocidades em diferentes concentrações de vanilina, outro gráfico relacionando V_i/C_i versus [vanilina] foi construído. Este gráfico por sua vez fornece a informação relativa à constante de velocidade bimolecular da reação (k), através do ajuste linear cujo coeficiente angular é a constante de velocidade, Figura 25. Os experimentos envolvendo a redução do radical DPPH[•] pelo complexo proteína-vanilina (BSA e BLG) na concentração de proteína $2 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹, seguiram o mesmo protocolo supracitado.

Figura 25 - Relação entre velocidades iniciais e concentração de vanilina a $25 \pm 0,1$ °C em meio de emulsão aquosa de Tween-20[®] com concentração hidrogeniônica de $10^{-2,0}$ mol·L⁻¹.

A Tabela 9 contém as constantes de velocidade bimoleculares para a reação de redução do radical DPPH[•] pela vanilina e seus complexos com BSA e BLG em diferentes temperaturas.

Tabela 9 - Constantes de velocidade bimolecular ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) da reação entre a vanilina e seus complexos com o radical DPPH• a diferentes temperaturas em meio de emulsão aquosa Tween-20® com concentração hidrogeniônica de $10^{-2,0} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

Vanilina/Proteína	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
VANILINA	(0,84±0,01) ·10 ⁻¹	(0,98±0,02) ·10 ⁻¹	(1,42±0,04) ·10 ⁻¹	(1,68±0,02) ·10 ⁻¹	(2,24±0,07) ·10 ⁻¹	(2,2±0,2) ·10 ⁻¹
VANILINA / BSA*	(0,90±0,06) ·10 ⁻¹	(1,05±0,04) ·10 ⁻¹	(1,59±0,05) ·10 ⁻¹	(2,2±0,1) ·10 ⁻¹	(3,2±0,2) ·10 ⁻¹	(4,2±0,1) ·10 ⁻¹
VANILINA / BLG*	-	(0,9±0,05) ·10 ⁻¹	(1,01±0,01) ·10 ⁻¹	(1,9±0,2) ·10 ⁻¹	(3,1±0,1) ·10 ⁻¹	(3,6±0,1) ·10 ⁻¹

* Concentração de proteína constante ($2,0\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

A constante de velocidade bimolecular para redução do radical DPPH• pela vanilina em meio de emulsão aquosa de Tween-20® (pH ajustado para 2) à temperatura de $25\pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ é de $(1,42 \pm 0,04)\cdot 10^{-1} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, valor este superior ao obtido em meio homogêneo de etanol $(5,0 \pm 0,2)\cdot 10^{-2} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. Esta diferença entre os valores das constantes de velocidades pode estar relacionada ao parâmetro que determina a tendência de um solvente a formar ligação de hidrogênio com o soluto (β_2^{H}), reportados na literatura como 0,44 para o etanol e para a água 0,38 para água pura⁶⁹. Ou seja, o etanol possui maior tendência a formar ligações de hidrogênio com a vanilina quando comparado com a água, justificando desta maneira a menor reatividade da vanilina frente ao radical DPPH• em meio de etanol. Outro fato que contribui para esta diferença de reatividade é a concentração hidrogeniônica do meio reacional, enquanto que o meio de emulsão aquosa de Tween-20 com pH ajustado a 2 não permite a ionização do soluto (vanilina; $\text{pK}_a = 7,4$), o meio alcoólico de etanol permite, mesmo que parcialmente, a ionização do composto fenólico a fenoxilato e permitindo assim a rápida reação de transferência de elétrons entre o íon fenoxilato e o radical DPPH•.

A variação da entalpia de ativação ($\Delta H^\ddagger$) e entropia de ativação ($\Delta S^\ddagger$) foi calculada a partir da Equação 9 (equação de Eyring) e são reportadas na Tabela 10.

$$\ln\left(\frac{k_c}{T}\right) = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} \quad (9)$$

A Tabela 10 mostra os valores de energia relativos ao estado de transição na presença e ausência de $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ das proteínas BLG ou BSA.

Tabela 10 - Parâmetros de ativação para a reação de redução do radical DPPH[•] pela vanilina e seus complexos com BSA e BLG

Vanilina/Proteína	$\Delta H^\ddagger (\text{kJmol}^{-1})$	$\Delta S^\ddagger (\text{Jmol}^{-1} \text{K}^{-1})$ 25 °C
VANILINA	$34,0 \pm 0,3$	$-147,4 \pm 0,9$
VANILINA / BSA[*]	$46,2 \pm 0,1$	$-105,3 \pm 0,5$
VANILINA / BLG[*]	$51,0 \pm 0,6$	-90 ± 2

* Concentração de proteína constante ($2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

Através da análise dos dados apresentados na Tabela 10 observa-se que a contribuição da entropia para a barreira de energia livre da reação do radical DPPH[•] com a vanilina é superior a contribuição entálpica, isto é $-T\Delta S^\ddagger > \Delta H^\ddagger$ e a força motriz da reação é endergônica e endotérmica. Outro fato que podemos notar pela análise dos dados contidos na Tabela 10 é o não usual baixo valor do fator pré-exponencial calculado pela Equação 10

$$\Delta S^\ddagger = R \left[\ln A + \ln \left(\frac{h}{k_B T} \right) - 1 \right] \quad (10)$$

O valor do fator pré exponencial A calculado de $3,3 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ ($\Delta S^\ddagger = -117,4 \text{ Jmol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) é um valor consideravelmente baixo para o valor “normal” de uma reação de transferência de átomo de hidrogênio HAT ($\sim 10^8 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$). Este baixo valor de fator pré exponencial pode ter diversas origens, onde a explicação geralmente aceita para reações de HAT envolvendo heteroátomos O-H e [•]N está no fato que tal transferência ocorre após um pré-equilíbrio entre o complexo ligado por

hidrogênio e o doador ligado ao hidrogênio C-H e o acceptor de ligação de hidrogênio (HBA) $\cdot\text{N}$:

Em condições de largo excesso de ArOH, o primeiro passo segue uma cinética de primeira ordem e, se a escala de tempo for muito pequena em comparação à 2, i.e. $k_1[\text{OH}] + k_{-1} \gg k_2$, então o mesmo pode ser considerado no equilíbrio. Desta forma a constante de velocidade do processo global pode ser escrita como $k_{\text{obs}} = k_{\text{eq}1} k_2 / 1 + k_{\text{eq}1}[\text{OH}] \sim k_{\text{eq}1} k_b$ quando $[\text{OH}]$ é baixo. Assim, podemos calcular $\log (A_{\text{obs}}/\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}) \sim \log(A_1/\text{s}^{-1}) + \Delta S^\ddagger_1 / 2,303R$, e portanto, o valor observado do fator pré-exponencial será menor que o valor esperado de A_1 já que há perda de graus de liberdade ocasionada pela formação do complexo B ; $\Delta S^\ddagger < 0$. O mecanismo via HAT neste meio é ainda suportado pelos altos valores de $\Delta H^\ddagger$ e negativos valores de $\Delta S^\ddagger$ esperados para este mecanismo em contra ao mecanismo via ET/SPET, onde os valores esperados de $\Delta H^\ddagger$ são da ordem de ~ 10 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ e os valores de $\Delta S^\ddagger$ mais positivos.

Entretanto da complexação da vanilina com a BLG e BSA observamos algumas alterações, a primeira delas é com relação à constante de velocidade de $k = 1\cdot 10^{-1} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ para vanilina-BLG ante $1,42\cdot 10^{-1} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ para vanilina livre (Tabela 9).

Outra alteração nítida é com relação ao controle da reação que passa a ser de natureza entálpica, isto é - $T\Delta S^\ddagger < \Delta H^\ddagger$, além do valor do fator pré exponencial ao redor de $\sim 10^8 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$. Ainda, este aumento no valor do fator A de $\sim 10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ (vanilina livre) e $\sim 10^8 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ (vanilina-BLG) os quais implicam em uma maior reatividade da hidroxila fenólica, entretanto, isto não se reflete na constante de velocidade em função da alteração do controle reacional de entrópico para entálpico

e valores mais positivos de $\Delta S^\ddagger$ em conjunto com maiores valores de energia de ativação, E_a , de $36 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para a vanilina livre e contra $53,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para a vanilina-BLG. O aumento do fator A pela complexação do composto fenólico pela proteína pode estar relacionado ao fator da complexação promover e fortalecer interações de empilhamento $\pi - \pi$ que por sua vez favorecem reações de HAT/PCET ou então, a complexação pode interferir inibindo a formação de ligações de hidrogênio intramoleculares entre a hidroxila fenólica e o grupo orto $-\text{OCH}_3$ pelo comprometimento deste grupo orto- em interações de hidrogênio com os amino ácidos da cadeia lateral da proteína aumentando assim a reatividade da hidroxila fenólica. Observa-se também pela análise detalhada dos dados (Tabela 9 e 10) que a razão entre a constante de velocidade de redução do radical DPPH $^\bullet$ com a vanilina “livre” pela constante de redução com o complexo proteína-vanilina notadamente diminui com o aumento da temperatura. Este fato, em conjunto com o caráter exotérmico da complexação sugere uma interação antagônica na redução do radical DPPH $^\bullet$ e em parte pode justificar o aumento do custo entálpico e da organização do sistema na reação ocasionando uma menor constante de velocidade de reação de redução do radical DPPH $^\bullet$. Podemos então concluir que apesar de possuir caráter fraco, a complexação da vanilina por proteínas (BSA e BLG) diminui a atividade antioxidante do composto fenólico frente a radicais peroxila em meio aquoso ácido.

4.2.2. Experimentos de redução do radical DPPH $^\bullet$ pelo ácido vanílico

A estequiometria da reação entre ácido vanílico e DPPH $^\bullet$ em etanol foi determinada a partir de titulação espectrofotométrica obtendo-se o valor de 1:5 (DPPH $^\bullet$: ácido vanílico).

Como pode ser visualizado na Figura 26, a reação entre $6,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido vanílico e $2,5\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de DPPH• a temperatura de $25 \pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ se completou após 10 minutos de reação, tempo este muito inferior ao observado para a redução do radical pela vanilina.

Figura 26 - Variação da absorção no comprimento de onda de 525 nm com o tempo para a reação de $6,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido vanílico e $2,5\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de DPPH• a $25 \pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em meio de emulsão aquosa Tween-20® com concentração hidrogeniônica de $10^{-2,0} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

A constante de velocidade observada (k_{obs}) para redução do radical pelo ácido vanílico foi determinada utilizando-se o método de ajuste não linear ao gráfico da Figura 26 utilizando-se a Equação 11.

$$y = A_0 e^{-k_{\text{obs}}x} + C \quad (11)$$

Onde A_0 é a taxa de auto-redução do radical DPPH• e C é a absorbância no infinito para a reação.

A constante de velocidade bimolecular foi, portanto calculada através do coeficiente angular da reta do gráfico de k_{obs} versus [ácido vanílico], (Figura 27).

Figura 27 - Gráfico de k_{obs} versus [ácido vanílico] reação entre ácido vanílico e DPPH• a $25 \pm 0,1$ °C em meio de emulsão aquosa Tween-20® com concentração hidrogeniônica de $10^{-2,0}$ mol·L⁻¹.

A Tabela 11 contém as constantes de velocidade bimoleculares para a reação de redução do radical DPPH• pelo ácido vanílico e seus complexos com BSA e BLG, calculadas para diferentes temperaturas.

Tabela 11 - Constantes de velocidade bimolecular (L·mol⁻¹·s⁻¹) da reação entre o ácido vanílico e seus complexos com o radical DPPH• a diferentes temperaturas em meio de emulsão aquosa de Tween-20® com concentração hidrogeniônica de $10^{-2,0}$ mol·L⁻¹

Ácido Vanílico / Proteína	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
Ácido Vanílico	$(12,3 \pm 0,5) \cdot 10^{-1}$	$(15,9 \pm 0,3) \cdot 10^{-1}$	$(17,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-1}$	$(20,2 \pm 0,4) \cdot 10^{-1}$	$(22,6 \pm 0,3) \cdot 10^{-1}$	ND
Ácido Vanílico / BSA*	ND	$(15,9 \pm 0,6) \cdot 10^{-1}$	$(17,4 \pm 0,8) \cdot 10^{-1}$	$(18,8 \pm 0,6) \cdot 10^{-1}$	$(21 \pm 1,0) \cdot 10^{-1}$	$(22 \pm 1,0) \cdot 10^{-1}$
Ácido Vanílico / BLG*	ND	$(11,8 \pm 0,6) \cdot 10^{-1}$	$(14,5 \pm 0,6) \cdot 10^{-1}$	$(20,2 \pm 0,9) \cdot 10^{-1}$	$(26 \pm 1,0) \cdot 10^{-1}$	$(23 \pm 1,0) \cdot 10^{-1}$

* Concentração de proteína constante ($2,0 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹)

É patente a diferença de velocidade de reação de redução do radical comparando-se a vanilina e o ácido vanílico, onde esta diferença não poder ser

simplesmente explicada pelos valores de entalpia de dissociação de ligação do hidrogênio fenólico (BDE), 86,5 e 84,5 kJ para vanilina e ácido vanílico respectivamente ^{70,71}. Levando-se em consideração o mecanismo de transferência de átomo de hidrogênio, esta diferença é pouco pronunciável e não poderia ser atribuída a esta a maior reatividade do ácido vanílico comparado à vanilina. A diferença de reatividade do ácido vanílico poderia então estar relacionada com a estabilização do radical proporcionada pela presença do grupo carboxila em posição *p*- à hidroxila fenólica como ilustrado na Figura 28.

Figura 28 - Estruturas representando o equilíbrio entre as formas do ânion radical estável formado a partir do ácido vanílico.

A variação da entalpia de ativação ($\Delta H^\ddagger$) e entropia de ativação ($\Delta S^\ddagger$) foi calculada utilizando-se a equação de Eyring, Equação 9, e são reportadas na Tabela 12.

Tabela 12 - Parâmetros termodinâmicos para o estado de transição para reações entre ácido vanílico e seus complexos com proteínas e o radical DPPH[•]

Ácido Vanílico / Proteína	$\Delta H^\ddagger$ (kJ·mol ⁻¹)	$\Delta S^\ddagger$ (Jmol ⁻¹ ·K ⁻¹) 25 °C
Ácido Vanílico	19,6 ± 0,2	-174 ± 0,5
Ácido Vanílico / BSA ⁻	10,2 ± 0,03	-206,0 ± 0,1
Ácido Vanílico / BLG ⁻	37,6 ± 0,3	-116 ± 1

* Concentração de proteína constante (2,0·10⁻⁴ mol·L⁻¹)

Os valores de entalpia de transição sugerem que a reação é controlada por entropia assim como no caso da vanilina, porém os valores de $\Delta H^\ddagger$ são menores do que os relatados para a vanilina. O valor de $\Delta S^\ddagger$ quando comparado aos valores encontrados para a vanilina demonstram que o estado de transição possui maior

organização. O valor de $\Delta G^\ddagger$ menos positivo para a reação entre ácido vanílico e DPPH• é menor do que o valor de $\Delta G^\ddagger$ para a vanilina, comprovando a maior reatividade do ácido vanílico.

4.3. Cinética de Redução da Espécie Ferro – Heme Hipervalente

4.3.1. Reações envolvendo vanilina.

A reação de oxidação do grupo heme do pigmento metmioglobina foi obtida com a adição de H_2O_2 em excesso e interrompida com a adição da proteína catalase. O espectro com a banda característica em 580 nm referente à espécie Fe(IV) foi observado espectrofotometricamente, permitindo a identificação das bandas características de cada estado de oxidação do ferro presente no grupo heme da mioglobina, (Figura 29).

Figura 29 - Espectro eletrônico de absorção das espécies MbFe(III) na concentração de $1,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (linha preta) e sua forma oxidada MbFe(IV)=O (linha vermelha) na concentração de $1,16 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, em tampão fosfato fosfato $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $I = 0,32$ (NaCl) hidrogeniônica de $10^{-7,4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

A Figura 30 mostra a reação de redução da MbFe(IV)=O pela vanilina, evidenciada pelo decréscimo da banda em 580 nm, atribuída a ferrilmioglobina, e o aumento da banda em 500 nm referente a banda característica da metMbFe(III).

Figura 30 - Espectro eletrônico de diferença de absorbância obtido para a reação da espécie MbFe(IV)=O na concentração de $6,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e vanilina na concentração de $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em tampão fosfato $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $I = 0,32$ (NaCl) concentração hidrogeniônica de $10^{-7,4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, intervalo de tempo de 10 s entre cada aquisição.

A Figura 30 ilustra o acompanhamento temporal do decaimento da espécie MbFe(IV)=O (concentração analítica de $5,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), monitorado em 580 nm, quando da reação com $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de vanilina. Pela leitura do gráfico da Figura 30 observa-se a rápida redução da ferrilmioglobina a metmioglobina ($t_{1/2} = 15,9 \text{ s}$) quando da reação com excesso de 23 equivalentes de vanilina. Pode-se notar que a velocidade de redução da ferrilmioglobina pela vanilina é superior a redução do radical DPPH $^{\bullet}$ pelo mesmo composto fenólico, fato este, esperado em função do maior potencial de redução da espécie de ferro hipervalente em comparação ao potencial de redução do radical DPPH $^{\bullet}$ uma vez que a força eletromotriz da reação é

a transferência de HAT/PCET e ET para o radical DPPH• e ferrilmioglobina respectivamente.

Figura 31 - Variação da absorção no comprimento de onda de 580 nm em função da evolução temporal da reação de uma solução contendo $3,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de MbFe(IV)=O e $0,7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de vanilina em tampão fosfato $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $I = 0,32$ (NaCl) com concentração hidrogeniônica de $10^{-7,4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (linha preta) em comparação ao decaimento natural da ferrilmioglobina ($6,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) (linha vermelha).

Pelo monitoramento do decaimento da banda de absorção em 580 nm da espécie ferrilmioglobina, MbFe(IV)=O, a qual aumenta linearmente com o incremento da concentração analítica do redutor, Figura 31, as constantes observadas de reação foram obtidas através da Equação 11.

As constantes específicas de reação entre vanilina e ferrilmioglobina foram então determinadas pelo gráfico de k_{obs} versus [redutor] segundo a equação 12:

$$k_{\text{obs}} = k_1 + k_2[\text{redutor}] \quad (12)$$

onde, k_1 é a constante de velocidade do decaimento natural (autoredução) da espécie ferrilmioglobina e k_2 a constante de velocidade específica da reação.

Figura 32 - Gráfico de k_{obs} versus [vanilina] da reação entre diferentes concentrações de vanilina e uma solução contendo $3,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MbFe(IV)=O a $25 \pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em tampão fosfato $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $I = 0,32$ (NaCl) com concentração hidrogeniônica de $10^{-7,4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

A Tabela 13 contém as constantes de velocidade bimoleculares para a reação de redução da ferrilmioglobina pela vanilina e seus complexos com BSA e BLG, obtidas em diferentes temperaturas.

Tabela 13 - Constantes de velocidade bimolecular ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) da reação entre a vanilina e seus complexos com MbFe(IV)=O a diferentes temperaturas em tampão fosfato $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $I = 0,32$ (NaCl) e concentração hidrogeniônica de $10^{-7,4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Vanilina/Proteína	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
VANILINA	23±2	32,9±0,9	57±1	81±1	119±7	ND
VANILINA / BSA*	ND	38±2	51±2	77±6	107±3	125±4
VANILINA / BLG*	ND	30,8±0,6	48±2	85±6	123±2	143±7

* Concentração de proteína constante ($2,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

Analisando-se os dados reportados na Tabela 13 e comparando-se com as constantes de velocidade específica reportadas na literatura para desativação da ferrilmioglobina por compostos fenólicos, à temperatura de 298 K, é patente que a vanilina livre apresenta reatividade comparável a observada para compostos

fenólicos com padrão de substituição orto-hidroximetoxi tal como a flavonona hesperitina ($k_2 = 42 \pm 1 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Entretanto, comparando-se a reatividade da vanilina com compostos fenólicos que apresentam padrão de substituição orto-dihidroxi, por exemplo, os flavan-3-ol catequina ($k_2 = 119 \pm 10 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) e epicatequina ($k_2 = 93 \pm 4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), a desativação da espécie de ferro hipervalente MbFe(IV)=O é uma ordem de grandeza inferior. A reatividade da vanilina é por sua vez superior à observada para compostos fenólicos ausentes de substituição orto-hidroximetoxi e orto-dihidroxi como a flavonona narigenina ($k_2 = 14,5 \pm 0,5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Este padrão de reatividade observado está em acordo com o esperado uma vez que a substituição em orto-dihidroxi ou orto-hidroximetoxi no anel aromático afeta as propriedades de ionização da hidroxila fenólica através de ligações de hidrogênio intramoleculares facilitando desta forma a transferência de elétrons dos compostos fenólico para o centro metálico⁷².

A análise detalhada dos dados (Tabela 8 e 9) revela que a razão entre a constante de velocidade de redução da espécie de ferro-heme hipervalente com a vanilina “livre” pela constante de redução com o complexo proteína-vanilina notadamente diminui com o aumento da temperatura e sugere da mesma maneira que o observado para com o radical DPPH• que a complexação da vanilina pela proteína têm efeito antagônico reduzindo a velocidade de reação, ou seja, a vanilina e a proteína livre são melhores antioxidantes do que quando em conjunto.

A variação da entalpia de ativação ($\Delta H^\ddagger$) e entropia de ativação ($\Delta S^\ddagger$) foi obtida utilizando-se a equação de Eyring, Equação 9 e os dados estão reportados na Tabela 14.

Tabela 14 - Parâmetros termodinâmicos para o estado de transição para reações entre vanilina e seus complexos com proteínas e a espécie reativa MbFe(IV)=O

Vanilina/Proteína	$\Delta H^\ddagger$ (kJmol ⁻¹)	$\Delta S^\ddagger$ (Jmol ⁻¹ K ⁻¹) 25°C
VANILINA	58,8 ± 0,3	-14 ± 1
VANILINA / BSA [*]	45,5 ± 0,3	-60 ± 1
VANILINA / BLG [*]	68,6 ± 0,4	17 ± 1

* Concentração de proteína constante (2,0·10⁻⁵ mol·L⁻¹).

Os baixos valores de entalpia de ativação ($\Delta H^\ddagger$) e negativos valores de entropia de ativação ($\Delta S^\ddagger$) reportados na literatura para a redução da espécie MbFe(IV)=O pelo radical íon superóxido ($\Delta H^\ddagger = 9,6 \text{ kJmol}^{-1}$; $\Delta S^\ddagger = -105 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$) apontam para um mecanismo de transferência de elétrons de esfera interna. Contrariamente, para compostos fenólicos e para a vanilina livre (Tabela 14) observamos valores de entalpia de ativação elevados e valores de entropia de ativação mais positivos indicando que o processo de transferência de elétrons se dá pelo encontro das espécies e por um processo de esfera externa⁷² e neste ultimo caso a reação é claramente controlada por entalpia em contraposição ao processo de redução pelo íon superóxido onde a reação passa a ter controle entrópico. Desta forma, podemos dizer que os valores de entalpia de ativação ($\Delta H^\ddagger$) e entropia de ativação ($\Delta S^\ddagger$) para a vanilina livre estão de acordo com um processo de redução por esfera externa do pigmento MbFe(IV)=O, isto é, a redução ocorre através de transferência de elétrons a longa distancia possivelmente mediado por um resíduo Tyr ou Trp. Ainda, pelos dados da Tabela 13 e 14, observa-se a 25 °C constantes de velocidade equivalentes para a vanilina livre e pelo complexo vanilina/BLG e um custo energético maior para a redução mediada pelo complexo vanilina/BSA porém em compensação observa-se perda de organização no estado de transição sugerindo menor hidratação e uma transferência de elétrons a longa distância por esfera externa através de um complexo onde ambas as proteínas estão associadas.

4.3.2. Reações envolvendo ácido vanílico.

A Figura 33 ilustra a evolução temporal da reação de redução da MbFe(IV)=O pelo ácido vanílico evidenciada pelo decréscimo da banda de absorção eletrônica do pigmento hipervalente em 580 nm e o aumento da banda em 500 nm referente a banda característica de ferro (III).

Figura 33 - Espectro eletrônico de diferença de absorbância obtido para a reação da espécie MbFe(IV)=O na concentração de $6,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e ácido vanílico na concentração de $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em tampão fosfato $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $I = 0,32$ (NaCl) concentração hidrogeniônica de $10^{-7,4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, intervalo de tempo de 10 s entre cada aquisição.

A Figura 34 ilustra a curva cinética de decaimento da banda de absorção centrada em 580 nm da espécie MbFe(IV)=O ($7,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) quando da reação com $8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de ácido vanílico em meio aquoso de tampão fosfato pH 7,4 onde observa-se um decaimento de primeira ordem do qual através de regressão não linear e ajuste da Equação 11 os valores de k_{obs} , em condições de pseudo-primeira ordem, foram obtidos para o cálculo da constante de velocidade específica da reação a partir da Figura 35.

Figura 34. Variação da absorção no comprimento de onda de 580 nm em função da evolução temporal da reação de uma solução contendo MbFe(IV)=O na concentração de $7,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e ácido vanílico na concentração de $8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em tampão fosfato $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $I = 0,32$ (NaCl) com concentração hidrogeniônica de $10^{-7,4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em comparação ao decaimento natural da ferrimioglobina ($6,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) (linha vermelha).

As constantes k_{obs} foram determinadas através da Equação 10 e as constantes de velocidade da reação entre o ácido vanílico e ferrimioglobina foram determinadas através do coeficiente angular da reta de ajuste linear ao gráfico da Figura 35.

Figura 35 - Gráfico de k_{obs} versus [ácido vanílico] reação entre ácido vanílico em diferentes concentrações e uma solução de MbFe(IV)=O na concentração de $7,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ a $25 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$ em tampão fosfato $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $I = 0,32$ (NaCl) concentração hidrogeniônica de $10^{-7,4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

A Tabela 15 apresenta as constantes de velocidade bimoleculares para a reação de redução da ferrilmioglobina pelo ácido vanílico e seus complexos com BSA e BLG obtidas em diferentes temperaturas.

Tabela 15. Constantes de velocidade bimolecular ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) da reação entre o ácido vanílico e seus complexos com MbFe(IV)=O a diferentes temperaturas em tampão fosfato $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $I = 0,32$ (NaCl) com concentração hidrogeniônica de $10^{-7,4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Ácido Vanílico / Proteína	pH	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
Ácido Vanílico	7,4	8±1	12±1	15±1	19,5±0,5	27,7±0,8	ND
Ácido Vanílico / BSA*	7,4	ND	13±1	14,9±0,6	18±1	26±1	34,5±0,7
Acido Vanílico / BLG*	7,4	ND	8,3±0,4	14±1	18,1±0,9	24±1	37±2

* Concentração de proteína constante ($2,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

A constante de velocidade específica para a redução da espécie ferrilmioglobina pelo ácido vanílico é inferior a esperada, visto que seu valor de $15 \pm 1 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ é menor ao observado para a molécula análoga vanilina ($57 \pm 1 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

$^1 \cdot s^{-1}$), uma vez que por apresentar padrão de substituição orto-hidroximetoxi e para-carboxilato favorece a deprotonação do radical cátion formado levando a formação de estável anion radical e maior delocalização do orbital SOMO, Figura 28. Este efeito contrário pode ser melhor visualizado analisando-se a Tabela 15, onde pode-se notar que à temperatura de 25 °C a reação da ferrilmioglobina com ácido vanílico é quase cinco vezes menor do que a reação com vanilina. Este efeito pode ser explicado levando-se em consideração que a concentração hidrogeniônica utilizada no experimento ($10^{-7,4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) faz com que as cargas total da proteína ($pI = 7,2$) e do ácido vanílico ($pK_a = 4,08$) sejam ambas negativas e desta forma um efeito de repulsão coulombico. Ao analisar a Tabela 15 fica patente que a complexação do ácido vanílico pelas proteínas BLG/BSA não influencia sua atividade antioxidante. Porém, esta afirmação é apenas especulativa, pois devido à inviabilidade de determinar a constante de associação do ácido vanílico às proteínas através da espectroscopia de emissão molecular não podemos afirmar este efeito ou se a constante de associação é muito fraca.

Os valores de entalpia e entropia de ativação para a redução da espécie ferrilmioglobina pelo ácido vanílico e seu complexo com BSA e BLG são apresentados na Tabela 16. Nota-se que da mesma forma que o observado para a reação com a vanilina, a reação apresenta controle entálpico, entretanto, para a desativação da ferrilmioglobina pelo ácido vanílico, os valores de entalpia de ativação são menores aos obtidos para a vanilina. No entanto, as constantes de velocidade de reação são também inferiores às obtidas para a vanilina apesar da menor barreira energética em função da reação com o ácido vanílico apresentar entropia de ativação com valores bastante negativos em comparação a vanilina o que implica em uma maior organização, solvatação, no estado de transição.

Tabela 16 - Parâmetros termodinâmicos para o estado de transição para reações entre ácido vanílico e seus complexos com proteínas e a espécie reativa MbFe(IV)=O

Ácido Vanílico / proteína	$\Delta H^\ddagger$ (kJmol ⁻¹)	$\Delta S^\ddagger$ (Jmol ⁻¹ K ⁻¹) 25 °C
Ácido Vanílico	41,8 ± 0,2	-82,4 ± 0,7
Ácido Vanílico / BSA ⁻	37,7 ± 0,3	-96 ± 1,0
Ácido Vanílico / BLG ⁻	53,5 ± 0,2	-44 ± 1,0

* Concentração de proteína constante (2,0·10⁻⁵ mol·L⁻¹).

5. Conclusões

Os dados reunidos no presente trabalho nos permitem inferir sobre alguns aspectos da propriedade antioxidante da vanilina e do ácido vanílico “livres” ou na presença de proteínas do soro do leite (BLG e BSA) em condições simulando-se o trato gastrointestinal. A primeira conclusão que fica patente é com respeito à atividade e capacidade antioxidante da vanilina frente ao radical DPPH[•], modelo de radical peroxila, onde observamos que a vanilina não pode ser considerada um bom antioxidante para reações via HAT/PCET em solvente apto a fazer ligações de hidrogênio e condições ácidas, fato este repleto de controvérsias na literatura. O mesmo não ocorre com o análogo ácido vanílico que em função da substituição do grupo aldeído na posição para- à hidroxila fenólica por um grupo carboxilato promove uma maior reatividade em função de favorecer a formação do radical anion e maior estabilização do radical por delocalização eletrônica. A segunda conclusão é com respeito à associação destes compostos fenólicos com proteínas globulares do soro do leite, onde determinamos que tal interação ocorre tanto na cavidade hidrofóbica quanto na superfície da proteína em intensidades diferentes. A interação no cálice hidrofóbico é considerada mediana e específica e de característica exotérmica, enquanto que a interação na superfície é considerada fraca e não específica. Os dados cinéticos para reação de redução do radical DPPH[•] pela vanilina e pelo ácido vanílico na presença e ausência de proteínas (BLG e BSA)

sugerem um efeito antagônico da interação na atividade antioxidante frente a radicais em meio biológico e alimentos e este fato deve ser considerado e a investigação estendida a outros antioxidantes de baixa massa molecular. Com respeito à desativação da espécie de ferro hipervalente, ferrilmioglobina, observa-se que a reatividade da vanilina é comparável a de compostos fenólicos com padrão de substituição orto-hidroximetoxi e que o mecanismo ocorre via transferência de elétrons de esfera externa. Para o ácido vanílico, apesar de esperar uma maior reatividade, observamos que o mesmo reage com constante de velocidade específica inferior a vanilina em função de ambas as molécula de ácido vanílico e ferrilmioglobina apresentarem carga negativa o que por repulsão dificultaria a reatividade via transferência de elétrons por esfera externa. Ainda, os valores de entalpia e entropia de ativação para a reação da espécie ferrilmioglobina com o ácido vanílico sugerem uma possível alteração no mecanismo de reação. Por fim, podemos concluir que a associação da vanilina com as proteínas BSA e BLG diminui a reatividade na desativação da espécie de ferro hipervalente, porém, não impedem que a transferência de elétrons a longa distância ocorre entre a vanilina complexada pela proteína e a espécie de ferro(IV) hipervalente localizada no bolsão hidrofóbico da mioglobina.

6. Referências Bibliográficas

1. STEPHANIE, E. C.; WALTER, C. W. The 2005 food guide pyramid: an opportunity lost? **Nature Reviews Cardiology**, v. 4, p. 610-620, 2007.
2. Walter, C. W. Diet and health: what should we eat? **Science**, v. 264, p. 532-537, 1994.
3. AMES, B. C.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 7915 -7922, 1993.
4. TYROVOLAS, S.; PANAGIOTAKOS, D. B. The role of Mediterranean type of diet on the development of cancer and cardiovascular disease, in the elderly: a systematic review. **Maturitas**, v. 65, p. 122–130, 2010.
5. NICHENAMETLA, S. N.; TARUSCIO, T. G.; BARNEY, D. L.; EXON, J. H. A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in Cancer. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, p. 161-183, 2006.
6. GAÑAN, M.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, A. J.; CARRASCOSA, A. V. Antimicrobial activity of phenolic compounds of wine against *Campylobacter jejuni*. **Food Control**, v. 20, p. 739-742, 2009.
7. MARQUES, F. Z.; MARKUS, A.; MORRIS, B. J. Resveratrol: cellular actions of a potent natural chemical that confers a diversity of health benefits. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, p. 2125–2128, 2009.
8. RAMASSAMY, C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. **European Journal of Pharmacology**, v. 545, p. 51-64, 2006.
9. HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 205-215, 2006.
10. ARTS, I. C. W.; HOLLMAN, P. C. H. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 317s-325s, 2005.
11. VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. **Phenolic compound biochemistry**. Dordrecht: Springer, 2006. 271 p.
12. O'CONNELL, J. E.; FOX, P. E. Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 103-120, 2001.

-
- 13.MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, C. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727–747, 2004.
- 14.SCALBERT,A.; MORAND, C.; MANACH,C.; RÉMÉSY, C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. v. 56, p. 276-282, 2002.
- 15.PAGANGA, G.; RICE-EVANS, C. A. The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. **FEBS Letters**, v. 401, p. 78-82, 1997.
- 16.SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **The Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2073S-2085S, 2000.
- 17.HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free radicals in biology and medicine**, New York: Oxford University Press, 2007. 704 p.
18. KADIISKA, M. B.; BURKITT, M. J.; XIANG, Q. I.; MASON, R. P. Iron supplementation generates hydroxyl radical in vivo. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 96, p. 1653-1657, 1995.
- 19.LONG, L. H.; HALLIWELL, B. Coffee drinking increases levels of urinary hydrogen peroxide detected in healthy human volunteers. **Free Radical Research**, v. 32, p. 463-467, 2000.
- 20.AHMAD, S. **Oxidative stress and oxidant defenses in biology**. New York: Chapman & Hall, 1995. 455 p.
- 21.SHARMA, R. Market trends and opportunities for functional dairy beverages. **Australian Journal Dairy Technology**, v. 60, p. 196-199, 2005.
- 22.SERAFINI, M.; BUGIANESI, R.; MAIANI, G.; VALTUENA, S.; SANTIS, S.; CROZIER, A. Plasma antioxidants from chocolate. **Nature**, v. 424, p. 1013, 2003.
- 23.RAO, S.R.; RAVISHANKAR, G.A. Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 209-304, 2000.
- 24.BERGER, R. G. **Flavours and fragrances chemistry**: bioprocessing and sustainability. New York: Springer, 2007. 646 p.
- 25.FENNEMA, O. R. **Food chemistry**, 3.ed. New York: Marcel Dekker,1996. 1590 p.
- 26.FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. London: Thomson Science, 1998. 478 p.
- 27.HAUG, I. J.; SKAR, H. M.; VEGARUD, G. E.; LANGSRUD, T.; DRAGET, K. I. Electrostatic effects on b-lactoglobulin transitions during heat denaturation as studied by differential scanning calorimetry. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2287-2293, 2009.

-
- 28.KONTOPIDIS, G.; HOLT,C.; SAWYER L. Invited review: β -lactoglobulin: binding properties, structure, and function. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 785-796, 2004.
- 29.QIN, B. Y.; BEWLEY, M. C.; CREAMER, L. K.; BAKER, E. N.; JAMESON, G. B. Functional implications of structural differences between variants A and B of bovine beta-lactoglobulin. **Protein Science**, v. 8, p. 75-83, 1999.
- 30.UHRÍNOVÁ, S.; SMITH, M. H.; JAMESON, G. B.; UHRÍN, D.; SAWYER, L.; BARLOW, P. N. Structural changes accompanying pH-induced dissociation of the β -lactoglobulin dimer. **Biochemistry**, v. 39, p. 3565-3574, 2000.
- 31.SAKURAI, K.; GOTO, Y. Dynamics an mechanism of the tanford transition of β -Lactoglobulin studied using heteronuclear NMR spectroscopy. **Journal of Molecular Biology**, v. 356, p. 483-496, 2005.
- 32.PETERS, T. **All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications**. San Diego: Academic Press, 1996. 432 p.
- 33.SUGIO, S.; KASHIMA, A.; MOCHIZUKI, S.; NODA, M.; KOBAYASHI, K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. **Protein Engineering**, v. 12, p. 439-446, 1999.
- 34.CHAO, A.; THUN, M. J.; CONNELL, C. J.; MCCULLOUGH, M. L.; JACOBS, E. J.; FLANDERS, W. D.; RODRIGUEZ, C.; SINHA, R.; CALLE, E. E. Meat consumption and risk of colorectal cancer. **Journal of American Medical Association**, v. 293, p. 172-182, 2005.
- 35.HALLIWELL, B.; ZHAO, K.; WHITEMAN, M. The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? **Free Radical Research**, v. 33, p. 819-830, 2000.
- 36.EVANS, P.J.; CECCHINI, R.; HALLIWELL, B. Oxidative damage to lipids and [alpha]1-antiproteinase by phenylbutazone in the presence of haem proteins: protection by ascorbic acid. **Biochemical Pharmacology**, v. 44, p. 981-984, 1992.
- 37.BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food chemistry**. 4.ed. Berlin: Springer-Verlag, 2009. 1070 p.
- 38.STRAYER, L. **Biochemistry**. 4. ed. New York: W. H. Freeman, 1995. 1064 p.
- 39.LIN,J.; MERRYWEATHER, J; VITELLO, L. B.,ERMAN, J. E. Metmyoglobin/azide: The effect of heme-linked ionizations on the rate of complex formation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 362, p. 148-158, 1999.
- 40.HUNTER, C. L.; MAURUS, R.; MAUK, M. R.; LEE, H.; RAVEN, E. L.; TONG, H.; NGUYEN, N.; SMITH, M.; BRAYER, G. D.; MAUK, A. G. Introduction and characterization of a functionally linked metal ion binding site at the exposed heme

edge of myoglobin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 3647-3652, 2003.

41.DUNFORD, H. B. **Heme peroxidases**. New York: John Wiley, 1999. 507 p.

42.EVERSE, J. The structure of heme proteins compounds I and II: some misconceptions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, p. 1338-1346, 1998.

43.KOPPENOL, W. H.; LEIBMAN, J.F. The oxidizing nature of the hydroxyl radical. A comparison with the ferryl ion (FeO^{2+}). **Journal of Physical Chemistry**, v. 88, p. 99-101, 1984.

44.CALSEN, C.U.; KROGEN-OHLSSEN, MV; BELLIO, R; SKIBSTED, LH. Protein binding in deactivation of ferrylmyoglobin by chlorogenate and ascorbate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 204, 2000.

45.KROGEN-OHLSSEN, MV; SKIBSTED, LH. Kinetics and mechanism of reduction of ferrylmyoglobin by ascorbate and d-isoascorbate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 668, 1997.

46.CALSEN, C. U.; SKOVGAARD, I.M.; SKIBSTED, L.H. Pseudoperoxidase activity of myoglobin: kinetics and mechanism of the peroxidase cycle of myoglobin with H_2O_2 and 2,2-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) as substrates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5815, 2003.

47.CARLSEN, C. U.; MØLLER, J.K.S.; SKIBSTED, L.H. Heme-iron in lipid oxidation. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 249, p. 485-498, 2005.

48.GILL, C. G.; HIPPEL, P. H. Calculation of protein extinction coefficients from aminoacid sequence data. **Analytical Biochemistry**, v. 182, p. 319-326, 1989.

49.Edelhoch, H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. **Biochemistry**, v. 6, p. 1948 - 1954, 1967.

50.Wang, Z.; Tan, X.; Chen, W.; Song, Z. Study of the binding behavior of lysozyme with cephalosporin analogues by fluorescence spectroscopy. **Journal of Fluorescence**, v. 19, p. 801-808, 2009.

51.DING, F.; LIU, W.; LIU, F.; LI, Z. Y.; SUN,Y. A study of the interaction between malachite green and lysosyme by steady-state fluorescence. **Journal Fluorescence**, v. 19, p. 783-791, 2009.

52.WEERT, M. Fluorescence quenching to study protein-ligand binding: common errors. **Journal of Fluorescence**, v. 19, short communication, 2009.

53. BUSTI, P.; GATTI, C.A.; DELORENZI, N.J. Some aspects of β -lactoglobulin structural properties in solution studied by fluorescence quenching. **Journal of Biological Macromolecules**. v. 23, p. 143-148, 1998.

-
- 54.LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. New York: Springer, 1999. p. 277-297
- 55.EPPS, D. E.; RAUB, T. J.; CAIOLFA, V.; CHIARI, A.; ZAMAI, M. Determination of the affinity of drugs toward serum albumin by measurement of the quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence of the protein. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, p. 41-48, 1999.
- 56.PAZOLO, G.; RODRIGUEZ, F.; FARRUGGIA, B.; PICÓ, G.; DELORENZI, N. Heat treatment of β -lactoglobulin: structural changes studied by partitioning and fluorescence. **Journal of Agricultural and Food Science**, v. 48, p. 3817-3822, 2000.
- 57.NOUBIGH, A.; MGAIDI, A.; ABDERRABBA, M.; PROVOST, E.; FURST, W. Effect of salts on the solubility of phenolic compounds: experimental measurements and modelling. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 783-788, 2007.
- 58.RAWEL, H. M.; FREY, S. K.; MEIDTNER, K.; KROLL, J.; SCHWEIGERT, F. J. Determining the binding affinities of phenolic compounds to proteins by quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 50, p. 705-713, 2006.
- 59.DUFOUR, C.; OLIVER, D. Flavonoid-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1721, p. 164-173, 2005.
- 60.RAWEL, H. M.; MEIDTNER, K.; JÜRGEN, K. Binding of selected phenolic compounds to proteins. **Journal of Agricultural and Food Science**, v. 53, p. 4228-4235, 2005.
- 61.BOGDAN, M.; FLOARE, C. G.; PÎRNĂU, A. ^1H NMR investigation of self-association of vanillin in aqueous solution, **Journal of Physics: Conference Series**, v. 182, p. 1-5, 2009.
- 62.NOUBIGH, A.; CHERIF, M.; PROVOST, E.; ABDERRABBA, M. Solubility of gallic acid, vanillin, syringic Acid, and Protocatechuic acid in aqueous sulfate solutions from (293.15 to 318.15) K. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 53, p. 1675-1678, 2008.
- 63.REINERS, J.; NICKLAUS, S.; GUICHARD, E. Interactions between β -lactoglobulin and flavour compounds of different chemical classes. Impact of the protein on the odour perception of vanillin and eugenol. **Lait**, v. 80, p. 347-360, 2000.
- 64.MIKHEEVA, L. M.; GRINBERG, N. V.; TOLSTOGUZOV, V. B. Effect of thermal denaturation on vanillin binding to some food proteins. **Nahrung**, v. 42, p. 185-186, 1998.

-
- 65.RELKIN, P.; MOLLE, D.; MARIN, I. Non-covalent binding of benzaldehyde to b-lactoglobulin: characterisation by spectrofluorimetry and electrospray ionisation mass-spectrometry. **Journal of Dairy Research**, v. 61, p. 151-155, 2001.
- 66.BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of Free radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- 67.WILKINS, R. G. **The study of kinetics and mechanism of reactions of transition metal complexes**. Boston: Allyn and Bacon, 1974. 465 p.
- 68.HALL, K.J.; QUICKENDEN, T.I. WATTS, D.W. Rate constants from initial concentration data. **Journal of Chemical Education**, v. 53, p. 493-494, 1976.
- 69.ABRAHAM, M.H.; GRELLIER, P.L.; PRIOR, D.V.; MORRIS, J.J; TAYLOR, P.J. Hydrogen bonding. Part 10t. A scale of solute hydrogen-bond basicity using log K values for complexation in tetrachloromethane. **Journal of Chemical Society Perkin Transactions**, v. 2, p. 521-529, 1990.
- 70.KADOMAA, Y.; ITOB, S.; ATSUMIC, T.; FUJISAWA, S. Mechanisms of cytotoxicity of 2- or 2,6-di-tert-butylphenols and 2-methoxyphenols in terms of inhibition rate constant and a theoretical parameter. **Chemosphere**, v. 74, p. 626-632, 2009.
- 71.GIACOMELLI, C.; MIRANDA, F. S.; GONÇALVES, N.S.; SPINELLI, A. Antioxidant activity of phenolic and related compounds: a density functional theory study on the O–H bond dissociation enthalpy. **Redox Report**, v. 9, p. 263-269, 2004.
72. JØRGENSEN, J. V.; SKIBSTED, L. H. Flavonoid deactivation of ferrylmyoglobin in relation to ease of oxidation as determined by cyclic voltametric. **Free Radical Research**, v. 28, p. 335-351, 1998.