Juliana Malvestio Grippa

Reatividade das espécies heme-Fe Metmioglobina e Oximioglobina frente
ao estado singlete e triplete excitado da Riboflavina

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de
São Carlos da Universidade de São Paulo como parte
dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Daniel Rodrigues Cardoso

São Carlos

2013

Aos meus pais, **Regina e Divaldo**,
pelo apoio e compreensão em
todos os momentos da minha vida.

Agradecimentos

Ao Daniel por ser meu professor, orientador e amigo durante todos esses anos de laboratório;

Aos meus pais que acreditaram em mim incondicionalmente;

Ao meu irmão Vinicius que sempre me mostrou que não há limites quando se quer alguma coisa;

À Larissa pela amizade e companheirismo. E pelo auxílio na elaboração dessa dissertação, mesmo estando longe.

À Marcella, Andressa, Letícia, Milena, Willy, Regina, Silvia e todos aqueles que me ajudaram no desenvolvimento do meu projeto;

Aos professores Júlio, Carla e Marcelo pela disponibilidade dos equipamentos e laboratório;

A todos do laboratório da inorgânica e da cachaça por fazerem dos meus dias mais felizes e divertidos durante o trabalho;

À turma 007 por fazer meus momentos em São Carlos inesquecíveis;

Às minhas amigas de Bebedouro, por serem partes fundamentais da minha trajetória.

“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo.”

Walter S. Landor

Resumo

O pigmento da carne fresca, oximioglobina, e a sua forma oxidada, metmioglobina, podem ser ambos oxidados pela riboflavina quando expostos à radiação luminosa, afetando sua estabilidade redox da carne do ponto de vista nutricional e sensorial. A reação da MbFe(II)O₂ e da MbFe(III) com o estado tripleto da riboflavina, ³Rib, envolve uma eficiente transferência de elétrons entre o anel isoaloxazina da riboflavina e a cadeia polipeptídica da proteína, o que leva à formação de *cross-link* e/ou fragmentação, como demonstrado por SDS-PAGE e Western-blot. A constante global de velocidade para a oxidação da MbFe(II)O₂ pela ³Rib é $(3,0 \pm 0,5) \cdot 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e de $(3,1 \pm 0,4) \cdot 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para a oxidação da MbFe(III) pelo estado tripleto da riboflavina. Cálculos termodinâmicos demonstram ainda que há formação de um complexo exotérmico com estequiometria 1:1 favorecido a temperaturas mais baixas com $K_a = (1,2 \pm 0,2) \cdot 10^4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ a 25 °C e $\Delta H^\circ = -112 \pm 22 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ e $\Delta S^\circ = -296 \pm 75 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$. Conclui-se que para carne, a riboflavina é um fotossensibilizador para oxidação de proteína e não para a descoloração.

Abstract

The fresh meat pigment oxymyoglobin, MbFe(II)O₂, and its oxidized form metmyoglobin, MbFe(III), are both oxidized by riboflavin as photosensitizer. The reaction of MbFe(II)O₂ and MbFe(III) with triplet-state riboflavin, ³Rib, involves the pigment protein, which is oxidatively cleaved or dimerized as shown by SDS-PAGE and Western-blotting, while the heme iron center is not oxidized. The over-all rate constant for oxidation of MbFe(II)O₂ by ³Rib is $(3.0 \pm 0.5) 10^9 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ and $(3.1 \pm 0.4) 10^9 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ for MbFe(III) in aqueous 0.20 mol·L⁻¹ NaCl phosphate buffer of pH 7.4 at 25 °C as determined by transient absorption laser flash photolysis. The high rates are rationalized by ground state hydrophobic interactions as detected as static quenching of fluorescence from singlet-excited state riboflavin by myoglobins using single photon counting time resolved fluorescence spectroscopy and a Stern-Volmer approach. Binding of riboflavin to MbFe(III) has $K_a = (1.2 \pm 0.2) 10^4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ at 25 °C with $\Delta H^\circ = -112 \pm 22 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ and $\Delta S^\circ = -296 \pm 75 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$. For meat, riboflavin is concluded to be a photosensitizer for protein oxidation but not for discoloration.

Lista de Figuras

Figura 1 - Conversão da riboflavina em suas coenzimas FMN e FAD.	14
Figura 2 - Mecanismos de atuação da Riboflavina como fotossensibilizador. Tipo I: oxidação de um substrato e formação de íon superóxido por transferência de elétron a partir do radical neutro da riboflavina; Tipo II: desativação física do estado triplete excitado por transferência de energia e geração de oxigênio singlete excitado.	16
Figura 3 - Espectro eletrônico de absorção da riboflavina na concentração de $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 50 mmol L^{-1} e pH 7.4.	17
Figura 4 - Formação do estado triplete excitado da riboflavina após exposição à radiação luminosa e comprimento de onda de 440 nm.	17
Figura 5 - Estrutura da mioglobina de coração de cavalo com os resíduos de Tirosina e Triptofano expostos ao solvente.	18
Figura 6 - Estrutura química e tridimensional do grupo heme-Fe(II).	19
Figura 7 - a) Visão lateral do grupo heme e a disposição dos seus 6 pontos de coordenação e b) Efeito estérico decorrente da coordenação do oxigênio molecular....	20
Figura 8 – Ilustração da conversão dinâmica dos diferentes pigmentos de mioglobina em carne.....	21
Figura 9 – Ilustração das consequências decorrentes da oxidação das proteínas em alimentos.....	22
Figura 10 - Diagrama de Jablonski demonstrando os processos fotoquímicos possíveis.	23
Figura 11 – Foto ilustrativa da bancada Fotoquímica utilizada nos experimentos de fotólise continua.	29
Figura 12 - Espectros eletrônicos de absorção da metmioglobina ($C = 1,65 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e oximioglobina ($C = 1,18 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão fosfato 50 mmol L^{-1} e pH 7,4.	31
Figura 13 - Espectros de absorção eletrônica da a) metmioglobina e b) oximioglobina, a temperatura ambiente, para as diversas concentrações indicadas na legenda da Figura.32	
Figura 14 - Espectros de emissão de fluorescência da riboflavina na presença de crescentes concentrações de metmioglobina em diferentes temperaturas a) 15°C , b) 25°C , e c) 35°C em companhia do ajuste linear da equação de Stern-Volmer com os dados experimentais.	34
Figura 15 – Gráficos de Stern-Volmer obtidos para a supressão de fluorescência da riboflavina com crescentes concentrações de mioglobina em três diferentes temperaturas.....	35
Figura 16 – Linearização da equação de Stern-Volmer para cálculo da constante de associação (K_a) e número de sítios de ligação.	36
Figura 17. Ajuste linear da equação de Van't Hoff	37
Figura 18 - Decaimento de fluorescência da riboflavina e das soluções com o supressor metmioglobina em diferentes concentrações.....	38
Figura 19 - Decaimento de fluorescência da riboflavina e das soluções com o supressor oximioglobina em diferentes concentrações.....	39

Figura 20 – Curvas de decaimento da absorção em 720 nm, referentes ao estado tripleto da riboflavina em função de crescentes concentrações de a) metmioglobina e b) oximioglobina	40
Figura 21 – Gráfico de k_{obs} versus [Q] para o cálculo da constante de supressão do estado tripleto da riboflavina pela a) metmioglobina e b) oximioglobina.	41
Figura 22 – Espectro eletrônico de absorção de uma solução $2,67 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de riboflavina na presença de $8,35 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de metmioglobina em tampão fosfato 50 mmol L^{-1} e pH 7,4.	42
Figura 23 – Espectro eletrônico de absorção de uma solução $3,90 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de riboflavina na presença de $4,55 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de oximioglobina em tampão fosfato 50 mmol L^{-1} e pH 7,4.	43
Figura 24 – Espectros eletrônicos de absorção da solução a) riboflavina-metmioglobina e b) riboflavina-oximioglobina em diferentes tempos de irradiação.	44
Figura 25. Perfil do SDS-PAGE em tampão aquoso pH 7,4 contendo: 1) $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de mioglobina e $30 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de riboflavina mantidas no escuro; 2) $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de mioglobina, $30 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de riboflavina e $30 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de DMPO mantidos no escuro; 3) $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de mioglobina e $30 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de riboflavina expostos a luz no comprimento de onda de 436 nm durante 1 hora; 4) $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de mioglobina, $30 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de riboflavina, e $30 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de DMPO expostos a luz no comprimento de onda de 436 nm durante 1 hora.	45
Figura 26. Perfil do gel Western-blotting e intensidade das bandas para uma solução aquosa com pH 7,4 contendo $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de mioglobina e $30 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de riboflavina. Coluna esquerda: amostra mantida no escuro. Coluna direita: amostra exposta à radiação luminosa com comprimento de onda de 436 nm durante 1 hora.	46

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Composição aproximada de carnes a partir de diversas fontes	13
Tabela 2 - Valores das constantes de associação (K_a) entre a riboflavina e a mioglobina , e razão estequiométrica do número de ligantes por sítio de ligação para diferentes temperaturas.....	36
Tabela 3 – Tempos de vida do estado singlete para a solução de riboflavina e para as misturas de fluoróforo e como supressor a metmioglobina.....	38
Tabela 4 - Tempos de vida do estado singlete para a solução de riboflavina e para as misturas de fluoróforo e supressor oximioglobina.	39

Lista de abreviações

ATP - do inglês *Adenosine Triphosphate*

ADP – do inglês *Adenosine Diphosphate*

CYS – *Cisteína*

DMPO - 5,5-dimethyl-pyrroline N-oxide

EPR - do inglês *Electron paramagnetic resonance*

FMN - Flavina Mononucleotídeo

FAD - Flavina Adenina Dinucleotídeo

His - Histidina

ISC - do inglês *Inter System Crossing*

Met - Metionina

MetMb / MbFe(III) - Metmioglobina

M_r - Massa Molecular

NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NHE - do inglês *Normal Hydrogen Electrode*

O₂^{•-} - Radical Superóxido

¹O₂ – Oxigênio singlete

OxiMb / MbO₂Fe(II) - Oximioglobina

Rib - Riboflavina

Trp - Triptofano

Tyr – Tirosina

Sumário

1. Introdução.....	12
1.1. Riboflavina	14
1.2. Mioglobina.....	18
1.3. Oxidação da Carne.....	22
1.4. Princípios de Fotoquímica	23
2. Materiais e Métodos	26
2.1. Reagentes.....	26
2.2. Preparação das Proteínas	26
2.3. Fluorescência	26
2.4. Fluorescência resolvida no tempo	27
2.5. Fotólise por pulso de laser	28
2.6. Caracterização dos fotoprodutos.....	28
2.6.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida	29
2.6.3. Western-Blotting	30
3. Resultados e Discussão.....	31
3.1. Caracterização espectrofotométrica da Mioglobina	31
3.2. Desativação do estado singlete excitado da riboflavina pelas heme-proteínas da carne vermelha	32
3.2.1 Fluorescência no estado estacionário	32
3.2.2. Termodinâmica da formação do complexo riboflavina-metmioglobina.....	37
3.2.3. Fluorescência resolvida no tempo.....	38
3.4. Desativação do estado triplete excitado da riboflavina pela mioglobina	40
3.4.1. Fotólise por pulso de laser	40
3.5. Caracterização dos fotoprodutos.....	42
3.5.1. Espectroscopia no Uv-vis	42
3.5.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida	44
3.5.3. Western Blotting	45
4. Conclusão	47
5. Referências Bibliográficas	48

1. Introdução

As vitaminas compreendem um grupo diverso de compostos orgânicos, os quais são micronutrientes essenciais na nutrição dos seres humanos e outros vertebrados, não podem ser sintetizados pelo próprio organismo, sendo obtidas, portanto, através da alimentação [1, 2].

As funções das vitaminas *in vivo* podem ser listadas pela sua atuação como: 1) coenzimas ou seus precursores (niacina, tiamina, riboflavina, biotina, ácido pantotênico, piridoxal e cobalamina, e ácido fólico); 2) componentes do sistema de defesa antioxidante (ácido ascórbico, retinóides, e tocoferol); 3) fatores envolvidos na regulação genética (retinóides, calciferol e muitas outras); e 4) fatores em funções específicas, como a vitamina A (retinóides) na visão, os ascorbatos (vitamina C) em reações de hidroxilação e a vitamina K (naftoquinonas) em reações de carboxilação [1].

Juntamente com as vitaminas, as proteínas também desempenham um papel central nos sistemas biológicos. Presentes como polímeros complexos compostos por 21 aminoácidos diferentes, as proteínas correspondem a segunda maior fração dentro das células [1, 2]. Muitas apresentam atividade catalítica e atuam como enzimas e outras servem como elementos estruturais, receptores de sinais ou transportadores específicos de substâncias para dentro ou para fora das células [2].

A carne é uma excelente fonte de vitaminas hidrossolúveis e de proteínas, uma vez que a composição de seus aminoácidos é muito próxima aos aminoácidos essenciais necessários à dieta humana. No entanto, a quantidade disponível desses nutrientes varia de acordo com a espécie do animal, idade, sexo e condição nutricional [1]. A composição aproximada do tecido magro separável da carne (músculo esquelético livre de gorduras) é exposta na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição aproximada de carnes a partir de diversas fontes

	Carne Vermelha			Aves		Peixes	
	<i>Bovina</i>	<i>Suína</i>	<i>Cordeiro</i>	<i>Frango</i>	<i>Peru</i>	<i>Bacalhau</i>	<i>Atum</i>
Água^a	70,62	72,34	73,42	74,76	74,12	81,22	68,09
Proteínas^a	20,78	21,07	20,29	23,09	24,60	17,81	23,33
Lipídeos^a	6,16	5,88	5,25	1,24	0,65	0,67	4,90
Cinzas^a	1,02	1,04	1,06	1,02	1,02	1,16	1,18
Vitaminas^b							
Tiamina	110	966	130	70	41	76	241
Riboflavina	180	273	230	92	118	65	251
Niacina	3590	4829	6000	11194	6255	2063	8654
B₆ (Piridoxal)	440	500	160	550	580	245	455
Folato	7,0	5,0	23,0	4,0	8,0	7,0	2,0
B₁₂ (cobalamina)	3,25	0,67	2,62	0,38	0,47	0,91	9,43

^aPorcentagem em massa/massa da porção comestível.^bValores expressos em µg/100g.

Fonte: Straburg, G.; Xiong, Y. L.; Chiang, W. Fisiologia e Química dos Tecidos Musculares Comestíveis. In: Damoradan, S.; Parkin, K. L.; Fennema, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª Edição, 2010, cap. 16.

Segundo a Funcex [3], as carnes bovina e de frango são as principais *commodities* exportadas pelo Brasil. No ano de 2013, a produção nacional atingiu 9,6 milhões de toneladas, com um consumo de 7,86 milhões de toneladas e ainda está previsto para 2014 um aumento de 3%, o que representaria um recorde de 9,9 milhões de toneladas. No mundo, esse valor chegou a quase 257 milhões de toneladas em 2013, com um consumo de, aproximadamente, 247 milhões de toneladas [4].

Com base nessas informações, produtores e consumidores precisam estar atentos à qualidade da carne, tanto do ponto de vista nutricional quanto sensorial. Dessa forma, o presente projeto tem como objetivo estudar as reações oxidativas derivadas da exposição da carne à radiação luminosa no visível, mais precisamente entre a proteína mioglobina, responsável pelo pigmento da carne, e os estados singlete e triplete excitado da riboflavina.

1.1. Riboflavina

A riboflavina e seus derivados estão entre os fotossensibilizadores mais importantes em sistemas biológicos e são capazes de induzir a fotooxidação em uma ampla variedade de compostos [5]. Conhecida antigamente como vitamina B₂, a família da riboflavina apresenta como composto original o 7,8-dimetil-10-ribitil-isoaloxazina, cuja fosforilação na posição 5' da cadeia lateral do grupo ribitil leva à formação das formas biologicamente ativas flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD), Figura 1 [1].

Figura 1 - Conversão da riboflavina em suas coenzimas FMN e FAD.

Fonte: Adaptado de Gregory III, J. F. Vitaminas. In: Damoradan, S.; Parkin, K. L.; Fennema, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª Edição, 2010, cap. 7.

Ambas as espécies, riboflavina, FMN, e FAD são provenientes da dieta e estão comumente ligadas às proteínas, na forma de coenzimas, auxiliando um grande número de enzimas que catalisam diferentes processos de oxirredução durante o processo metabólico de carboidratos, lipídeos e proteínas [1, 6, 7]. Dessa forma, são essenciais para o crescimento e para a saúde do ser humano, contribuindo, particularmente, no retardo de glaucoma e na preservação da aparência e sensação de juventude [6].

Os produtos lácteos podem ser considerados a maior fonte de vitamina B₂ [8], juntamente com ovos e fígado [7, 9, 10, 11]. A carne, principalmente a suína, também é considerada uma importante fonte para disponibilidade das coenzimas FMN e FAD [12], Tabela 1.

A característica de fotossensibilização das flavinas encontra-se no anel tricíclico isoaloxazina proporcionando a esta classe de compostos em absorver luz na região do visível, com valores de absorvidade molar consideravelmente altos ($\epsilon_{375\text{nm}} = 9.155 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $\epsilon_{446\text{nm}} = 10.645 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [13], característica de transições $\pi\text{-}\pi^*$, o que resulta em estados singletes excitados ($^1\text{Rib}^*$) após excitação. Um subsequente e eficiente cruzamento intersistemas (ISC), $\Phi_{\text{ISC}} = 0.67$, promove a formação de um estado metaestável, denominado estado triplete excitado ($^3\text{Rib}^*$), o qual transfere eficientemente o excesso de energia para o oxigênio molecular a fim de formar oxigênio singlete, $^1\text{O}_2$, além de ser um poderoso oxidante ($E = 1,77 \text{ V vs. NHE}$) [5, 14, 15, 16].

No estado triplete, as flavinas podem reagir por meio de duas vias: oxidando diretamente um substrato (como, por exemplo, aminoácidos [17] ou flavonoides), levando à formação de um cátion radical desse substrato e um ânion radical da riboflavina ($\text{pK}_a = 6,8$), o qual reduz o oxigênio molecular ao radical aniônico superóxido (Tipo I) ou então sendo desativada fisicamente por oxigênio molecular por transferência de energia, formando oxigênio singlete excitado (Tipo II)*, Esquema 1 [5, 16, 18, 19, 20].

O reativo estado singlete excitado do oxigênio formado por transferência de energia, é comumente denotado de $^1\Delta\text{O}_2$ e possui um dos dois orbitais π^ degenerado ocupado ($\pi^* \uparrow\downarrow$) e apresenta energia $22,5 \text{ Kcal mol}^{-1}$ superior ao estado fundamental. Desta forma, seu relativo longo tempo de meia vida ($3,6 \mu\text{s}$ em água), eletrofilicidade e a não violação da multiplicidade de spin promovem o aumento da reatividade frente a substratos orgânicos quando comparado ao oxigênio no estado fundamental triplete.

Figura 2 - Mecanismos de atuação da Riboflavina como fotossensibilizador. Tipo I: oxidação de um substrato e formação de íon superóxido por transferência de elétron a partir do radical neutro da riboflavina; Tipo II: desativação física do estado triplete excitado por transferência de energia e geração de oxigênio singlete excitado.

Fonte: Cardoso, D. R.; Libardi, S. H.; Skibsted, L. H. Riboflavin as a photosensitizer. Effects on human health and food quality. **Food and Function**, 2012.

As principais bandas de absorção das flavinas na região do UV-vis apresentam comprimento de onda com máximo ao redor de 270, 375 e 450 nm, Figura 3 [5]. A banda em 450 nm corresponde à transição entre o orbital molecular ocupado mais alto (HOMO) e o orbital molecular não ocupado mais baixo (LUMO). Os três picos pertencem à transição singlete $\pi\text{-}\pi^*$ e emitem fluorescência em torno de 530 nm e fosforescência em torno de 620 nm [21, 22].

A fluorescência do estado transiente excitado ($\tau = 5$ ns) é competitiva com o cruzamento intersistemas, o que leva a molécula ao estado metaestável triplete excitado de menor energia e maior tempo de vida ($\tau = 15$ μ s) [5].

Figura 3 - Espectro eletrônico de absorção da riboflavina na concentração de $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 50 mmol L^{-1} e pH 7.4.

Fonte: GRIPPA, J. M.

Cálculos *ab initio* empregando a teoria da densidade funcional (DFT) revelam que N(1) e N(5) possuem a maior porcentagem da densidade de spin total e assim o estado tripleto excitado da riboflavina ($S=1$) pode ser descrito como um bi radical [5], como ilustrado na Figura 4.

Figura 4 - Formação do estado tripleto excitado da riboflavina após exposição à radiação luminosa e comprimento de onda de 440 nm.

Fonte: Huvaere, K.; Cardoso, D. R.; Homem-De-Mello, P. H.; Westermann, S.; Skibsted, L. H. Light-Induced Oxidation of Unsaturated Lipids as Sensitized by Flavins. **J. Phys. Chem. B**, 2010, v.114, p. 5583–5593.

1.2. Mioglobina

Uma das primeiras proteínas a ter sua estrutura dimensional por raio-X elucidada, a mioglobina é uma hemoproteína muscular, cuja função é armazenar e facilitar o transporte de oxigênio nos músculos, aumentando a solubilidade efetiva do oxigênio e atuando como um reservatório do mesmo de forma a facilitar sua difusão dos capilares sanguíneos para as mitocôndrias [2].

É uma proteína globular extremamente compacta, composta por 153 resíduos de aminoácidos, sendo, portanto, relativamente pequena (M_r 17.600) [23, 24]. É constituída por oito unidades de α -hélices ligadas umas às outras por meio de segmentos polipeptídicos curtos formando uma molécula elipsoidal, Figura 5 [2, 25].

Figura 5 - Estrutura da mioglobina de coração de cavalo com os resíduos de Tirosina e Triptofano expostos ao solvente.

Fonte: Evans, S.V., Brayer, G.D. High-resolution study of the three-dimensional structure of horse heart metmyoglobin. (1990) **J. Mol. Biol.** 213: 885-897.

Seu interior é constituído basicamente por resíduos de aminoácidos não polares, tais como leucina, valina, metionina e fenilalanina. Os resíduos polares como ácido aspártico, ácido

glutâmico, lisina e arginina estão voltados para a face exterior da proteína. Os únicos 2 resíduos polares presentes no interior da molécula são do amino-ácido histidina.

A estrutura primária da mioglobina influencia na estabilidade da cor da carne através de autooxidação, retenção do grupo heme, estabilidade estrutural, termoestabilidade e afinidade por oxigênio. Além disso, variações na sequência de aminoácidos da mioglobina pode influenciar na coloração da carne através de interações específicas com pequenas biomoléculas, tais como lactato e aldeídos [23].

O grupo heme é um grupo prostético que consiste em um átomo de ferro no estado de oxidação 2+ contido no centro de um anel orgânico heterocíclico, denominado porfirina. A porfirina do grupo heme, com seu arranjo particular de quatro substituintes metil, dois propionato e dois vinil, é conhecida como protoporfirina IX, Figura 6 [2, 25].

Figura 6 - Estrutura química e tridimensional do grupo heme-Fe(II).

Fonte: Adaptado de Schwartz, Steven J.; Elbe, Joachim H.; Giusti, M. Monica Corantes. In Damoradan, S.; Parkin, K. L.; Fennema, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª Edição, 2010, cap. 9.

Os outros dois pontos de coordenação do átomo de ferro estão disponíveis perpendicularmente ao plano do anel porfirínico. Um deles liga-se ao átomo de nitrogênio proveniente do resíduo de aminoácido histidina e o outro fica “aberto” para atuar como sítio de ligação para a molécula de oxigênio. Este estabelece uma ligação de hidrogênio com a histidina distal (His 58 ou His E7), que fica oposta à histidina proximal (His 87 ou His F8). A molécula de O₂ fica, portanto, “prensada” entre o átomo de ferro do grupo heme e a histina distal, Figura 7 [2, 25, 26].

Figura 7 - a) Visão lateral do grupo heme e a disposição dos seus 6 pontos de coordenação e b) Efeito estérico decorrente da coordenação do oxigênio molecular.

Fonte: Adaptado de D. L. Nelson e M. M. Cox **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, 4^o Edição, 2010, cap. 5.

Considerada o principal pigmento da carne, a mioglobina representa 70-90 % da concentração total de heme proteínas no tecido muscular, podendo existir em diferentes estados redox, como ilustrado na Figura 8 [27, 28, 29]. A oxigenação altera o estado eletrônico do Fe(II)-heme, o que é indicado pela mudança na coloração do sangue de púrpura escuro, característica do sangue venoso, para o vermelho brilhante do sangue arterial [25, 27].

Figura 8 – Ilustração da conversão dinâmica dos diferentes pigmentos de mioglobina em carne.

Fonte: Carlsen, C. U.; Moller, J. K. S.; Skibsted, L. H. Heme-iron in lipid oxidation. **Coordination Chemistry Reviews**. Volume 249, p. 485–498, 2005.

O ferro heme do anel da porfirina pode assumir duas formas: ferroso reduzido (+2) ou férrico oxidado (+3). Quando o oxigênio molecular liga-se à mioglobina, processo denominado oxigenação, ocorre a formação da oximioglobina, $\text{MbO}_2\text{Fe(II)}$, e do ânion superóxido $\text{O}_2^{\bullet-}$. Quando ocorre a oxidação da mioglobina, o átomo de ferro é convertido para o estado Fe(III) , formando a metmioglobina: MbFe(III) . O ferro heme no estado +2, que necessita de uma ligação na sexta posição, é denominado deoximioglobina [1, 2, 30].

A metmioglobina pode ser reduzida de volta à deoximioglobina por ação enzimática da metmioglobina *redutase* que, na presença de NADH, pode reduzir com efetividade a metMb para o estado ferroso [1].

1.3. Oxidação da Carne

Reações de oxidação são tão importantes quanto à microbiologia na qualidade e na vida de prateleira da carne. Muitos estudos a respeito da oxidação na carne e outros sistemas alimentícios focam na oxidação dos lipídeos. No entanto, as proteínas, as quais, juntamente com a água, são os principais constituintes da carne, também estão suscetíveis às modificações oxidativas [19, 31].

A oxidação das proteínas pode causar mudanças na sua hidrofobicidade, conformação e solubilidade, além de alterar sua suscetibilidade como enzima proteolítica [19]. A maior consequência da oxidação é a formação de *cross-link*, o que inclui a formação de ligações de dissulfeto (formadas pela oxidação dos grupos tiol da cisteína); formação de ditirosina; e reações entre grupos carbonílicos de proteínas (formadas através da oxidação das cadeias laterais das proteínas) e o grupo ϵ -amino das cadeias laterais da lisina, Figura 9 [19, 29].

Figura 9 – Ilustração das consequências decorrentes da oxidação das proteínas em alimentos.

Fonte: Adaptado de Lund, Marianne N.; Heinonen, Marina; Baron, Caroline P.; Estévez, Mario Protein Oxidation in muscle foods: A review. **Mol. Nutr. Food Res.** 2011, 55, 83-95.

Reações indiretas de fotooxidação de proteínas podem ocorrer através da formação do $^1\text{O}_2$ e suas subsequentes reações envolvendo os resíduos de aminoácidos triptofano, histidina, tirosina, metionina e cisteína presentes na cadeia lateral da proteína [32].

Desta forma, estudos serão conduzidos visando à degradação dos diferentes estados de oxidação da mioglobina quando expostas à radiação luminosa na presença de riboflavina. A reatividade entre estes compostos será investigada do ponto de vista cinético através de técnicas

espectroscópicas resolvidas no tempo e os produtos gerados serão avaliados através de técnicas espectroscópicas e espectrométricas.

1.4. Princípios de Fotoquímica

A fotoquímica é uma ciência que descreve os processos físicos e químicos induzidos pela absorção de fótons, estabelecendo mecanismos baseados em estruturas moleculares e a relação dos mesmos com as suas propriedades.

As reações fotoquímicas ocorrem, basicamente, em três etapas: 1) Absorção de um fóton, levando a molécula a um estado excitado; 2) Processos fotoquímicos primários de dissipação de energia; e 3) Processos fotoquímicos secundários, os quais levam à formação de outros compostos. O Diagrama de Jablonski [33] da Figura 10 ilustra os estados energéticos de uma molécula e as possíveis transições entre eles.

Figura 10 - Diagrama de Jablonski demonstrando os processos fotoquímicos possíveis.

As linhas cheias correspondem aos processos radioativos: ($\rightarrow$) Absorção; ($\rightarrow$) Fluorescência; ($\rightarrow$) Fosforescência. Linhas pontilhadas representam os processos não radioativos: ($\rightarrow$) Conversão interna; ($\rightarrow$) Cruzamento intersistemas.

Fonte: GRIPPA, J. M.

As linhas grossas correspondem aos estados eletrônicos da molécula: S₀ representa o estado fundamental, enquanto que S₁ e S_n representam os estados excitados. No estado singlete (S) os spins estão em direção antiparalela, enquanto que no estado tripleto, representado pelos

símbolos T_1 , T_2 ou T_n , os elétrons possuem spins paralelos. As linhas mais finas correspondem aos níveis vibracionais pertencentes a cada estado eletrônico.

Após absorver luz (A), o elétron é promovido do estado fundamental S_0 para um estado eletrônico superior e então pode sofrer inúmeros processos intra- e intermoleculares, radioativos ou não, para liberação de energia. Todos os processos que contribuem para a desativação do estado excitado competem entre si. Estes são:

Conversão interna (CI): transição não radiativa entre estados eletrônicos de mesma multiplicidade, ou seja, singlete-singlete ou triplete-triplete. Mediada por colisões com o solvente ou movimentos internos (vibracionais). Intervalo de velocidade: $k_{CI} = 10^{11}-10^{14} \text{ s}^{-1}$ ($S_2 \rightarrow S_1$) e $k_{CI} = 10^5-10^8 \text{ s}^{-1}$ ($S_1 \rightarrow S_0$) [34].

Cruzamento intersistemas (ISC): transição não radiativa entre estados de diferentes multiplicidades devido ao acoplamento spin-órbita. Envolve a inversão de spin, portanto é um processo mais lento. Intervalo de velocidade: $k_{ISC} = 10^{-1}-10^4 \text{ s}^{-1}$ [34].

Fosforescência (P): envolve transições entre estados com multiplicidades diferentes, acompanhado de emissão de luz. Devido à inversão de spin que ocorre no processo, a velocidade de emissão de fosforescência é lenta comparada com a velocidade de fluorescência. Por ser um processo lento, a fosforescência é muito afetada pelo meio, sendo difícil sua observação a temperatura ambiente. Intervalo de velocidade: $k_P = 10^{-1}-10^4 \text{ s}^{-1}$ [34].

Fluorescência (F): processo que envolve transição entre estados de mesma multiplicidade, acompanhado de emissão de luz. Em fase condensada, a velocidade de relaxação vibracional e eletrônica nos estados excitados é muito alta comparada à velocidade de emissão. Como resultado, a emissão irá ocorrer a partir do nível vibracional zero do estado excitado mais baixo. Intervalo de velocidade: $k_F = 10^7-10^9 \text{ s}^{-1}$ [34].

A fluorescência pode ser suprimida através de duas maneiras [33, 34]:

a) Supressão Dinâmica, em que há um encontro entre a molécula fluorescente excitada e o supressor, sendo que a primeira retorna ao estado fundamental sem emissão de radiação.

b) Supressão Estática, em que ocorre a formação de um íon-par não fluorescente entre o supressor e fluoróforo no estado fundamental. Neste caso, pode ocorrer a formação de um complexo não fluorescente entre o fluoróforo e o supressor. Este complexo ao absorver luz, imediatamente retorna ao estado fundamental sem emissão de fóton;

As constantes de supressão de fluorescência podem ser calculadas a partir da equação de Stern-Volmer, a qual relaciona os rendimentos quânticos de um determinado processo com e sem supressor.

Por definição, o rendimento quântico de uma reação é dado pela razão entre a velocidade do processo de interesse pela velocidade do processo de desativação [33, 34].

Considerando a seguinte reação de supressão, em que Q é o supressor:

Sabe-se que a velocidade de supressão é dada por $v = k_q[Q]$, onde k_q é a constante de velocidade de supressão, e que a velocidade de desativação do processo é igual a $(k_F + k_D + k_q[Q])*[A^*]$, onde k_F é a constante de velocidade de fluorescência e k_D é a constante de velocidade dos processos de desativação por conversão interna e ISC. Dessa forma, os rendimentos quânticos (Φ) são dados por:

Sem supressor:

$$\Phi^0 = k_F[A^*]/(k_F + \Sigma k_D) \quad (\text{Equação 1})$$

Com Supressor:

$$\Phi = k_F[A^*]/(k_F + \Sigma k_d + k_q[Q]) \quad (\text{Equação 2})$$

A razão entre tais rendimentos quânticos é então definida por:

$$\Phi^0/\Phi = 1 + \{k_q[Q]/(k_F + \Sigma k_D)\} \quad (\text{Equação 3})$$

Como o tempo de vida, τ , é o tempo médio de existência do estado excitado, ele pode ser definido como o inverso da soma de todas as velocidades que desativam o estado, isto é, $\tau = 1/(k_F + k_{CI} + k_{CS})$.

Dessa forma, a equação acima, considerando o tempo de vida do estado singlete da molécula, pode ser definida por:

$$\Phi^0/\Phi = 1 + (k_q[Q]*\tau) \quad (\text{Equação 4})$$

Esta equação, denominada equação de Stern-Volmer, ainda pode ser relacionada com a intensidade de fluorescência da substância com (I) e sem supressor (I_0):

$$I_0/I = 1 + (k_q[Q]*\tau) \quad (\text{Equação 5})$$

O ajuste linear desta equação será utilizado posteriormente para o cálculo de constante de supressão do estado singlete da mioglobina pela riboflavina.

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes

A Mioglobina de coração de cavalo (pureza < 90 %) e a FMN foram obtidas pela Sigma-Aldrich. Os sais KHPO_4 e KH_2PO_4 foram todos de grau analítico e fornecidos pela J. T. Baker. A água utilizada foi previamente destilada e posteriormente deionizada em um sistema Milli-Q Millipore Co. ($18,2 \, \Omega \, \text{cm}$ e $T = 25 \, ^\circ\text{C}$).

2.2. Preparação das Proteínas

Para obtenção da metmioglobina, a proteína mioglobina obtida comercialmente foi dissolvida em tampão fosfato $50 \, \text{mmol L}^{-1}$ com pH ajustado para 7,4 e purificada em uma coluna Sephadex G-25. Sua concentração foi determinada através de espectroscopia no UV-vis utilizando um coeficiente de absorvidade molar de $\epsilon_{525} = 7700 \, \text{L mol}^{-1} \, \text{cm}^{-1}$ em 525 nm [35, 36].

Para preparação da oximioglobina, 2 mL da solução de mioglobina comercial (cerca de 15 a 30 mg a cada mL de tampão fosfato $50 \, \text{mmol L}^{-1}$ com pH 7,4) foram reduzidos pela adição de 2 mg de hidrossulfito de sódio (ditionito). A solução é imediatamente purificada, em meio redutor e anaeróbico, em uma coluna Sephadex G-25 para retenção do ditionito residual [37, 38]. Sua concentração foi determinada através de espectroscopia no UV-vis utilizando um coeficiente de absorvidade molar de $\epsilon_{544} = 14300 \, \text{L mol}^{-1} \, \text{cm}^{-1}$ em 544 nm [39, 40].

2.3. Fluorescência

O experimento foi conduzido em um espectrofluorímetro Hitachi modelo F-4500, com velocidade de escaneamento de $1200 \, \text{nm min}^{-1}$ e abertura da fenda de excitação e de emissão ajustadas em 5 nm. As amostras foram excitadas em cubetas de quatro faces polidas de $1,0 \, \text{cm} \times 1,0 \, \text{cm}$ da Hellma e os espectros de emissão foram determinados fixando-se o comprimento de onda de excitação em 445 nm.

A concentração da riboflavina utilizada foi de $1,0 \cdot 10^{-5} \, \text{mol L}^{-1}$ e a concentração do supressor (metmioglobina e oximioglobina) variaram de zero a $2,0 \cdot 10^{-5} \, \text{mol L}^{-1}$. A temperatura

foi variada entre 15 e 35 °C a fim de verificar o comportamento da constante de velocidade da reação.

2.4. Fluorescência resolvida no tempo

Os tempos de vida foram determinados em um instrumento de contagem de fótons resolvido no tempo. Para tanto, utilizou-se de um espectrômetro equipado com polarizadores Glan-Laser e detector do tipo MCP-PMT (R3809U-50, Hamamatsu) resfriado por sistema de Peltier. Os pulsos de 200 fs na região de 700 - 900 nm foram gerados através de um *laser* de alta intensidade e pulsos ultracurtos constituído por um *Laser* Verdi/Coherent de 5W bombeando um *laser* de Ti-Safira (Coherent Mira Modelo XW). Para obtenção de pulsos de excitação na região de 400 nm utilizou-se um dobrador de frequência para geração do segundo harmônico.

Os decaimentos de fluorescência foram tomados com contagens de 5×10^3 fótons e incremento de tempo de 25 ps por canal de aquisição. Os fótons emitidos foram coletados por um detector MCP-PMT (R3809U-50, Hamamatsu), resfriado por um sistema de Peltier e a eletrônica de contagem foi baseada na placa de aquisição TCC 900 obtida da Edinburgh Instruments.

As medidas dos tempos de vida foram realizadas excitando a amostra com uma fonte de luz pulsada, de forma que, a cada pulso de excitação, apenas um único fóton é detectado. No decaimento da intensidade de fluorescência obtém-se um acúmulo do número de contagens. Para calcular os tempos de vida de fluorescência foi utilizada uma análise de reconvolução, a qual envolve a convolução do decaimento da amostra com a resposta instrumental (IRF – *Instrument Response Function*).

A concentração de riboflavina utilizada foi de $1,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e a concentração de metmioglobina e oximioglobina variaram de zero a $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. O comprimento de onda de excitação foi em 440 nm e de monitorado em 517 nm.

Os tempos de vida de fluorescência foram calculados por meio de um procedimento de reconvolução com modelos de decaimento multiexponenciais, segundo a equação 6, e os valores estão expostos na tabela 1.

$$I(t) = \sum_i b_i \exp \left[\frac{-t}{\tau_i} \right] \quad (\text{Equação 6})$$

Onde τ_i é o tempo de decaimento e b_i o fator pré-exponencial da *i-ésima* componente.

2.5. Fotólise por pulso de laser

Para analisar a desativação do estado tripleto da riboflavina pela mioglobina utilizou-se da espectroscopia eletrônica de transientes por fotólise por pulso de laser com resolução temporal de nano segundos LFP-112 da Luzchem (Ottawa, Canadá) utilizando-se de uma fotomultiplicadora de 9 estágios e um digitalizador Tektronix TDS 2012. A excitação da amostra foi obtida pelo uso da terceira harmônica (355 nm) de um laser de Nd:YAG atenuado a 14 mJ cm^{-2} como fonte de excitação com resolução temporal de 8 ns.

As amostras foram excitadas em uma cubeta de quatro faces polidas de 1,0 cm x 1,0 cm da Hellma. O comprimento de onda de excitação foi de 355 nm e o decaimento do estado tripleto excitado monitorado em 720 nm. Todas as medidas foram realizadas a temperatura de 25 °C e as amostras previamente saturadas com N_2 por cerca de 60 minutos. A concentração de riboflavina utilizada foi de 80 μM enquanto que a concentração do supressor foi variada de zero a $7 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

2.6. Caracterização dos fotoprodutos

2.6.1. Fotólise no estado estacionário

A fim de identificar os produtos formados durante a fotooxidação da riboflavina na presença das proteínas da carne, utilizou-se uma bancada fotoquímica fabricada pela Oriel empregando-se radiação luminosa contínua com lâmpada de mercúrio de alta pressão e comprimento de onda selecionado por filtro de interferência, $(446 \pm 10) \text{ nm}$, como ilustra a figura 11.

Figura 11 – Foto ilustrativa da bancada Fotoquímica utilizada nos experimentos de fotólise contínua.

Soluções de riboflavina com o supressor (metmioglobina ou oximioglobina) foram preparadas na proporção de 5:1 equivalente na presença e na ausência de oxigênio. As amostras contendo O_2 foram expostas por 1, 3, 4,5 e 6 horas de irradiação, Para avaliar a influência do oxigênio, também desareamos uma solução durante 1 hora em argônio e a irradiamos por 3 horas. Alíquotas foram coletadas no tempo zero e após os períodos citados acima e, então, levadas para análise de espectrofotometria no UV-vis em espectrômetro Hitachi U-3501.

2.6.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

As amostras antes e após irradiação luminosa foram coletadas e diluídas em tampão contendo SDS para uma concentração final de 1 mg ml^{-1} de proteína (106 mM Tris-HCl, 141 mM Tris-Base, 2% SDS, 10% Glicerol, 0,51 mM EDTA, 0,22 mM SERVA Blue G250, 0,175 mM Vermelho de Fenol) e aquecidas por 5 minutos a temperatura de 90°C . Posteriormente, 15 μL da solução resultante foram adicionados a um gel Tris-Acetato (10% poliacrilamida) e a voltagem aplicada foi de 125 V por 45 minutos. Após a separação eletroforética, o gel foi corado com 0,1% de Comassie Brilliant Blue R-250, cujo limite de detecção é $0,1 - 1,0 \mu\text{g}$ de proteína. Após o gel ser descorado, as proteínas foram identificadas através de comparação das massas moleculares com relação a migração eletroforética do marcador.

Quatro diferentes composições de amostra foram analisadas:

- 1) $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de mioglobina e $30 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de riboflavina mantidas no escuro;
- 2) $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de mioglobina, $30 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de riboflavina e $30 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de DMPO mantidos no escuro;
- 3) $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de mioglobina e $30 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de riboflavina expostos a luz no comprimento de onda de 436 nm durante 1 hora;
- 4) $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de mioglobina, $30 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de riboflavina, e $30 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de DMPO expostos a luz no comprimento de onda de 436 nm durante 1 hora.

2.6.3. Western-Blotting

Alíquotas de 25 μL da solução investigada contendo cerca de 1,0 mg mL^{-1} de proteína foram adicionadas a 25 μL de solução tampão de amostragem 4X LDS contendo 50 mM de DTT e submetidas à eletroforese em um gel de 8-12% de poliacrilamida sob condições redutoras e transferidos posteriormente para membranas de difluoreto de polivinilideno com porosidade 0,20 μm utilizando-se um tampão de Nu-PAGE contendo 10% de metanol. As membranas de difluoreto de polivinilideno foram então bloqueadas com uma solução 5% de leite desnatado em pó em solução de TBS-T (20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl e 0,3% Tween-20) durante 1 hora a temperatura ambiente. O ensaio de imunoblot foi realizado incubando-se a membrana bloqueada por 24 horas com uma solução contendo o anticorpo primário monoclonal de mioglobina (desenvolvido em rato) na proporção 1:1000 em solução de 1% de leite desnatado em tampão TBS-T. A membrana foi então lavada por três vezes com solução tampão de TBS-T e incubada a temperatura ambiente por duas horas com uma solução contendo o anticorpo secundário (horseradish peroxidase-conjugado, desenvolvido em rato e purificado por afinidade contra IgG de rato, na proporção de 1:2000; GE Healthcare, Little Chalfont, UK). As membranas foram então reveladas monitorando-se a quimiluminescência em um sistema ECL-plus (GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização espectrofotométrica da Mioglobina

Inicialmente, determinou-se o espectro de absorção dos estados de oxidação metmioglobina e oximioglobina, como ilustra a figura 12. Nota-se pela análise do espectro eletrônico que a metmioglobina absorve nos comprimentos de onda com máximos centrados em 406 nm e 525 nm, enquanto que a oximioglobina apresenta máximo de absorção centrado em 418, 544 e 582 nm.

Figura 12 - Espectros eletrônicos de absorção da metmioglobina ($C = 1,65 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e oximioglobina ($C = 1,18 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão fosfato 50 mmol L^{-1} e pH 7,4.

3.2. Desativação do estado singlete excitado da riboflavina pelas heme-proteínas da carne vermelha

3.2.1 Fluorescência no estado estacionário

A concentração de riboflavina utilizada foi determinada através de espectroscopia no UV-vis utilizando-se um coeficiente de absorvidade molar no valor de $10.645 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e comprimento de onda máximo centrado em 436 nm [13]. Foram utilizadas concentrações de riboflavina entre 1 e $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para obtenção de valores de absorbância entre 0,1 e 0,2. A faixa de concentração das proteínas foi especificada levando-se em consideração o efeito de filtro interno, ou seja, a sobreposição espectral entre a absorção e a fluorescência, a qual causa uma supressão da emissão de radiação luminosa total. Para tanto, verificou-se a absorção da metmioglobina e da oximioglobina em 446 nm, como ilustra a figura 13, respectivamente, e então se determinou a concentração de proteína, cuja absorção é, no mínimo, duas vezes menor que a absorção da riboflavina no mesmo comprimento de onda.

Figura 13 - Espectros de absorção eletrônica da a) metmioglobina e b) oximioglobina, a temperatura ambiente, para as diversas concentrações indicadas na legenda da Figura.

Nota-se que, no caso da oximioglobina, o efeito de filtro interno é bastante intenso, o que interfere significativamente nos resultados experimentais para elevadas concentrações de proteína. Para que a absorção da proteína fosse duas vezes menor que a absorção da riboflavina, é necessário utilizar concentrações extremamente baixas de oximioglobina, $< 2 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹, o que dificultaria na exatidão do experimento. Desta forma, não foi possível determinar de forma confiável a desativação do estado singlete da riboflavina pela oximioglobina por fluorescência no estado estacionário.

Para as soluções contendo metmioglobina, estipulou-se uma concentração de riboflavina de $1 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹ e variou-se o supressor de 0,0 a $1,5 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹ a fim de evitar o efeito de filtro interno. A supressão de fluorescência do estado singlete da riboflavina foi então monitorada em diferentes temperaturas: 15, 25 e 35 °C, e a constante de supressão foi calculada por meio da equação de Stern-Volmer (Equação 5), Figura 14.

Os valores obtidos foram: $5,27 \cdot 10^{12}$ mol L⁻¹ s⁻¹ para a temperatura de 15 °C, $4,84 \cdot 10^{12}$ mol L⁻¹ s⁻¹ para a temperatura de 25 °C, e $3,30 \cdot 10^{12}$ mol L⁻¹ s⁻¹ para a temperatura de 35 °C. Estes resultados estão acima do esperado para reações bimoleculares controladas por difusão em meio aquoso, o que significa que o processo de desativação do estado singlete excitado ocorre em meio confinado e que o fluoróforo e o supressor estão em contato próximo, ou seja, há uma grande contribuição do modo de supressão estático.

Figura 14 - Espectros de emissão de fluorescência da riboflavina na presença de crescentes concentrações de metmioglobina em diferentes temperaturas a) 15 °C, b) 25 °C, e c) 35 °C em companhia do ajuste linear da equação de Stern-Volmer com os dados experimentais.

Através da comparação das constantes de supressão, 1k_q , para as diferentes temperaturas, nota-se que, conforme a temperatura é elevada, o valor da constante de

supressão diminui proporcionalmente ao aumento da temperatura, Figura 15, o que sugere um processo de supressão estática, isto é, há formação de um complexo.

Figura 15 – Gráficos de Stern-Volmer obtidos para a supressão de fluorescência da riboflavina com crescentes concentrações de mioglobina em três diferentes temperaturas.

O número de supressores ligados ao fluoróforo e a constante de associação (K_a) de formação de complexo, também foram calculados através da linearização da equação 7, figura 16, e estão expostos na tabela 2 para as três condições de temperatura [6].

$$\log \frac{I_0 + I}{I} = \log K_a + n \times \log [Q] \quad (\text{Equação 7})$$

Onde,

I é a intensidade de fluorescência da solução com o supressor;

I_0 é a intensidade de fluorescência da solução sem o supressor;

K_a é a constante de associação;

n é o número de supressores ligados ao fluoróforo;

Q é a concentração do supressor.

Figura 16 – Linearização da equação de Stern-Volmer para cálculo da constante de associação (K_a) e número de sítios de ligação.

Tabela 2 - Valores das constantes de associação (K_a) entre a riboflavina e a mioglobina, e razão estequiométrica do número de ligantes por sítio de ligação para diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Constante de Associação - K_a (L mol ⁻¹)	Número de sítios de ligação (n)
15	$9,1 \pm 1 \cdot 10^4$	$0,84 \pm 0,01$
25	$1,2 \pm 1 \cdot 10^4$	$0,97 \pm 0,01$
35	$4,5 \pm 1 \cdot 10^3$	$1,12 \pm 0,01$

Os valores reportados na Tabela 2 demonstram que a formação do complexo riboflavina-metmioglobina é exotérmica e assim favorecida a 15 °C já que a constante de associação nesta temperatura é de $9,1 \cdot 10^4$ L mol⁻¹ e pouco favorecida a 35 °C, com uma constante de $4,5 \cdot 10^3$ L mol⁻¹.

Além disso, nota-se que existe apenas uma riboflavina por sítio de ligação na proteína, independente da temperatura investigada, ou seja, a estequiometria da reação é 1:1, podendo ser representada pela seguinte reação:

3.2.2. Termodinâmica da formação do complexo riboflavina-metmioglobina

Os cálculos referentes aos parâmetros termodinâmicos da formação do complexo $\text{Rib}(\text{MbFe(III)})_n$ foram realizados com base nos dados reportados na Tabela 2 e de acordo com a equação de Van't Hoff, figura 17, resultando em $\Delta H^\circ = -112 \pm 22 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $\Delta S^\circ = -296 \pm 75 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$.

Estes dados demonstram que a reação de complexação entre a metmioglobina e a riboflavina é exotérmica e que a supressão estática é maior em baixa temperatura, o que é comum observar em interações de caráter hidrofóbico. A diminuição na entropia também sugere uma interação hidrofóbica forte sem envolvimento significativo do solvente, visto que o anel de isoaloxazina da riboflavina é hidrofóbico sugere-se então que a complexação ocorra em região de sítio hidrofóbico da metmioglobina.

Figura 17. Ajuste linear da equação de Van't Hoff

3.2.3. Fluorescência resolvida no tempo

A análise de fluorescência resolvida no tempo confirmou os resultados de fluorescência obtidos anteriormente. A figura 18 mostra a supressão do estado singlete da riboflavina pela metmioglobina. Nota-se que, mesmo aumentando a concentração de proteína em solução, nenhuma mudança no número de contagens é observada entre as diferentes soluções, assim como os tempos de vida de cada uma delas se mantêm constante, em torno de 4,8 ns, Tabela 3. Estes dados confirmam a supressão como sendo majoritariamente estática entre fotossensibilizador e supressor, ou seja, há formação de um complexo riboflavina-metmioglobina no estado fundamental.

Figura 18 - Decaimento de fluorescência da riboflavina e das soluções com o supressor metmioglobina em diferentes concentrações.

Tabela 3 – Tempos de vida do estado singlete para a solução de riboflavina e para as misturas de fluoróforo e como supressor a metmioglobina.

Solução	τ_2 (ns)
Riboflavina ($C = 1,7 \cdot 10^{-5}$ M)	4,8
Rib + MetMb ($C = 1,5 \cdot 10^{-6}$ M)	4,8
Rib + MetMb ($C = 3,0 \cdot 10^{-6}$ M)	4,8
Rib + MetMb ($C = 7,0 \cdot 10^{-6}$ M)	4,8

Experimentos similares foram também realizados para verificar a supressão do estado singlete da riboflavina pela oximioglobina e a mesma tendência foi observada, figura 19. Não houve diferença entre o número de contagens de cada solução, mesmo com o aumento da concentração do supressor. Os tempos de vida permaneceram constantes, em torno de 4,8, tabela 4, o que resulta em uma supressão estática com formação de um complexo riboflavina-oximioglobina.

Figura 19 - Decaimento de fluorescência da riboflavina e das soluções com o supressor oximioglobina em diferentes concentrações.

Tabela 4 - Tempos de vida do estado singlete para a solução de riboflavina e para as misturas de fluoróforo e supressor oximioglobina.

Solução	τ_2 (ns)
Riboflavina ($C = 1,7 \cdot 10^{-5}$ M)	4,8
Rib + OxiMb ($C = 3,5 \cdot 10^{-6}$ M)	4,8
Rib + OxiMb ($C = 7,0 \cdot 10^{-6}$ M)	4,8

3.4. Desativação do estado tripleto excitado da riboflavina pela mioglobina

3.4.1. Fotólise por pulso de laser

A técnica de fotólise por pulso de laser acoplado à detecção de transientes por absorção eletrônica foi utilizada para verificar a interação das proteínas com o estado tripleto da riboflavina. Para tanto, adicionou-se o supressor de forma gradativa à solução de riboflavina e observou-se a variação no seu tempo de vida.

Os gráficos da figura 20 ilustram o comportamento do fotossensibilizador na presença da metmioglobina e da oximioglobina. Nota-se uma diminuição do tempo de vida do estado tripleto da riboflavina proporcional ao aumento da concentração de proteína (metmioglobina e oximioglobina).

Figura 20 – Curvas de decaimento da absorção em 720 nm, referentes ao estado tripleto da riboflavina em função de crescentes concentrações de a) metmioglobina e b) oximioglobina .

A constante de velocidade de decaimento do estado tripleto da riboflavina seguiu uma cinética de primeira-ordem e a constante de velocidade de pseudo primeira ordem observada foi encontrada como dependente da concentração de mioglobina e, a partir da regressão linear da equação $k_{\text{obs}} = k_0 + k_2[\text{Q}]$, obtivemos um valor de $k_2 = 3,1 \pm 0,4 \cdot 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para a metmioglobina e $k_2 = 3,0 \pm 0,5 \cdot 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para a oximioglobina.

Estes valores, próximos ao limite de difusão, juntamente com o fato da riboflavina no estado tripleto ser um forte oxidante ($E^0 = 1,77 \text{ V vs. NHE}$; $\tau = 15 \mu\text{s}$) indicam que sua reação com os diferentes estados de oxidação da mioglobina ocorre através de um mecanismo de transferência de elétrons.

Figura 21 – Gráfico de k_{obs} versus $[\text{Q}]$ para o cálculo da constante de supressão do estado tripleto da riboflavina pela a) metmioglobina e b) oximioglobina.

A partir da regressão linear do gráfico de k_{obs} vs. concentração de mioglobina, e de acordo com a equação $k_{\text{obs}} = k_0 + k_2[Q]$, as constantes de velocidade de segunda-ordem de reação do estado tripleto da riboflavina de $k_2 = 3,1 \pm 0,4 \cdot 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para a metmioglobina e $k_2 = 3,0 \pm 0,5 \cdot 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para a oximioglobina em solução tampão pH 7.4 e temperatura de 25 °C foram calculadas. A riboflavina no estado tripleto é um forte oxidante ($E^0 = 1,77 \text{ V vs. NHE}$; $\tau = 15 \mu\text{s}$) e sua reação com os diferentes estados de oxidação da mioglobina ocorre através um mecanismo de transferência de elétrons entre a cadeia de aminoácidos da proteína para a ^3Rib , assim como o reportado nas outras reações entre a ^3Rib e outros compostos solúveis em água, como, por exemplo, doadores de elétrons.

3.5. Caracterização dos fotoprodutos

3.5.1. Espectroscopia no Uv-vis

A concentração de riboflavina em solução foi estipulada como sendo cinco vezes maior que a da proteína a fim de evitar interferências da mioglobina com relação à absorção em 436 nm. Os espectros eletrônicos destes compostos na proporção definida podem ser visualizados nas figuras 22 e 23.

Figura 22 – Espectro eletrônico de absorção de uma solução $2,67 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de riboflavina na presença de $8,35 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de metmioglobina em tampão fosfato 50 mmol L^{-1} e pH 7,4.

Figura 23 – Espectro eletrônico de absorção de uma solução $3,90 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de riboflavina na presença de $4,55 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de oximioglobina em tampão fosfato 50 mmol L^{-1} e pH 7,4.

Em ambos os casos, o espectro eletrônico da mistura riboflavina-metmioglobina ou riboflavina-oximioglobina não apresentou alteração significativa com o aumento do tempo de irradiação da solução. Mesmo a solução sem oxigênio apresentou o mesmo perfil espectral com nenhuma alteração significativa na absorbância com relação à amostra de controle, figura 24.

Este fato fortalece o indicativo que a reação ocorre na superfície da proteína, isto é, entre o estado tripleto da riboflavina com mioglobinas ocorre na cadeia polipeptídica e não no centro metálico, grupo heme, promovendo a formação de *cross-link*.

Tendo em vista que o triptofano é um aminoácido apolar, presente não somente no cálice hidrofóbico da proteína, mas também em sua superfície, conclui-se que, muito provavelmente, ele seja o responsável por reagir com a riboflavina ocasionando a oxidação da mioglobina.

Figura 24 – Espectros eletrônicos de absorção da solução a) riboflavina-metmioglobina e b) riboflavina-oximioglobina em diferentes tempos de irradiação.

3.5.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em gel foi utilizada com o intuito de monitorar o produto da reação entre o estado tripleto da riboflavina com a heme-proteína.

De acordo com a figura 25, a formação de *cross-link* ocorre, com maior intensidade, quando da irradiação de luz com comprimento de onda de 436 nm (3 e 4). Observa-se também produtos com menor massa molecular, o que significa uma fragmentação da cadeia polipeptídica e, conseqüentemente, degradação da heme-proteína.

É importante notar que quando da presença do DMPO (5,5-dimetilpirrolidina-N-óxido) na solução irradiada tanto a formação de *cross-link*. Isso acontece pois o DMPO reage rapidamente com o estado tripleto da riboflavina, que é um bi radical, impedindo sua reação com a cadeia polipeptídica da proteína e diminuindo a fragmentação e a formação de *cross-link*.

Esta informação fortalece os indícios de envolvimento da formação de radicais na cadeia polipeptídica no processo de fotodegradação.

Figura 25. Perfil do SDS-PAGE em tampão aquoso pH 7,4 contendo: 1) $8 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ de mioglobina e $30 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ de riboflavina mantidas no escuro; 2) $8 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ de mioglobina, $30 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ de riboflavina e $30 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹ de DMPO mantidos no escuro; 3) $8 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ de mioglobina e $30 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ de riboflavina expostos a luz no comprimento de onda de 436 nm durante 1 hora; 4) $8 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ de mioglobina, $30 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ de riboflavina, e $30 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹ de DMPO expostos a luz no comprimento de onda de 436 nm durante 1 hora.

3.5.3. Western Blotting

A técnica de Western-Blotting foi utilizada com o intuito de confirma a degradação da metmioglobina pela reação com o estado tripleto da riboflavina, figura 26. Observa-se claramente durante a irradiação, com luz azul (436 nm), a mioglobina é degradada (cerca de 70 % nas condições experimentais utilizadas) pela formação do estado tripleto da riboflavina, fortalecendo os indícios da ocorrência da desativação química do estado tripleto da riboflavina pela mioglobina através de um processo de transferência de elétrons e formação do radical da proteína com posterior decaimento via fragmentação.

Figura 26. Perfil do gel Western-blotting e intensidade das bandas para uma solução aquosa com pH 7,4 contendo $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de mioglobina e $30 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de riboflavina. Coluna esquerda: amostra mantida no escuro. Coluna direita: amostra exposta à radiação luminosa com comprimento de onda de 436 nm durante 1 hora.

4. Conclusão

A mioglobina em seus diferentes estados de oxidação, metmioglobina e oximioglobina, é sensível a irradiação luminosa, porém apenas a luz na região do UV é importante para sua direta fotooxidação. A riboflavina pode, portanto, oxidar as espécies de mioglobina, fato este demonstrado pelos resultados cinéticos de fotólise por pulso de laser e espectroscopia de transientes com velocidades de reação competitivas com outros substratos presentes na carne.

Esse processo de oxidação ocorre via transferência de elétrons da cadeia polipeptídica para o estado tripleto da riboflavina levando à formação de cross-link e fragmentação da proteína. Como as reações ocorrem na superfície da proteína, o grupo heme não é afetado, portanto a riboflavina não tem influência no processo de descoloração dos produtos cárneos, apenas em suas condições nutricionais, o que pode ser prevenido através de embalagens que absorvem no UV e impedem a transmissão de radiação luminosa nesta região.

5. Referências Bibliográficas

[1] DAMORADAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artmed, 2010.

[2] NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. [S.I.]: Artmed, 2010.

[3] Fundação Centro de Estudos do Comércio e do Exterior – Funcex. Disponível em: <http://www.funcex.org.br/>. Acesso em: fev. 2013.

[4] United States Department of Agriculture – USDA. Livestock and Poultry: **World Markets and Trade**. Disponível em: <http://usda01.library.cornell.edu/usda/fas/livestock-poultry-ma//2010s/2012/livestock-poultry-ma-10-18-2012.pdf>. Acesso em: fev. 2013.

[5] HUVAERE, K.; CARDOSO, D. R.; HOMEM-DE-MELLO, P.; WESTERMANN, S.; SKIBSTED, L. H. Light Induced Oxidation of Unsaturated lipids as Sensitized by Flavins. **J. Phys. Chem. B**, vol. 114, p. 5583-5593, 2010.

[6] KAMAT, B. P.; SEETHARAMAPPA, J.; MELWANKI, M. B. Spectroscopic studies on the interaction of riboflavin with bovine serum albumine. **Indian J. of Biochem. Biophys.**, vol. 41, p. 173-178, 2004.

[7] SOUZA, A. C. S.; FERREIRA, C. V.; JUCÁ, M. B.; AOYAMA, H. Riboflavina: Uma vitamina Multifuncional. **Química Nova**, vol. 28, n. 5, p. 887-891, 2005.

[8] CARDOSO, D. R.; FRANCO, D. W.; OLSEN, K. Reactivity of Bovine Whey Proteins, Peptides, and Amino Acids toward Triplet Riboflavin as Studied by Laser Flash Photolysis. **J. Agric. Food Chem.**, vol. 52, p. 6602-6606, 2004.

[9] MOREIRA, E. M. R. **Determinação da riboflavina por voltametria com adsorção**. 1999. Tese (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

[10] HUANG, R. **Kinetics and effects of riboflavin photosensitized degradation on soymilk flavor stability**. 2006. Tese (Doutorado em Filosofia) - Graduate School, The Ohio State University.

- [11] HUANG, R.; CHOE, E.; MIN, D. B. Kinetics for singlet oxygen formation by riboflavin photosensitization and the reaction between riboflavin and singlet oxygen. **J. of Food Science**, vol. 69, p. 726-732, 2004.
- [12] TANG, X.; CRONIN, D. A.; BRUNTON, N. P. A simplified approach to the determination of thiamine and riboflavin in meats using reverse phase HPLC. **J. of Food Comp. and Analysis**, vol. 19, p. 831-837, 2006.
- [13] KOZIOL, J. Studies on flavins in organic solvents-I. Spectral characteristics of riboflavin, riboflavin tetrabutylate and lumichrome. **Photochemistry and Photobiology**, vol. 5, p. 41-54, 1966.
- [14] LU, C.; BUCHER, G.; SANDER, W. Photoinduced Interactions Between Oxidized and Reduced Lipoic Acid and Riboflavin (Vitamin B2). **ChemPhysChem**, vol. 5, p. 47-56, 2004.
- [15] HUVAERE, K.; SKIBSTED, L. H. Light-Induced Oxidation of Tryptophan and Histidine. Reactivity of Aromatic N-Heterocycles toward Triplet-Excited Flavins. **J. Am. Chem. Soc.**, vol. 131, p. 8049-8060, 2009.
- [16] HUVAERE, K.; NIELSEN, J. H.; BAKMAN, M.; HAMMERSHØJ, M.; SKIBSTED, L. H.; SØRENSEN, J.; VOGNSEN, L.; DALSGAARD, T.K. Antioxidant Properties of Green Tea Extract Protect Reduced Fat Soft Cheese against Oxidation Induced by Light Exposure. **J. os Agric. and Food Chem.**, vol. 59, p. 8718-8723, 2011.
- [17] PRIYADARSHINI, M.; SHAHNAWAZ, M.; BANO, B. Aggregation and Inactivation of Pancreatic Cystatin by Riboflavin-Derived Singlet Oxygen and Flavin Triplet State: Polyphenols as Preventive Agents. **J. Biochem. Mol. Toxicology**, vol. 26, 2012.
- [18] CARDOS, D. R.; HOMEM-DE-MELLO, P.; OLSEN, K.; SILVA, A. B.; FRANCO, D. W.; SKIBSTED, L. H. Deactivation of Triplet-Excited Riboflavin by Purine Derivatives: Important Role of Uric Acid in Light-Induced Oxidation of Milk Sensitized by Riboflavin. **J. Agric. Food Chem.**, p. 3679-3684, 2005.
- [19] LUND, M. N.; HEINONEN, M.; BARON, C. P.; ESTÉVEZ, M. Protein oxidation in muscle foods: A review. **Mol. Nutr. Food Res.**, vol. 55, p. 83-95, 2011.
- [20] DALSGAARD, T. K.; NIELSEN, J. H.; BROWN, B. E.; STADLER, N.; DAVIES, M. J. Dityrosine, 3,4-Dihydroxyphenylalanine (DOPA), and Radical Formation from Tyrosine Residues on Milk Proteins with Globular and Flexible Structures as a Result of Riboflavin-Mediated Photo-oxidation. **J. of Agr. and Food Chem.**, vol. 59, p. 7939-7947, 2011.

- [21] PAN, Y.-L.; PINNICK, R. G.; HILL, S. C.; NILES, S.; HOLLER, S.; BOTTIGER, J. R.; WOLF, J.-P.; CHANG, R. K. Dynamics of photon-induced degradation and fluorescence in riboflavin microparticles. **Appl. Phys. B**, vol. 72, p. 449-454, 2001.
- [22] HONGWEI, Z.; MIN, G.; ZHAOXIA, Z.; WENFENG, W.; GUOZHONG, W. Spectroscopic studies on the interaction between riboflavin and albumins. **Spectrochimica Acta Part A**, vol. 65, p. 811-817, 2006.
- [23] SUMAN, S.; JOSEPH, P.; LI, S.; STEINKE, L.; FONTAINE, M. Primary structure of goat myoglobin. **Meat Science**, vol. 82, p. 456-460, 2009.
- [24] WITTENBERG, J. B.; WITTENBERG, B. A. Myoglobin function reassessed. **The J. of Exp. Bio.**, vol. 206, p. 2011-2020, 2003.
- [25] VOET, D.; VOET, J. G. Bioquímica. [S.I.]: Artmed, 2006.
- [26] BERG, J. M.; TYMOCKZO, J. L.; STRYER, L. Bioquímica. [S.I.]: Guanabara Koogan, 2008.
- [27] BARON, C. P.; ANDERSEN, H. J. Myoglobin-Induced Lipid Oxidation. A Review. **J. of Agric. and Food Chem.**, vol. 50, p. 3887-3897, 2002.
- [28] CARLSEN, C. U.; MOLLER, J. K. S.; SKIBSTED, L. H. Heme-iron in lipid oxidation. Coordination Chemistry Reviews. **Coordination Chemistry Reviews**, vol. 249, p. 485-498, 2005.
- [29] FREDERIKSEN, A. M.; LUND, M. N.; ANDERSEN, M. L.; SKIBSTED, L. H. Oxidation of Porcine Myosin by Hypervalent Myoglobin: The role of Thiol Groups. **J. Agric. Food Chem.**, vol. 56, p. 3297-3304, 2008.
- [30] MOREIRA, L. M.; MORAES, P. C. G.; MENDONÇA, J. P. R.; GUIMARÃES, L.; LYON, J. P.; AIMBIRE, F.; POLI, A. L.; IMASATO, H. Hemoglobina extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus*: um extraordinário sistema supramolecular hemoproteico. **Química Nova**, vol. 34, p. 119-130, 2011.
- [31] DAVIES, M. J.; DEAN, R. T. **Radical-mediated protein oxidation: from chemistry to medicine**: From Chemistry to Medicine. [S.I.]: Oxford University Press, 2003.

[32] PATTINSON, D. I.; RAHMANTO, A. S.; DAVIES, M. J. Photo-oxidation of proteins. **Photochemical & Photobiology Sci.**, v. 11, p. 38-53, 2012.

[33] LACOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. New York: Plenum, 1999, p. 238-380.

[34] TURRO, N. J. **Modern Molecular Photochemistry**. California: University Science Books, 1978, p. 296-324.

[35] LUND, M. N.; LUXFORD, C.; SKIBSTED, L. H.; DAVIES, M. J. Oxidation of myosin by haem proteins generates myosin radicals and protein cross-links. **Biochem. J.**, vol. 410, p. 565-574, 2008.

[36] ANDERSEN, H. J.; SKIBSTED, L. H. Kinetics and Mechanism of Thermal Oxidation and Photooxidation of Nitrosylmyoglobin in Aqueous Solution. **J. Agric. Food Chem.**, vol. 40, p. 1741-1750, 1992.

[37] LEE, S.; PHILIPS, A. L.; LIEBLER, D. C.; FAUSTMAN, C. Porcine oxymyoglobin and lipid oxidation in vitro. **Meat Science**, vol. 63, p. 241-247, 2003.

[38] BROWN, W. D.; MEBINE, L. B. Autoxidation of Oxymyoglobins. **The J. of Biological Chem.**, vol. 244, p. 6696-6701, 1969.

[39] BOWEN, W. J. The Absorption Spectra and Extinction Coefficients of Myoglobin. **J. Biol. Chem.**, vol. 179, p. 235-245, 1949.

[40] YAMAZAKI, I.; YOKOTA, K. -N.; SHIKAMA, K. Preparation of Crystalline Oxymyoglobin from Horse Heart. **The J. of Biol. Chem.**, vol. 239, 1964.