UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

JULIANA FRACOLA DA SILVA

**Processamento UV-C de proteínas do soro do leite: Efeitos na
estrutura e digestibilidade**

São Carlos

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**PROCESSAMENTO UV – C DE PROTEÍNAS DO SORO LEITE:
EFEITOS NA ESTRUTURA E DIGESTIBILIDADE**

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

Juliana Fracola da Silva

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
Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso

São Carlos

2019

Dedico este trabalho aos meus pais, Silvia e Tadeu, e ao meu irmão Gustavo, pelo amor e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso pela dedicada orientação e paciência.

Aos meus pais Silvia e Tadeu, pela dedicação, por lutarem incessantemente para que eu tivesse uma vida melhor, investirem e apoiarem a minha educação. Tudo que sou e tenho devo a vocês, que são exemplo e inspiração.

Ao meu irmão Gustavo que me ensina a ter coragem e disciplina para vencer a mim mesma e procurar ser uma pessoa melhor.

Ao meu namorado Jean, pelo apoio nos momentos difíceis, alegria que preenche meus dias e generosidade que me inspira.

A minha amiga Aline, por me inspirar a ser melhor, pelos conselhos e auxílio nos experimentos deste trabalho.

A minha amiga Larissa, que me incentivou a iniciar essa jornada e me ajudou a completá-la com mais leveza.

Aos meus familiares e amigos, por me darem suporte sempre.

Aos colegas do Grupo de Química Inorgânica e Analítica, especialmente a Jéssica, Marcella, Luiz, e Felipe pela amizade e auxílio nos experimentos.

Aos queridos amigos do laboratório da cachaça, especialmente ao Lucas, pelo carinho e amizade.

As técnicas Silmara e Jennifer pela paciência e pelo suporte oferecido neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Júlio César Borges e ao Grupo LBBP, pela estrutura fornecida na realização da espectroscopia por CD e gel filtração analítica. Agradeço especialmente a Vanessa, Silvia, Noeli e Amanda, pelo auxílio e disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Frank N. Crespilho, Grupo de Bioeletroquímica e Interfaces, especialmente Lucyano, pela estrutura fornecida na realização do FTIR – ATR.

Aos funcionários do IQSC e da USP São Carlos.

Ao CNPQ pela concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

SILVA, Juliana Fracola. **Processamento UV-C de proteínas do soro do leite: Efeitos na estrutura e digestibilidade**. 2019. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

O aumento na expectativa de vida e rápido crescimento da proporção de idosos gera desafios e oportunidades quando se trata de condições fisiológicas relacionadas ao envelhecimento. A sarcopenia, perda de massa e resistência muscular, é uma doença comum entre a população sênior e está associada com a baixa ingestão e digestibilidade de nutrientes. Assim, a indústria de laticínios busca desenvolver novos produtos que atendam a demanda nutricional diária de idosos e ainda que tenham características sensoriais específicas para eles. No caso dos produtos derivados do leite sabe-se que as proteínas majoritárias do soro (α -lactoalbumina e β -lactoglobulina) têm sua digestão incompleta e apresentam potencial alergênico, podendo contribuir para um déficit nutricional. Neste contexto, este trabalho objetivou investigar os efeitos do tratamento com luz UV-C (266 nm) na estrutura da α -lactoalbumina e β -lactoglobulina e o impacto nas suas digestibilidades. As proteínas irradiadas por 2 h com luz monocromática (266 nm) foram submetidas à digestão gástrica *in vitro* simulando adultos jovens e idosos. As alterações na estrutura das proteínas foram estudadas por técnicas espectroscópicas (UV-Vis, CD-UV, FTIR, RMN ^1H e fluorescência), cromatografia líquida, e eletroforese (SDS-PAGE). Observou-se modificações na estrutura secundária e terciária da β -lactoglobulina, redução de pontes de dissulfeto, e formação do fotoproduto N-formilquinurenina (NFK). A irradiação aumentou a digestibilidade desta proteína em 50 pontos percentuais para idosos e 25 pontos percentuais para adultos jovens. Além disso, o perfil de peptídeos liberados após digestão para α -lactoalbumina e β -lactoglobulina tratadas com luz UV-C é diferente em comparação do perfil de peptídeos da proteína nativa.

Palavras-chave: luz UV-C, proteínas do soro, digestibilidade, α -lactoalbumina, β -lactoglobulina

ABSTRACT

SILVA, Juliana Fracola. UV-C **Processing of milk whey proteins: Effects on structure and digestibility**. 2019. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

The worldwide increasing proportion of senior citizen is a major concern due to age-related condition. Sarcopenia is defined as the loss of muscle mass and function and is closely associated with malnutrition and decline of nutrient intake in elderly. Dairy industry has the potential to tailor products that may provide the intake of the required daily nutritional value combined with sensory characteristics with seniors as target market. However, the major whey proteins (α -lactalbumin and β -lactoglobulin) exhibit incomplete digestion leading to a decrease in the nutritional value and can cause allergies. In this context, this work aimed to investigate the effects of UV-C light treatment (266 nm) on protein structure and the impact on digestibility. Proteins were irradiated for 2 h with monochromatic light (266 nm) and then submitted to gastric digestion *in vitro* simulating health adults and elderly. In order to analyze the changes in the protein structure, spectroscopic techniques (UV-Vis, CD-UV, FTIR, ^1H NMR, and fluorescence), liquid chromatography, and electrophoresis (SDS-PAGE) were employed. Changes in the secondary and tertiary structure of β -lactoglobulin, reduction of its disulfide bridges and formation of N'-Formylkynurenine as a photoproduct (NFK) were observed. These changes increased the digestibility of light irradiated protein by 50 percentage points for elderly and 25 percentage points for health adults. In addition, the peptide profile released after protein digestion is different for light treated proteins in comparison to native protein.

Key Words: whey protein, digestibility, α -lactalbumin, β -lactoglobulin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Proporção de idosos acima de 60 anos, por país, em 2015 e projeção do crescimento da população idosa para 2050.	1
Figura 2: Esquematização dos estados oligoméricos da β -lactoglobulina (BLG) em diferentes pHs.	4
Figura 3: Estrutura tridimensional da β -lactoglobulina de leite bovino, com destaque para os aminoácidos que absorvem luz na região do UV-C: tirosina, em rosa; triptofano, em vermelho; cisteína e pontes de dissulfeto, em amarelo; β -folhas são destacadas em azul e α -hélice em laranja.	5
Figura 4: Estrutura tridimensional da α -lactoalbumina de leite bovino, com destaque para os aminoácidos que absorvem luz na região do UV-C: tirosina em rosa; triptofano em vermelho; pontes de dissulfeto em amarelo; β -folhas são destacadas em azul e α -hélice em laranja. Em verde representa-se o átomo de cálcio ligado a proteína.	6
Figura 5: Proximidade espacial evolutivamente conservada na β -lactoglobulina entre o Trp 61, em vermelho, e a ponte de dissulfeto Cys 160 – Cys 66, em amarelo. O Trp é o vizinho preferencial de pontes de dissulfeto. A excitação da cadeia lateral do Trp por luz UV – C pode causar ejeção de um elétron e levar a clivagem da ponte de dissulfeto.....	12
Figura 6: Fluxograma do procedimento de exposição das amostras proteicas à luz na região do UV – C (266 nm) por 2 h, posterior análise estrutural e digestão.	17
Figura 7: Ilustração do princípio envolvido nas medidas usando ATR. a) Feixe incidente no cristal. b) Reflexão do feixe evanescente em um limite virtual entre amostra e cristal.	21
Figura 8: Sequência de pulso Presat realizada pelo equipamento de RMN	24
Figura 9: Fluxograma descritivo do processo de digestão estática in vitro, mimetizando a digestão de adultos jovens e idosos.	26
Figura 10: Espectros eletrônicos de absorção no UV da β -lactoglobulina 49,6 μ M, onde β -Lg_NI representa a amostra não irradiada, β -Lg_I representa a proteína irradiada por 2 h em 266 nm (fluxo de fótons = $1,97 \cdot 10^{-10}$ einstein s^{-1} , i.e. 337 W m^{-2}), em tampão fosfato 0,01M, pD = 6,8 e I = 0,16 M de NaCl e o possível fotoproduto de irradiação, N-formil-quinurenina, que possui máximo de absorção em 322 nm.	29
Figura 11: Espectros eletrônicos de absorção no UV da α -lactoalbumina 58,6 μ M, onde α -La _NI representa a amostra não irradiada, α -La _I representa a proteína irradiada por 2 h e 266	

nm (fluxo de fótons = $1,16 \cdot 10^{-10}$ einstein s^{-1} , i.e. 200 W m^{-2}), em tampão fosfato 0,01M, pD = 6,8 e I = 0,16 M de NaCl e o possível fotoproduto de irradiação, NFK. 30

Figura 12: Espectro de emissão de fluorescência intrínseca do triptofano para amostras de β -lactoglobulina 98,4 μM , onde $\beta\text{-Lg_NI}$ representa a amostra não irradiada e $\beta\text{-Lg_I}$ a amostra irradiada com luz UV-C (266 nm) por 2 h em tampão fosfato 0,01M, pD = 6,8 e 0,16 M de NaCl 32

Figura 13: Espectro de emissão de fluorescência intrínseca do triptofano para amostras de α -lactoalbumina 96,2 μM , onde $\alpha\text{-La_NI}$ representa a amostra não irradiada e $\alpha\text{-La_I}$ a amostra irradiada por 2 h (266 nm) em tampão fosfato 0,01M, pD = 6,8 e 0,16 M de NaCl..... 33

Figura 14: Espectros de FTIR na região da amida I, de $1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$, da β -lactoglobulina 98,4 μM não irradiada ($\beta\text{-Lg_Ni}$) e irradiada por 2 h em 266 nm ($\beta\text{-Lg_I}$) em tampão fosfato 0,01M, pD = 6,8 e I = 0,16 M de NaCl. 34

Figura 15: Espectros de FTIR na região da amida I, de $1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$, da α -latoalbumina, 124,5 μM , não irradiada ($\alpha\text{-La_Ni}$) e irradiada ($\alpha\text{-La_I}$) por 2 h em 266 nm e em tampão fosfato 0,01 M, pD = 6,8 e I = 0,16 M de NaCl. 36

Figura 16: Espectro de dicroísmo circular no UV distante da proteína β -lactoglobulina 6,52 μM , em tampão fosfato 0,01 M, pD = 6,8 e I = 0,16 M de NaCl, onde $\beta\text{-Lg_NI}$ representa a amostra não irradiada, $\beta\text{-Lg_I}$ representa a amostra irradiada por 2 h utilizando comprimento de onda de 266 nm. 38

Figura 17: Espectro de CD no UV distante da proteína α -lactoalbumina na concentração de 8,4 μM , em tampão fosfato 0,01M, pD = 6,8 e I = 0,16 M de NaCl, onde $\alpha\text{-La_NI}$ representa a amostra não irradiada, $\alpha\text{-La_I}$ representa a amostra irradiada por 2 h em 266 nm. 39

Figura 18: Espectro de dicroísmo circular no UV próximo da proteína β -lactoglobulina na concentração de 98,4 μM , em tampão fosfato 0,01M, pD = 6,8 e I = 0,16 M de NaCl, onde $\beta\text{-Lg_NI}$ representa a amostra não irradiada e $\beta\text{-Lg_I}$ representa a amostra irradiada por 2 h em 266 nm. 41

Figura 19: Espectro de dicroísmo circular no UV próximo da proteína α -Lactoalbumina na concentração de 58,6 μM , em tampão fosfato 0,01M, pD = 6,8 e I = 0,16 M de NaCl, onde $\alpha\text{-La_NI}$ representa a amostra não irradiada e $\alpha\text{-La_I}$ representa a amostra irradiada por 2 h na região do UV-C (266 nm)..... 42

Figura 20: A) Perfil eletroforético da β -Lactoglobulina não irradiada ($\beta\text{-Lg_Ni}$) e da triplicata de irradiação por 2 h (266 nm) ($\beta\text{-Lg_1}$, $\beta\text{-Lg_2}$, $\beta\text{-Lg_3}$) 49,2 μM . B) Perfil eletroforético

da α -lactoalbumina 62 μ M não irradiada (α -La_Ni) e da triplicata de irradiação por 2 h (266 nm).	43
Figura 21: Reação do DTNB com tióis livres acessíveis ao solvente em proteínas e formação do TNB ²⁻ , produto amarelo e facilmente quantificável por espectroscopia no UV-Vis, em 412 nm.	44
Figura 22: Concentração de tióis livres formados a partir da exposição da β -lactoglobulina a luz UV-C (266 nm, 2 h), onde β -Lg_Ni representa a amostra não irradiada e β -Lg_1, β -Lg_2 e β -Lg_3 representam a triplicata da amostra irradiada por 2 h.	45
Figura 23: Proximidade espacial entre o triptofano 61 (W 61) e tirosina 42 (Y 42) da ponte de dissulfeto C66 – C160.	46
Figura 24: Espectros de ¹ H RMN da β -lactoglobulina na concentração de 98,4 μ M, em tampão fosfato 0,01M, pD = 6,8 e I = 0,16 M de NaCl, onde β -Lg_Ni representa a amostra não irradiada e β -Lg_I representa a amostra irradiada por 2 h em 266 nm. 1 representa a região de deslocamentos químicos da Tyr102 e Phe105.....	48
Figura 25: Espectros de ¹ H RMN da proteína α -lactoalbumina na concentração de 58,6 μ M, em tampão fosfato 0,01M, pD = 6,8 e I = 0,16 M de NaCl, onde α -La_Ni representa a amostra não irradiada e α -La_I representa a amostra irradiada por 2 h em 266 nm.	49
Figura 26: A) Perfil de eluição das proteínas padrão, onde 1 é a BSA (66 kDa), 2 é a anidrase carbônica (29 kDa), 3 é o citocromo C (12,4 kDa) e 4 a apoproteína (6,5 kDa). β -Lg_Ni representa a proteína não irradiada e β -Lg_I a proteína irradiada por 2 h com luz UV-C (266 nm). B) Raio de Stokes da β -Lactoglobulina. C) Massa molecular aparente da β -Lactoglobulina.....	51
Figura 27: A) Perfil de eluição das proteínas padrão, onde 1 é a BSA (66 kDa), 2 é a anidrase carbônica (29 kDa), 3 é o citocromo C (12,4 kDa) e 4 a apoproteína (6,5 kDa). α -La_Ni representa a proteína não irradiada e α -La_I a proteína irradiada por 2 h com luz UV-C (266 nm). B) Raio de Stokes da α -lactoalbumina. C) Massa molecular aparente da α -lactoalbumina.	52
Figura 28: A) Cromatograma da β -lactoglobulina 9,8 μ M mantida como controle (β -Lg_Ni), β -Lg não irradiada digerida mimetizando condições gástricas de adultos (β -Lg_Ni_Adultos) e idosos (β -Lg_Ni_Idosos), β -Lg irradiada (β -Lg_I) e digerida mimetizando condições gástricas de adultos (β -Lg_I_Adultos) e idosos (β -Lg_I_Idosos). B) Destaque para mudanças no perfil cromatográfico, onde # representa picos que diferem entre β -Lg_Ni_Adultos e	

β -Lg_I_Adultos, o quadrado amarelo representa a similaridade entre β -Lg_Ni_Idosos e β -Lg_I_Idosos e os pontos (●) representam mudanças entre β -Lg_Ni_Idosos e β -Lg_Ni_Adultos. 54

Figura 29: Cromatograma da α -lactoalbumina mantida como controle (α -La_Ni) 12 μ M, α -La não irradiada digerida mimetizando condições gástricas de adultos (α -La_Ni_Adultos) e idosos (α -La_Ni_Idosos), α -La irradiada (α -La_I) e irradiada e digerida mimetizando condições gástricas de adultos (α -La_I_Adultos) e idosos (α -La_I_Idosos). Os símbolos # representam os picos com perfis diferentes entre si..... 56

Lista de Tabelas

Tabela 1: Estimativa da demanda energética apresentada pelos diferentes tipos de processamento de alimentos para diminuição bacteriana de 5 log em suco de maçã.	7
Tabela 2: Coeficientes de absortividade molar (ϵ) no comprimento de onda de 266 nm (λ_{266}) para os principais aminoácidos reativos frente a radiação luminosa na região do UV – C (266 nm).	8
Tabela 3: Atribuições dos tipos de estrutura secundária proteica em D ₂ O às frequências da banda da amida I deconvolvida.	21
Tabela 4: Proteínas padrão e suas respectivas massas moleculares e raio hidrodinâmico (raio de Stokes)	24
Tabela 5: Composição salina do fluido salivar simulado (SSF) e fluido gástrico simulado (SGF)	26
Tabela 6: Comprimentos de onda de absorção dos principais produtos de fotooxidação em proteínas, N-formilquinurenina e quinurenina, fotoprodutos do triptofano e ditirosina, fotoproducto da tirosina.	28
Tabela 7: Quantificação da estrutura secundária a partir das frequências na região da amida I do espectro de FTIR – ATR. β -Lg_I representa a solução proteica irradiada por 2 h em 266 nm e β -Lg_Ni representa o controle não irradiado, ambas em tampão fosfato 0,01M, pD = 6,8 e I = 0,16 M de NaCl.	35
Tabela 8: Quantificação da estrutura secundária a partir das frequências na região da amida I do espectro de FTIR – ATR. α -La_I representa a solução proteica irradiada por 2 h em 266 e α -La_Ni representa o controle não irradiado, ambas em tampão fosfato 0,01 M, pD = 6,8 e I = 0,16 M de NaCl.	37
Tabela 9: Quantificação relativa da estrutura secundária da solução controle de β -lactoglobulina (β -Lg_NI) e a média das amostras irradiadas por 2 h (β -Lg_I) em 266 nm, ambas em tampão fosfato 0,01 M, pD = 6,8, I = 0,16 NaCl em D ₂ O. Deconvolução realizada pelo software CDNN.....	38
Tabela 10: Quantificação relativa da estrutura secundária da solução controle de α -Lactoalbumina (α -La_Ni) e a média das amostras irradiadas por 2 h (α -La_I), ambas em tampão fosfato 0,01 M, pD = 6,8, I = 0,16 NaCl em D ₂ O. Deconvolução realizada pelo software CDNN.	40

Tabela 11: Deslocamento químico dos prótons em proteínas	47
--	----

Lista de Abreviações

WHO	do inglês <i>World Health Organization</i>
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
Cys	Cisteína
Phe	Fenilalanina
Lys	Lisina
Asp	Aspartato
Glu	Glutamato
Leu	Leucina
Ile	Isoleucina
Pro	Prolina
Ser	Serina
Asn	Asparagina
IgE	Imunoglobulina E
BSA	do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
PEF	do inglês <i>Pulsed Electric Field</i>
HHP	do inglês <i>High Hydrostatic Pressure</i>
UF	do inglês <i>Ultrafiltration</i>
ISC	do inglês <i>Inter System Crossing</i>
PDB	do inglês <i>Protein Data Bank</i>
FTIR – ATR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier por
reflexão total atenuada	
UV – Vis	Ultravioleta – Visível
SDS – PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato
de sódio	
CD	do inglês <i>Circular Dichroism</i>
HPLC	do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
UV-C	Luz na região do ultravioleta de 200 - 280 nm
SSF	do inglês <i>Simulated Salivary Fluid</i>

SGF	do inglês <i>Simulated Gastric Fluid</i>
IDR	Índice de Digestão Relativo
NFK	N-formilquinurenina
β -Lg	β -Lactoglobulina
α -La	α -Lactoalbumina

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	Estrutura e digestibilidade das principais proteínas do soro do leite (β -lactoglobulina α -lactalbumina).....	3
1.2.	Modificações estruturais induzidas em proteínas por radiação luminosa no UV – C (200 – 280 nm) 7	
2.	OBJETIVOS.....	15
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1.	Reagentes	16
3.2.	Preparação da solução de β -lactoglobulina e α -lactoalbumina.....	16
3.3.	Determinação da concentração analítica.....	16
3.4.	Exposição das amostras proteicas à luz na região do UV – C.....	17
3.4.1.	Actinometria Química.....	18
3.5.	Análise conformacional das amostras proteicas	19
3.5.1.	Espectroscopia eletrônica de absorção no UV – Visível	19
3.5.2.	Fluorescência intrínseca do triptofano no estado estacionário.....	20
3.5.3.	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier por reflexão total atenuada (ATR – FTIR).....	20
3.5.4.	Espectroscopia por Dicroísmo Circular no UV.....	22
3.5.5.	Elektroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE) 22	
3.5.6.	Quantificação de tióis livres acessíveis.....	23
3.5.7.	Ressonância Magnética Nuclear	23
3.5.8.	Cromatografia por exclusão molecular analítica.....	24
3.6.	Digestão <i>in vitro</i> das proteínas majoritárias do soro do leite (β -lactoglobulina e α -lactoalbumina) 25	
3.6.1.	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	27
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	28
4.1	Análise conformacional proteica.....	28
4.1.1	Espectroscopia eletrônica de absorção no UV – Visível.....	28

4.1.2	Fluorescência intrínseca do triptofano no estado estacionário	31
4.1.3	Análise da estrutura secundária proteica por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier por reflexão total atenuada (ATR – FTIR)	33
4.1.4.	Espectroscopia por Dicroísmo Circular	37
4.1.6	Quantificação de Tióis Livres.....	43
4.1.7	Ressonância Magnética Nuclear ^1H	47
4.1.8	Cromatografia de exclusão molecular analítica.....	49
4.2	Análise da digestão <i>in vitro</i> das proteínas do soro do leite por HPLC	53
5.	CONCLUSÃO.....	58
6.	REFERÊNCIAS	59
	ANEXO I	65

1. INTRODUÇÃO

Segundo a *World Health Organization* a população mundial acima de 60 anos representará 22% da população total em 2050. Estima-se que em 2020 a população mundial sênior será maior que a população de crianças abaixo de 5 anos de idade. No Brasil o número de idosos acima de 60 anos representará entre 10 e 30 % da população total em 2050 (WHO, 2018). Nos Estados Unidos o número de pessoas acima de 85 anos passará de 5,8 milhões em 2010 para 19 milhões em 2050 (VICENTE e VELKOFF, 2010). Essa elevada taxa de crescimento da quantidade de idosos gera preocupações, desafios e oportunidades relacionados a economia, saúde e desenvolvimento social, sendo identificado como uma preocupação mundial em termos de saúde pública (LEVI *et al.*, 2017). Muitas condições fisiológicas estão associadas ao envelhecimento, como, osteoporose, mudanças nas funções gastrointestinais, cerebral, cardiovascular e metabólica, mudanças nas percepções sensoriais, sarcopenia, etc. Ademais, o processo de envelhecimento também acarreta mudanças sociais, psicológicas e, conseqüentemente, econômicas (RÉMOND *et al.*, 2015).

Figura 1: Proporção de idosos acima de 60 anos, por país, em 2015 e projeção do crescimento da população idosa para 2050.

(CONTINUA)

(CONCLUSÃO)

Fonte: Adaptado de *World Report on Ageing and Health*, 2015.

A sarcopenia é definida pelo *European Working Group on Sarcopenia in Older People* como a perda progressiva de massa muscular, força e resistência física que diminui drasticamente a qualidade de vida e a capacidade dos idosos de realizar atividades básicas diárias (BEAUDART *et al.*, 2017; DEUTZ *et al.*, 2012). Além da importância dos músculos para a realização de atividades diárias, eles desempenham relevante papel no metabolismo proteico e saúde como um todo. Os músculos são essenciais em estados de estresse, como em caso de lesões, e a quantidade de massa e força muscular é inversamente proporcional ao desenvolvimento de doenças crônicas (RÉMOND *et al.*, 2015). O consumo diário de proteínas acima do mínimo indicado atualmente (0,8 g/kg/d) pode ser eficiente no sentido de manter a massa e função muscular em idosos (HOUCHINS *et al.*, 2016; INSTITUTE OF MEDICINE OF THE NATIONAL ACADEMIES, 2005). Entretanto, apenas aumentar a quantidade de proteína na dieta diária de idosos não se mostra completamente eficiente, sendo necessário melhorar a capacidade de absorção dessas macromoléculas e a qualidade dos aminoácidos biodisponíveis, que são chaves para o anabolismo muscular (COOPER *et al.*, 2016).

Um dos principais produtos de consumo diário de idosos e da população em geral, que possui alto índice proteico e é eficiente no tratamento e prevenção da sarcopenia, é o leite e seus derivados. O leite é composto de 86,6 % de água, 4,1 % de lipídeos, 5,0 % de lactose e 3,6 % de proteínas, além de ser fonte de íons cálcio e vitaminas (FENNEMA, DAMODARAN e PARKIN, 2008, p. 886-897). As principais proteínas presentes no leite são classificadas como caseínas (α_{S1} -caseína, α_{S2} -caseína, β -caseína e κ -caseína), representando 80 % do total de proteínas, e proteínas do soro do leite (β -lactoglobulina, α -lactalbumina, albumina do soro bovino, lactoferrina, entre outras), que representam os 20 % restantes (FENNEMA, DAMODARAN e PARKIN, 2008, p. 295). Não obstante, a β -lactoglobulina, principal proteína do soro, não é facilmente digerida, conferindo a este produto alto potencial alergênico, baixa biodisponibilidade de aminoácidos e déficit na qualidade nutricional do leite. Em vista disso, faz-se cada vez mais importante para a indústria o desenvolvimento de produtos adaptados a faixas etárias, saudáveis, funcionais e que ainda mantenham características organolépticas agradáveis aos consumidores (CASTILLO-SANTAELLA *et al.*, 2014).

Do ponto de vista industrial e econômico, o aproveitamento das proteínas do soro é de grande valor. Dependendo do tipo de queijo produzido, aproximadamente 6 g de proteínas do soro são drenadas para cada litro de leite utilizado. Isto equivale a aproximadamente 60 g de proteínas do soro por 1 kg de muçarela produzido (ATAMER *et al.*, 2013)

1.1. Estrutura e digestibilidade das principais proteínas do soro do leite (β -lactoglobulina α -lactalbumina)

Um litro de leite contém de 30 a 36 g de proteínas, as quais são de grande importância nutricional e como ingrediente para a indústria de alimentos. Entretanto, este produto apresenta grande potencial alergênico devido à indigestibilidade gástrica de proteínas como β -lactoglobulina e α -lactoalbumina e peptídeos bioativos (caseína-morfina) advindos da proteólise da β -caseína variante A₁. A β -lactoglobulina, que corresponde a 9 % do total de proteínas do leite e 50 % das proteínas do soro de leite bovino, é responsável por aproximadamente 80% dos casos de alergia e tem seu valor nutricional diminuído devido à rígida estrutura terciária e grande estabilidade conformacional em baixos pHs, o que dificulta a digestão (CASTILLO-SANTAELLA *et al.*, 2014; RAHAMAN *et al.*, 2017).

A Figura 2 ilustra a estrutura quaternária da β -lactoglobulina em diferentes pHs. No pH do leite fresco ($\sim 6,6$) a β -Lg encontra-se em sua forma dimérica, onde duas moléculas estão ligadas por β -fitas antiparalelas e dois *loops* interagindo não covalentemente por ligações de hidrogênio. No pH em que ocorre o processo de digestão gástrica ($\text{pH} < 3,5$) e pHs alcalinos ($\text{pH} > 7,5$), a proteína é um monômero estável. Em baixos valores de pH ($\text{pH} < 3,5$) seu monômero assume uma conformação compacta com cálice fechado, enquanto em altos valores de pH ($\text{pH} > 7,5$) seu monômero apresenta-se com o cálice aberto (KURPIEWSKA et al., 2019). Em $3,5 < \text{pH} < 5,2$, a β -lactoglobulina encontra-se na forma de um octâmero (BELITZ, GROSCH e SCHIEBERLE, 2009, p. 511). Dessa maneira, seu estado oligomérico é suscetível a mudanças em diferentes pHs e isto influencia o comportamento da β -lactoglobulina durante o processo de digestão gástrica.

Figura 2: Esquematisação dos estados oligoméricos da β -lactoglobulina (BLG) em diferentes pHs.

Na Figura 3 está a estrutura tridimensional da β -lactoglobulina, uma proteína globular da família das lipocalinas, com estrutura composta por um β -barril, uma β -folha externa a esse motivo, uma α -hélice e quatro segmentos de α -hélice dispostos na superfície da proteína. A β -lg possui massa molar de 18,4 kDa, 162 resíduos de aminoácidos. A β -lg possui ponto isoelétrico (pI), pH no qual a proteína possui carga elétrica líquida zero, igual a 4,8. Como consequência da estrutura em β -barril há formação de um bolsão hidrofóbico, ao qual está atribuído a função proteica, e onde podem se ligar uma grande variedade de pequenas moléculas hidrofóbicas tais como o retinol e ácidos graxos. A β -lactoglobulina, em sua estrutura primária, possui uma cisteína livre (Cys121), duas pontes de dissulfeto (Cys66 – Cys160 e Cys119 – Cys106), dois triptofanos (Trp61 e Trp19) e quatro tirosinas (Tyr99, Tyr42, Tyr102 e Tyr20), que são aminoácidos particularmente investigados quando se quer compreender as mudanças na estrutura primária e secundária da proteína (BROWNLOW *et al.*, 1997; FENNEMA, DAMODARAN e PARKIN, 2008, p. 900).

Além da dificuldade de digestão relacionada a estabilidade em baixos pHs, a estrutura terciária nativa da β -lactoglobulina (Figura 3) dificulta sua digestão, pois, os aminoácidos hidrofóbicos, que são sítio de clivagem típico de proteases digestivas, encontram-se

predominantemente no interior da estrutura em β -barril impedindo o acesso e clivagem por essas enzimas, principalmente a pepsina. Com isso, tem-se uma digestão proteica inapropriada, fazendo com que a proteína chegue quase intacta ao intestino e cause uma resposta imunológica (IgE), diminuindo a quantidade e qualidade de peptídeos bioativos (PERAM *et al.*, 2013). Essa resistência à digestão, que causa alergia e diminui o valor nutricional, ocorre principalmente em crianças e idosos, pois, estes grupos têm a função gástrica diminuída (UNTERSMAYER, E., JENSEN-JAROLIM, E., 2008; MANDALARI *et al.*, 2009). A baixa digestibilidade da β -lactoglobulina e, em menor extensão, da α -lactoalbumina pode ser associada a desnutrição em idosos, que acarreta e agrava várias doenças e diminui a absorção de importantes peptídeos bioativos como anti-hipertensivo, opioide, imunomodulador e antibacteriano (LEVI *et al.*, 2017). Novas tecnologias de processamento não térmico podem ser eficientes no aumento da digestibilidade das proteínas do soro do leite, uma vez que podem modificar a estrutura proteica e dos epítomos alergênicos ou expô-los às proteases digestivas (CASTILLO-SANTAELLA *et al.*, 2014).

Figura 3: Estrutura tridimensional da β -lactoglobulina de leite bovino, com destaque para os aminoácidos que absorvem luz na região do UV-C: tirosina, em rosa; triptofano, em vermelho; cisteína e pontes de dissulfeto, em amarelo; β -folhas são destacadas em azul e α -hélice em laranja.

Fonte: Figura gerada com o *software* Chimera utilizando o código de identificação 1BEB depositado no *Protein Data Bank*

A α -lactoalbumina é outra proteína majoritária do soro do leite, responsável por aproximadamente 50 % dos casos de alergia a esse produto. É uma metaloproteína globular com íons de cálcio, Figura 4, tem grande similaridade à estrutura da lisozima. A α -La tem massa molecular de 14,2 kDa, 123 aminoácidos e possui pI igual a 4,8. Sua estrutura terciária é dividida em um grande domínio helicoidal e um pequeno domínio folha- β com uma fenda separando-os. O domínio helicoidal contém três α -hélices e duas 3_{10} -hélices. O domínio β -folha é composto de três β -fitas antiparalelas e uma 3_{10} -hélice. Um íon Ca^{2+} se coordena com grande afinidade a um sítio composto por 10 resíduos de aminoácidos e organizado em um *loop* que liga os dois domínios, onde oxigênios de cadeias laterais de resíduos de Asp 82, 87 e 88 e carbonilas de Lys 79 e Asp 84 são os pontos de coordenação. A coordenação do íon de cálcio tem papel importante no enovelamento proteico e juntamente com as pontes de dissulfeto colaboram para a estabilidade estrutural da haloproteína. A α -La possui quatro ligações de dissulfeto, quatro triptofanos e quatro tirosinas. Além disso, ela tem importante função nas células mamárias secretoras, pois, modifica a galactosil transferase convertendo-a em lactose-sintase, que catalisa a biossíntese de lactose. (BELITZ, GROSCH e SCHIEBERLE, 2009, p. 512, FENNEMA, DAMODARAN e PARKIN, 2008; PERMYAKOV e BERLINER, 2000).

Figura 4: Estrutura tridimensional da α -lactoalbumina de leite bovino, com destaque para os aminoácidos que absorvem luz na região do UV-C: tirosina em rosa; triptofano em vermelho; pontes de dissulfeto em amarelo; β -folhas são destacadas em azul e α -hélice em laranja. Em verde representa-se o átomo de cálcio ligado a proteína.

Fonte: Figura gerada com o *software* Chimera utilizando o código de identificação 1F6S depositado no *Protein Data Bank*

1.2. Modificações estruturais induzidas em proteínas por radiação luminosa no UV – C (200 – 280 nm)

O processamento térmico de produtos lácteos é comumente aplicado na indústria alimentícia, visando aumentar o tempo de prateleira, inativar proteínas e conferir segurança microbiológica. Entre estes tipos de processamento estão pasteurização, esterilização, secagem e vaporização. Entretanto, estes tratamentos têm alto custo energético e problemas referentes a perda de calor durante o processo (PEREIRA e VICENTE, 2010). Além disso, podem afetar características organolépticas e nutricionais do produto, por exemplo, degradação das vitaminas e polifenóis sensíveis a temperatura, modificando cor ou sabor dos alimentos (ZHANG, 2018). Uma estimativa da demanda energética da pasteurização, principal tratamento térmico empregado hoje, é descrita na Tabela 1.

Novas tecnologias de processamento não térmico têm surgido a fim de satisfazer a demanda dos consumidores por alimentos *fresh-like*, ou seja, menos processados e com alto valor nutricional, e ainda atender as necessidades da indústria que busca processos de menor demanda energética e com menor tempo de processamento. Alguns dos tratamentos não térmicos capazes de inativar microrganismos e ainda manter características organolépticas dos produtos são: pulso de campo elétrico (PEF), alta pressão hidrostática (HHP), ultra filtração (UF) e luz contínua na região do UV-C (200 – 280 nm) (PEREIRA e VICENTE, 2010). Na Tabela 1, está a demanda energética das principais tecnologias de processamento não térmico.

Tabela 1: Estimativa da demanda energética apresentada pelos diferentes tipos de processamento de alimentos para diminuição bacteriana de 5 log em suco de maçã.

Tipo de Tratamento	Capacidade (L s ⁻¹)	Condição de processamento	Demanda Energética (kJ/kg)
Pulso de Campo Elétrico (PEF)	0,670	25 kV/cm × ~50 °C × 50 μs	137,2
Alta Pressão Hidrostática (HHP)	1,25	500 MPa × 40 °C × 180 s	283,5
Ultra filtração (UF)	1,0	0,02 μm, 1,474 kPa, 5 L m ⁻² s ⁻¹	0,028
Luz na região do UV-C (200 – 280 nm)	1,1	1,56 kW × 25 °C × 89 s	5,2
Pasteurização	1,0	71,6 °C, 6 s	180,4

Fonte: Adaptado de RODRIGUEZ-GONZALES *et al.*, 2015.

Outro impacto oriundo do processamento térmico extensivo, principalmente em produtos lácteos, é a desnaturação e agregação irreversível de proteínas, como a β-lactoglobulina, o que pode

limitar ainda mais sua digestibilidade (WIJAYANTI, BANSAL e DEETH, 2014). Diante disso, é de interesse desenvolver novas tecnologias de processamento que sejam capazes de modificar proteínas de forma seletiva e específica. Uma alternativa para este problema é o processamento não térmico com luz contínua na região do UV – C (200 – 280 nm), que já é utilizado como agente bactericida. Este tipo de processamento não térmico é uma grande oportunidade tecnológica quando aplicado a produtos proteicos com o objetivo de destruir microrganismos presentes no produto, aumentar a estabilidade de alimentos e, principalmente, desenvolver produtos lácteos com funcionalidade dirigida (SIDDIQUE *et al.*, 2016).

Na literatura há diversos relatos demonstrando que a interação da luz UV – C (200 – 280 nm) com proteínas é capaz promover alterações nas propriedades dessas biomoléculas. Os principais aminoácidos responsáveis pela interação com luz nessa região são fenilalanina, triptofano, tirosina e pontes de dissulfeto (Tabela 2) (HAYWOOD *et al.*, 2013). Cada proteína tem uma fotoreatividade intrínseca devido à quantidade, conformação e localização destes cromóforos. Proteínas globulares e compactas, tais como a β -lactoglobulina e α -lactoalbumina, são mais fotoreativas que proteínas com estrutura predominantemente randômica. Isso ocorre, pois, os grupos reativos, como pontes de dissulfeto e triptofanos, estão espacialmente mais próximos e, quando foto-excitados facilitam as reações de transferência de elétrons.

Tabela 2: Coeficientes de absorvidade molar (ϵ) no comprimento de onda de 266 nm (λ_{266}) para os principais aminoácidos reativos frente a radiação luminosa na região do UV – C (266 nm).

Aminoácido	$\epsilon_{(266\text{ nm})} (\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$
Tirosina	938,6
Triptofano	4434,5
Pontes de dissulfeto	199,5
Fenilalanina	94,7

Fonte: Adaptado de HILARIO *et al.*, 2017

Muitos processos podem decorrer da absorção de luz por proteínas, porém, as consequências estão em torno de alguns efeitos principais: agregação, desenovelamento, fragmentação, carbonilação, ionização, formação de radicais e fotoprodutos derivados de aminoácidos específicos (ESPINOZA e MERCADO-URIBE, 2016). Essas modificações conformacionais proteicas induzidas por radiação luminosa no UV – C (200 – 280 nm) são resultado de modificações em ligação de hidrogênio, cadeias laterais de aminoácidos, interações

hidrofóbicas e/ou iônicas. Além disso, os efeitos da incidência de luz dependem das espécies foto-excitadas formadas, da natureza do fotosensibilizador, do comprimento de onda utilizado na excitação e das condições nas quais a reação ocorre (MANZOCCO, 2015). Neste contexto, as fotoreações em proteínas acontecem por duas vias principais: 1. Fotooxidação direta consequente da absorção de radiação luminosa pelo substrato; 2. Fotooxidação mediada por oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) (fotosensibilização do Tipo II) ou fotosensibilização do Tipo I (CARDOSO, LIBARDI e SKIBSTED, 2012).

Entre os principais fotoprodutos reportados na interação de luz UV – C com proteínas, estão:

- i) Ditirosina, fotoproduto da tirosina;
- ii) N-formil-quinurenina e quinurenina, fotoproduto do triptofano;
- iii) Formação de carbonilas, principalmente em resíduos de metioninas e cisteínas;
- iv) Clivagem de pontes de dissulfeto.

Triptofano

Estudos reportam dois mecanismos de relaxação não radioativa para o estado singleto excitado do triptofano. O primeiro é a ejeção de elétron para o solvente (e_{aq}^-) e formação do cátion radical $\text{Trp}^{\bullet+}$, como descrito na Equação 1a. Este cátion radical sofre desprotonação, levando a formação do radical neutro $\text{Trp}^\bullet$ ($\tau = 23,9 \mu\text{s}$ em meio aquoso a 298 K) (Equação 1b) que pode então reagir com oxigênio molecular, Tyr e pontes de dissulfeto. O segundo mecanismo de relaxação se dá por cruzamento intersistemas (ISC), gerando o estado tripleto excitado ^3Trp (Equação 2a), que pode reagir com oxigênio molecular (Equação 2b) ou transferir elétrons para uma ponte de dissulfeto próxima, gerando um $\text{Trp}^{\bullet+}$ e o ânion radical $\text{RSSR}^{\bullet-}$ (Equação 2c) (NEVES-PETERSEN *et al*, 2009).

Fonte: adaptado de NEVES-PETERSEN *et al.*, 2009.

A Equação 3 ilustra os dois principais fotoprodutos do triptofano que podem ser formados durante o tratamento com luz na região do UV – C (200 – 280 nm). A formação N-formilquinurenina, que pode gerar quinurenina via hidrólise, ocorre segundo mecanismo descrito na Equação 1. Inicialmente, o cátion radical ($\text{Trp-H}^{\bullet+}$) se desprotona levando a formação de radicais indolil ($\text{Trp}^{\bullet}$) que pode reagir com O_2 formando um radical peroxila. Este radical pode gerar intermediários dioxetano ou hidroperóxido na posição C3 que se decompõem aos dois fotoprodutos principais do triptofano, que são fotosensibilizadores mais efetivos que o Trp e passíveis de gerar espécies reativas capazes de oxidar outras estruturas (PATTISON, RAHMANTO e DAVIES, 2012).

Fonte: Adaptado de PATTISON, RAHMANTO e DAVIES, 2012

Tirosina

A tirosina quando fotoexcitada pode sofrer cruzamento intersistema (ISC) para o estado triplete, mecanismo pelo qual a maioria dos processos fotoquímicos ocorre para este aminoácido. Em pH neutro a tirosina pode ser fotoionizada por um processo bifotônico, envolvendo a absorção de um segundo fóton pelo estado triplete (Equação 4a). Este processo resulta em um elétron solvatado e um cátion radical $\text{Tyr-OH}^{\bullet+}$, que prontamente se desprotona formando o radical neutro $\text{Tyr-O}^{\bullet}$ (Equação 4b). O estado triplete da tirosina também pode ser rapidamente suprimido por oxigênio molecular ou resíduos próximos, como Trp e pontes de dissulfeto.

Fonte: adaptado de NEVES-PETERSEN *et al.*, 2009.

Um dos principais fotoprodutos da tirosina é a ditirosina (Equação 5). A Tyr foto-excitada gera por ISC o estado triplete excitado (^3Tyr), que por sua vez, forma o radical neutro fenoxila ($\text{Tyr-O}^\bullet$). Este radical fenoxila pode sofrer reação de acoplamento levando a formação de ditirosina e consequentemente *cross-link* (CORREIA *et al.*, 2012).

Fonte: Adaptado de PATTISON, RAHMANTOA e DAVIES, 2012.

Pontes de dissulfeto

A redução de pontes de dissulfeto pode ocorrer por absorção direta de luz UV – C (200 – 280 nm) ou pela transferência direta de elétrons da cadeia lateral de Tyr ou Trp foto-excitados espacialmente próximo a ponte. Neste último caso, o estado triplete de um triptofano transfere elétron diretamente para a ligação de dissulfeto, formando um ânion radical ($\text{RSSR}^{\bullet-}$) e ocasionando a quebra da ponte (Equação 6c e 6d). Os elétrons solvatados resultantes da excitação de aminoácidos aromáticos podem se recombinar com sua molécula parental ou serem capturados por espécies eletrofílicas tais como oxigênio molecular, gerando o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) ou com pontes de dissulfeto, como demonstrado na Equação 6a, 6b e 6c. A captura deste elétron (e_{aq}^-) solvatado pela ponte de dissulfeto produz um ânion radical ($\text{RSSR}^{\bullet-}$) que se fragmenta em tiolato (RS^-) e um radical tiila ($\text{RS}^\bullet$) (Equação 6e). Além disso, o ânion radical tiila pode se recombinar com oxigênio molecular gerando o radical tiol peroxila ($\text{RSOO}^\bullet$) que, por sua vez, pode se isomerizar a um radical sulfonila ($\text{RS(=O)O}^\bullet$), levando a formação de ácido sulfínico (RSO_2H) ou sulfônico (RSO_3H), Equação 6f.

Fonte: Adaptado de NEVES-PETERSEN *et al.*, 2009.

A quebra de pontes de dissulfeto por transferência direta de um elétron proveniente de um aminoácido aromático excitado é um mecanismo comum. Este processo é de curto alcance e depende da proximidade entre aminoácidos aromáticos (doadores de elétrons) e cistinas (aceptoras). Sendo assim, sua probabilidade de ocorrência decai exponencialmente com o aumento da distância entre os átomos. As proteínas evoluíram mantendo as pontes de dissulfeto e aminoácidos aromáticos espacialmente próximos (Figura 5). Essas pontes de dissulfeto também são supressoras de estados excitados de resíduos aromáticos contribuindo para estabilidade e atividade proteica. (NEVES-PETERSEN, GAJULA e PETERSEN, 2011).

Figura 5: Proximidade espacial evolutivamente conservada na β -lactoglobulina entre o Trp 61, em vermelho, e a ponte de dissulfeto Cys 160 – Cys 66, em amarelo. O Trp é o vizinho preferencial de pontes de dissulfeto. A excitação da cadeia lateral do Trp por luz UV – C pode causar ejeção de um elétron e levar a clivagem da ponte de dissulfeto.

Fonte: Adaptado de ilustração apresentada por NEVES-PETERSEN, GAJULA e PETERSEN, 2011

A fotoquímica de proteínas apresenta muitas oportunidades e, por isso, é uma área amplamente investigada. Entretanto, pouco ainda se sabe sobre os efeitos da irradiação das proteínas do soro do leite com luz UV-C contínua. Alguns trabalhos abordam os efeitos de luz na região do UV-C (200-280 nm) na β -lactoglobulina, porém pouquíssimo ainda se sabe, especialmente para a α -lactoalbumina. Um estudo realizado por KEHOE *et al.*, 2008 investiga, empregando técnicas espectroscópicas, as mudanças que ocorrem na β -lactoglobulina após 24 h de exposição à luz UV-C, utilizando comprimento de onda de 254 nm. Seu objetivo neste estudo foi verificar a desnaturação proteica e comparar estes resultados com a β -lg desnaturada via aquecimento. Verificou-se neste estudo que há quebra de pontes de dissulfeto, desnaturação, agregação e fotoxidação do triptofano levando a formação da N-formilquinurenina. Porém, estes efeitos são consequência das condições de irradiação, procedimento que foi extensivamente aplicado (24 h) e não são reportados dados de rendimento quântico e proposta mecanística.

Estudos realizados por KRISTO, HAZIZAJ e CORREDIG, 2012, também demonstram o efeito da luz UV-C (254 nm) em solução proteica contendo β -lactoglobulina e a α -lactoalbumina utilizando um reator UV tipo Taylor-Couette, em fluxo. Este trabalho buscou investigar o efeito na estrutura das proteínas após o tratamento e os efeitos na pepsinólise proteica. Entretanto, não é possível distinguir em qual das proteínas as mudanças na estrutura terciária e quaternária ocorreram, bem como alterações verificadas na acessibilidade a tióis livres e fotoxidação de aminoácidos aromáticos. Além disso, não foram reportados dados de rendimento quântico.

O trabalho de WU *et al.*, 2018, também buscou compreender as mudanças na estrutura da β -lactoglobulina após exposição à luz UV- C (254 nm) por 15 e 30 min e compará-las ao resultado obtido após tratamento por ultrassom e com a proteína não tratada. Nesse sentido, os autores avaliaram o efeito dessas modificações na atividade oxidante/antioxidante da proteína. Foi verificado aumento na estrutura- β e na quantidade de sulfidrilas livre e diminuição na quantidade de estrutura randômica e α -hélice da β -lactoglobulina irradiada. O autor verificou também aumento atividade antioxidante. É possível perceber que alguns estudos buscaram investigar os efeitos da luz na região do UV-C (200-280 nm), porém não são reportados dados de rendimento quântico e informação sistemática que propicie a proposta de um mecanismo. Além disso, não há um estudo da digestibilidade das proteínas do soro seguindo parâmetros que mimetizem a digestão em adultos

e a compare com a digestão gástrica de idosos a fim de, mais tarde, aplicar estes conhecimentos no processamento de alimentos.

Sabe-se que produtos lácteos podem fornecer grande variedade de micronutrientes, lipídeos e proteínas de valor nutricional importante para o envelhecimento saudável e manutenção da saúde da população como um todo. Considerando as condições associadas ao envelhecimento e alergia ao leite, procura-se, com este trabalho explorar o potencial tecnológico deste produto por meio de tecnologias de processamento não térmico. Neste sentido, objetiva-se proporcionar um melhor entendimento das modificações promovidas por luz UV-C (200-280 nm) nas proteínas majoritárias do soro do leite e investigar os efeitos destes tratamentos na digestão de adultos e idosos a fim de, mais tarde, obter alimentos atraentes para os consumidores, com alta digestibilidade proteica para idosos e baixo potencial alergênico.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo proporcionar maior entendimento a respeito das modificações promovidas por luz na região do UV-C (266 nm) na estrutura das proteínas majoritárias do soro do leite (β -lactoglobulina e α -lactoalbumina). Além disso, este estudo tem a intenção de investigar o impacto dessas mudanças estruturais na digestão gástrica *in vitro* dessas proteínas, mimetizando as condições digestivas encontradas em idosos e jovens adultos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

β -lactoglobulina de leite bovino comercial contendo as variantes A e B na forma de pó cristalino com pureza > 90% (Sigma Aldrich); α -lactoalbumina tipo I de leite bovino (holoproteína) na forma de pó cristalino com pureza > 85 % (Sigma Aldrich); kit de padrões de peso molecular proteico para cromatografia por exclusão de tamanho analítica (Sigma Aldrich); fosfato de sódio monobásico e dibásico, ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), óxido de deutério (D₂O), poliacrilamida/bis-acrilamida 29:1, ácido fórmico, dodecil sulfato de sódio, persulfato de amônia, azul de bromofenol, Brilliant Blue R e cloreto de sódio, todos de grau analítico (Sigma Aldrich); ácido etilenodiaminico tetra-acético (EDTA) de grau analítico (Acros Organics); acetonitrila grau HPLC (Panreac).

3.2. Preparação da solução de β -lactoglobulina e α -lactoalbumina

As proteínas foram solubilizadas na concentração de 2 mg mL⁻¹ em tampão fosfato 0,01M, pD = 6,8 e força iônica igual a 0,16 M de NaCl, usando D₂O como solvente. A concentração analítica foi realizada segundo o descrito no item 3.3. O pH da solução foi medido em eletrodo padrão e o pD foi obtido pela soma de 0,4 a este valor (LEFÈVRE e SUBIRADE, 1999). A amostra foi dividida em alíquotas de 2,5 mL e posteriormente irradiada conforme descrito no item 3.4.

3.3. Determinação da concentração analítica

A concentração analítica das soluções proteicas foi calculada por meio de espectroscopia de absorção eletrônica utilizando o valor de absortividade molar de $\epsilon_{280\text{nm}}=1,76 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para a β -lactoglobulina e $\epsilon_{280\text{nm}}= 2,846 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para a α -lactoalbumina (GILL e HIPPEL, 1989). A solução foi acondicionada a cubetas de quartzo (Hellma GmbH & Co.KG) de caminho ótico igual a 1 cm e a absorbância em 280 nm medida em espectrofotômetro modelo Multiskan GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) com temperatura controlada igual a $25,0 \pm 0,2$ °C. A concentração proteica foi calculada pela lei de Lambert – Beer, expressa pela equação 7:

$$A = c \times l \times \epsilon \quad (7)$$

Onde A é a absorbância em 280 nm em unidades arbitrárias, c a concentração analítica da amostra proteica em mol L^{-1} , l o caminho ótico utilizado na medida em cm e ϵ o coeficiente de absortividade molar em $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

3.4. Exposição das amostras proteicas à luz na região do UV – C

As amostras de β -lactoglobulina e α -lactoalbumina passaram pelo mesmo procedimento experimental. As condições de processamento com luz UV-C (266 nm) foram definidas a partir de experimentos com tempo de irradiação variando de 1 – 30 min, 1 h, 1 h 30 min e 2 h. As análises espectroscópicas foram realizadas para todos os tempos de irradiação, obtendo-se melhores resultados para 2 h, sendo esta a condição definida para irradiação.

Inicialmente alíquotas de 2,5 mL e concentração igual a 2 mg mL^{-1} foram acondicionadas a cubetas de quartzo (Hellma GmbH & Co.KG) de quatro faces polidas e caminho ótico igual a 1 cm e irradiadas durante 2 h, mantendo-se a termostatização em $25 \pm 0,5^\circ \text{C}$ e agitação constante. Como fonte de luz contínua na região do UV-C utilizou-se lâmpada de xenônio de alta pressão em bancada fotoquímica Oriel equipada com filtro de interferência de comprimento de onda igual $266 \pm 4 \text{ nm}$. A fotólise foi realizada em triplicata para ambas as proteínas e uma alíquota não foi irradiada sendo mantida como referência. A Figura 6 ilustra e sumariza as etapas do procedimento experimental.

Figura 6: Fluxograma do procedimento de exposição das amostras proteicas à luz na região do UV – C (266 nm) por 2 h, posterior análise estrutural e digestão.

3.4.1. Actinometria Química

A fim de verificar o fluxo de fótons da luz incidente e garantir a estabilidade da lâmpada durante o experimento, realizou-se o procedimento de actinometria, utilizando o sal de Parker. Um volume de 3 mL de solução 0,006 M de actinômetro químico ferrioxalato de potássio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{C}_2\text{O}_4)_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) – sal de Parker – foi exposta a luz no mesmo comprimento de onda empregado na fotólise contínua (266 ± 4 nm), por 3 minutos. Em seguida 1 mL da solução de actinômetro irradiado foi misturado a 1,25 mL tampão acetato 0,6 M contendo ácido sulfúrico 0,18 M, 0,5 mL de 1,10-fenantrolina 0,12 % e água Milli Q até completar o volume de 5 mL. Esta solução foi mantida a temperatura ambiente, no escuro, por 1 h. Após o tempo de reação, mediu-se a absorbância da solução em 510 nm utilizando espectrofotômetro de arranjo de diodos modelo Multiskan GO Microplate Spectrophotometer (ThermoScientific, Bremen, Alemanha) com acessório para leitura de cubetas. A medida do fluxo de fótons da luz por actinometria (I) foi realizada imediatamente antes e depois do experimento de fotólise contínua. Possuindo os valores de absorbância, a intensidade da luz foi calculada como descrito na equação 8:

$$I = \frac{V_1 \times V_3 \times \Delta A}{\phi_{Fe} \times t \times V_2 \times l \times \epsilon_{Fe}} \quad (8)$$

Onde: V_1 é o volume da solução de actinômetro irradiado (L).

V_3 é o volume da alíquota de solução de actinômetro irradiado adicionado ao balão volumétrico (L).

V_2 é o volume total do balão volumétrico (L).

ΔA é a diferença entre a absorbância da solução irradiada e da solução não irradiada medidas em 510 nm.

ϕ_{Fe} = rendimento quântico da formação do íon Fe^{2+} em 266 nm ($\phi_{Fe}=1,25$).

t é o tempo de irradiação em segundos.

l é o caminho ótico da cela usada na fotólise em cm.

ϵ_{Fe} é o coeficiente de extinção molar do íon complexo $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ a 510 nm, $\epsilon_{Fe}=1,11 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

Após a medida de intensidade da luz por actinometria, realizou-se a medida do diâmetro do feixe de luz, em triplicata, utilizando um paquímetro. A partir da média ponderada das medidas foi possível estimar a área do feixe de luz em m^2 e transformar o fluxo de fótons ($\text{Einstein m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em densidade de potência (W m^{-2}) pela equação 9.

$$\text{Densidade de Potência (W/m}^2\text{)} = 6,022 \times 10^{23} \times h \times \frac{I}{\pi r^2} \times \frac{c}{\lambda} \quad (9)$$

Onde I é a intensidade da luz (Einstein s^{-1})

h é a constante de Planck ($6,63 \times 10^{-34} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-1}$)

c é a velocidade da luz no vácuo ($299\,792\,458 \text{ m s}^{-1}$)

λ é o comprimento de onda (m)

πr^2 é a área do feixe de luz em m^2

3.5. Análise conformacional das amostras proteicas

Com o propósito de compreender as mudanças conformacionais e observar os efeitos da exposição à luz na região do UV-C ($266 \pm 4 \text{ nm}$) na estrutura das proteínas do soro do leite, as amostras irradiadas e o controle não irradiado de β -lactoglobulina e α -lactoalbumina foram submetidos à análise por espectroscopia no UV – Visível, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier por reflexão total atenuada (ATR – FTIR), espectroscopia de fluorescência, espectroscopia por dicroísmo circular (CD), quantificação de tióis livres acessíveis, eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE), ressonância magnética nuclear ^1H (RMN) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

3.5.1. Espectroscopia eletrônica de absorção no UV – Visível

Os espectros eletrônicos de absorção na região do UV – Visível foram obtidos utilizando cela de quartzo (Hellma GmbH & Co.KG) de caminho ótico igual a 1 cm em espectrofotômetro de arranjo de diodos modelo Multiskan GO Microplate Spectrophotometer (ThermoScientific, Bremen, Alemanha) com acessório para leitura de cubetas. Durante as medidas a temperatura foi mantida a $25,0 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.5.2. Fluorescência intrínseca do triptofano no estado estacionário

A espectroscopia de fluorescência intrínseca do triptofano no estado estacionário foi realizada em espectrofluorímetro Hitachi, modelo F – 4500. Os espectros de emissão foram registrados utilizando $\lambda_{\text{excitação}} = 295 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 310 - 500 \text{ nm}$ e fendas de 2,5 nm. Os espectros de emissão de fluorescência foram analisados pela integral da região de 310 a 380 nm utilizando o *software* Origin Pro 8.5 e pelo cálculo do centro de massa espectral segundo o descrito na equação 10:

$$\langle \lambda \rangle = \frac{\sum F_i \lambda_i}{\sum F_i} \quad (10)$$

Onde F_i é a intensidade de fluorescência e λ_i seu respectivo comprimento de onda.

3.5.3. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier por reflexão total atenuada (ATR – FTIR)

A análise espectroscópica no infravermelho da α -lactoalbumina foi realizada em equipamento Vertex 70v da Bruker, equipado com acessório de refletância total atenuada com cristal de diamante e detector MCT. A espectroscopia por FTIR-ATR da β -lactoglobulina foi realizada em equipamento Tensor 27, da Bruker, equipado com cristal de ZnSe. O experimento foi conduzido segundo o descrito por YANG et al. (2015) adicionando-se 10 μL de amostra em solução sobre o cristal. Os espectros foram registrados com resolução de 4 cm^{-1} e velocidade de *scan* de 160 kHz para a α -La e 2,2 kHz para a β -Lg.

Durante toda a aquisição de dados o espectrômetro foi purgado com $\text{N}_{2(g)}$ a fim de evitar absorção por vapores de água. Após a obtenção dos dados, com o intuito de aumentar a resolução espectral e quantificar a estrutura secundária relativa, procedeu-se a deconvolução da região referente a amida I ($1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$) pelo método da segunda derivada utilizando *software* Origin Pro 8.5. Cada banda resultante da deconvolução apresenta uma frequência que é característica de certa estrutura secundária, como descritos na Tabela 3. A área de cada banda obtida na deconvolução representa a respectiva quantidade percentual dessa estrutura.

Tabela 3: Atribuições dos tipos de estrutura secundária proteica em D₂O às frequências da banda da amida I deconvolvida.

Número de onda (cm ⁻¹)	Estrutura secundária
1620 ± 20	β - folha
1645 ± 5	Randômica
1653 ± 4	α - hélice
1641 ± 2	3 ₁₀ -hélice
1675 ± 5	β - folha
1680 ± 20	β - volta

Fonte: Adaptado de YANG *et al.*, 2015.

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier utilizando refletância total atenuada é amplamente aplicada ao estudo da estrutura e dinâmica de proteínas (DONG *et al.*, 1996). O princípio envolvido na ferramenta de refletância total atenuada é descrito na Figura 7A, onde o feixe de luz na região do infravermelho incide no cristal em um ângulo de aproximadamente 45° e é refletido na interface cristal-amostra. Entretanto, devido às propriedades de onda da luz, o feixe não é imediatamente refletido na interface cristal-amostra, mas, em um limite virtual no interior da camada da amostra, que é menos densa que o cristal (Figura 7B). Esta fração de luz incidente que penetra a amostra e é refletido para o detector (feixe evanescente) é atenuado nas regiões nas quais a amostra absorve energia (BARTH, 2007).

Figura 7: Ilustração do princípio envolvido nas medidas usando ATR. a) Feixe incidente no cristal. b) Reflexão do feixe evanescente em um limite virtual entre amostra e cristal.

Fonte: Adaptado de BARTH, 2007.

3.5.4. Espectroscopia por Dicroísmo Circular no UV

A fim de compreender mudanças na estrutura secundária e terciária da proteína realizou-se espectroscopia de dicroísmo circular no UV distante (195 a 260 nm) e no UV próximo (250 a 310 nm), respectivamente. Para as análises no UV distante as amostras foram diluídas em água MiliQ a uma concentração de 0,12 mg mL⁻¹. O espectropolarímetro Jasco J – 815 (Japan Spectroscopic, Tokio, Japão) foi configurado nos seguintes parâmetros: velocidade de varredura = 200 nm/min, acumulações = 40, *data pitch* = 0,5 nm, utilizando cubeta de quartzo de caminho ótico igual a 2 mm. Os valores de elipticidade (mdeg) obtidos para o espectro de CD foram corrigidos para elipticidade molar residual ([θ]) segundo a equação 11, descrita abaixo.

$$[\theta_{(\lambda)}] = \frac{\theta_{(\lambda)} \times MM}{10 \times c \times d \times n} \quad (11)$$

Onde $\theta_{(\lambda)}$ é a elipticidade (mdeg).

MM é a massa molar da proteína.

c é a concentração (mg mL⁻¹).

d é o caminho ótico da cubeta utilizada (cm).

n número de resíduos de aminoácidos da proteína.

A deconvolução dos dados e quantificação da estrutura secundária foi realizada pelo *software* CDNN. Todos os espectros foram registrados em temperatura igual a 25 ± 0,1 °C.

3.5.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio foi realizada em condições redutoras e desnaturantes em gel de concentração de acrilamida igual a 12 %. Aliquotas de 10 µL da amostra não irradiada e após cada tempo de irradiação foram coletadas e diluídas na proporção 1:1 em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH = 6,8 contendo 4% SDS 0,2 % de azul de bromofenol, 20 % de glicerol e 0,2 M e 1,4 -ditiotretitol (DTT).

3.5.6. Quantificação de tióis livres acessíveis

A quantificação de tióis livres acessíveis ao solvente foi realizada baseando-se no método de ELLMAN, G. L. (1959) utilizando DTNB. A concentração de tiol livre foi medida a partir da absorvidade molar do TNB, $\epsilon_{\text{TNB}} = 14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH = 8 contendo 1 mM de EDTA e $\lambda_{\text{Abs}} = 412 \text{ nm}$. Para a medida de absorbância, um volume de 250 μL de cada uma das amostras foi adicionado a 2,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH = 8 contendo 1 mM de EDTA e 50 μL de solução 4 mg mL^{-1} de DTNB preparada no mesmo tampão. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 15 min e então foi realizada a medida de absorbância em 412 nm. Calculou-se a concentração de grupos sulfidrilas livres pela lei de Lambert – Beer, considerando-se os fatores de diluição.

Após a quantificação de tióis livres foi calculado o rendimento quântico da quebra das pontes de dissulfeto ($\Phi_{(-SH)}$) como consequência da incidência de luz por meio da equação 12:

$$\Phi_{(-SH)} = \frac{V([RSH]_{\text{nativa}} - [RSH]_{\text{irradiada}})}{t \times I \times (1 - 10^{A_{266nm}})} \quad (12)$$

Onde V é o volume da solução irradiada (L)

$[RSH]_{\text{nativa}}$ é a concentração de tiol na proteína não irradiada (M)

$[RSH]_{\text{irradiada}}$ é a concentração de tiol na proteína irradiada (M)

I é a intensidade da luz calculada por actinometria (Einstein s^{-1})

t é o tempo de irradiação (s)

A_{266nm} é a absorbância

3.5.7. Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear ^1H foram conduzidos em espectrômetro de 500 MHz, da Agilent Technologies, modelo DD2, e campo de 11,7 Tesla (499,84 MHz para o ^1H). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão e como padrão interno foi utilizado o sinal residual da água, por meio de sequência Presat descrita na Figura 8. O tempo de relaxação foi igual a 10 s, pulso de 90° e acúmulo de 256 transientes. Os espectros foram registrados de -10 a 20 ppm. Os dados obtidos foram analisados pelo *software* MestreNova 6.0.2.

Figura 8: Sequência de pulso Presat realizada pelo equipamento de RMN

Fonte: Adaptado de Agilent Technologies, Software VnmrJ 2.1.

3.5.8. Cromatografia por exclusão molecular analítica

A análise de cromatografia por exclusão molecular analítica foi conduzida em equipamento ÄKTAprime da GE Healthcare Life Sciences, utilizando uma coluna Superdex 200/10 300, também da GE Healthcare Life Sciences. Para a eluição das proteínas foi utilizado tampão fosfato 0,01M, pH = 6,8 e força iônica igual a 0,16 M de NaCl, preparado em água MiliQ.

Para verificar o volume morto da coluna foi verificado o volume de eluição do blue dextran, sendo igual a 8,64 mL. A fim de obter um padrão de comparação, inicialmente, realizou-se a eluição das proteínas globulares padrão obtidas da Sigma Aldrich, com massas e raios hidrodinâmicos descrito na Tabela 4.

Tabela 4: Proteínas padrão e suas respectivas massas moleculares e raio hidrodinâmico (raio de Stokes)

Proteína Padrão	kDa	Raio de Stokes
Apoproteína	6,5	13,5
Citocromo C	12,4	17
Anidrase Carbônica	29	21
BSA	66	35

A partir dos volumes de eluição dos padrões, foi calculado o coeficiente de partição (K_{av}) pela equação 13:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (13)$$

Onde V_e é o volume de eluição da proteína sob análise

V_t é o volume total da coluna (24 mL)

V_0 é o volume morto da coluna, sendo igual ao volume de eluição do Blue Dextran

Após o cálculo do coeficiente de partição (K_{av}), um gráfico de $-\log K_{av}^{1/2}$ versus o raio hidrodinâmico dos padrões foi construído. Por meio do ajuste linear do gráfico e pelo volume de eluição da proteína estudada foi possível obter o raio hidrodinâmico.

A fim de analisar a massa aparente da proteína, foi construído um gráfico do coeficiente de partição (K_{av}) versus $\log MM$, onde MM é a massa molar das proteínas padrão utilizadas na medida.

3.6. Digestão *in vitro* das proteínas majoritárias do soro do leite (β -lactoglobulina e α -lactoalbumina)

A digestão *in vitro* estática foi realizada a fim de mimetizar a digestão de adultos saudáveis em comparação a digestão gástrica de idosos, segundo o protocolo adaptado de MINEKUS *et al*, 2014 e LEVI *et al*, 2017 para adultos e idosos, respectivamente. O processo de digestão *in vitro* é dividido em duas fases, oral e gástrica, conforme ilustrado na Figura 9. Inicialmente, a solução proteica é adicionada ao fluido salivar simulado (SSF), sem adição de α -amilase, uma vez que não há carboidratos na solução, em uma proporção 1:1 e mantida a 37 ± 1 °C por 2 minutos. A solução proveniente desta etapa é chamada de bolo oral e é misturada a pepsina, fluido gástrico simulado (SGF) e $CaCl_2$, conforme as proporções descritas na Figura 8 para adultos e idosos. Adicionou-se HCl 1 M até alcançar pH = 3 na mistura digestiva final. Ambas as soluções de SSF e SGF tem sua composição descrita na Tabela 5.

A etapa gástrica da digestão foi conduzida por 2 h para adultos e 3 h para idosos, mantendo a temperatura de 37 ± 1 °C durante todo o período. Ao fim do experimento, com o propósito de interromper a digestão, foram adicionados 1 mL de $NaHCO_3$ 0,5 M elevando o pH das amostras digeridas acima de 8, no qual a pepsina se desnatura irreversivelmente. Além disso, as amostras digeridas foram imediatamente congeladas em $N_{2(l)}$. As soluções proteicas digeridas irradiadas e não irradiadas foram analisadas por HPLC seguindo o procedimento descrito em 3.6.1.

Tabela 5: Composição salina do fluido salivar simulado (SSF) e fluido gástrico simulado (SGF)

Solução Salina (M)	SSF (m)	SGF
KCl (0,5 M)	15,1	6,9
KH ₂ PO ₄ (0,5 M)	3,7	0,9
NaHCO ₃ (1 M)	6,8	12,5
MgCl(H ₂ O) ₆ (0,15 M)	0,5	0,4
NaCl (2 M)	-	11,8
(NH ₄) ₂ CO ₃ (0,5 M)	0,06	0,5

Figura 9: Fluxograma descritivo do processo de digestão estática *in vitro*, mimetizando a digestão de adultos jovens e idosos.

Fonte: Adaptado de MINEKUS *et al.*, 2014.

A fim de verificar a eficiência da digestão, foi calculado o Índice de Digestão Relativo (IDR), conforme a equação 14. O IDR informa a quantidade de proteína que foi digerida em relação ao total de proteínas presente inicialmente na amostra, calculadas a partir da integração dos cromatogramas das amostras digeridas.

$$IDR = 100 - \left(\frac{a}{b} \times 100 \right) \quad (14)$$

Onde a é a área do pico referente a proteína, caso ela não tenha sido totalmente digerida.

b é a área do padrão não digerido.

3.6.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida foi empregada a fim de analisar as soluções digeridas. Este procedimento foi conduzido em cromatógrafo Shimadzu, equipado com sistema de injeção automático, bombas modelo LC20AD e utilizando detector de arranjo de diodos modelo SDP-M20A. Utilizou-se uma coluna C18 modelo Aeris Widepore XB-C18, 3,6 μ (150 x 2,1 mm), Phenomenex e vazão de 0,4 ml min⁻¹. As fases móveis empregadas foram: água MilliQ 0,1 % ácido fórmico (solução A) e acetonitrila 0,1 % ácido fórmico (solução B). Antes da injeção as amostras foram diluídas para 0,2 mg mL⁻¹ em água MilliQ e filtradas em filtro de 0,22 μ m da Merck. O volume de injeção das amostras foi de 5 μ L.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Análise conformacional proteica

4.1.1 Espectroscopia eletrônica de absorção no UV – Visível

Por meio da análise de espectroscopia de absorção eletrônica no UV-Visível realizou-se a quantificação da solução β -lactoglobulina e α -latoalbumina segundo o descrito na seção 3.3, obtendo a concentração analítica das soluções de trabalho tipicamente ao redor de 50 μ M e 60 μ M, respectivamente. A espectroscopia no UV-Vis fornece um indicativo da formação dos principais fotoprodutos observados para proteínas irradiadas (NFK, quinurenina e ditirosina), que absorvem nos comprimentos de onda listados na Tabela 6. Os espectros obtidos por espectroscopia no UV-Vis também dão um indicativo de mudanças conformacionais na estrutura proteica devido a alterações no coeficiente de absorvidade molar (GHOSH *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2015).

Tabela 6: Comprimentos de onda de absorção dos principais produtos de fotooxidação em proteínas, N-formilquinurenina e quinurenina, fotoprodutos do triptofano e ditirosina, fotoproduto da tirosina.

Fotoproduto	Absorção (nm)
N-formilquinurenina (NFK)	261 e 322
Quinurenina	358 e 360
Ditirosina	284 e 316

Fonte: Adaptado de SILVA *et al.*, 2015

Na Figura 10 estão os espectros de absorção eletrônica para a β -lactoglobulina mantida como controle (β -Lg_NI) e amostras irradiadas por 2 h em 266 nm (β -Lg_I). Observa-se um aumento da absorbância que é consequência do aumento no coeficiente de absorvidade molar, indicando alterações conformacionais impostas pela exposição da proteína a luz UV – C (266 ± 4 nm) (GHOSH *et al.*, 2018). Ademais, é possível verificar o aparecimento de uma banda de baixa intensidade de absorção com comprimento de onda máximo em torno de 322 nm, que pode ser atribuída à formação do fotoproduto N-formil-quinurenina (NFK), muito comum em proteínas expostas à luz na região do UV-C (200 – 280 nm) (SILVA *et al.*, 2015; HAYWOOD *et al.*, 2013).

Figura 10: Espectros eletrônicos de absorção no UV da β -lactoglobulina 49,6 μM , onde $\beta\text{-Lg_NI}$ representa a amostra não irradiada, $\beta\text{-Lg_I}$ representa a proteína irradiada por 2 h em 266 nm (fluxo de fótons = $1,97 \cdot 10^{-10}$ einstein s^{-1} , i.e. 337 W m^{-2}), em tampão fosfato 0,01M, pD = 6,8 e I = 0,16 M de NaCl e o possível fotoproduto de irradiação, N-formil-quinurenina, que possui máximo de absorção em 322 nm.

Estudos anteriores realizados por KRISTO, HAZIZAJ e CORREDIG, 2012; KEHOE *et al.*, 2008 e WU *et al.*, 2018 apresentam a formação deste fotoproduto (NFK) após a exposição da β -lactoglobulina a luz UV (254 nm) por diferentes períodos. O NFK, assim como descrito no item 1 deste trabalho, é formado pela clivagem oxidativa das ligações entre o carbono 2 e 3 do anel indol do triptofano. Para que esta reação ocorra o triptofano singleto excitado deve ir ao seu estado tripleto e, pela reação com O_2 , formar a N-formilquinurenina (PATTISON, RAHMANTO e DAVIES, 2012).

A fim de quantificar a possível formação do fotoproduto NFK, realizou-se a deconvolução, dessa banda pelo método da segunda derivada utilizando o *software* Origin Pro 8.5. Considerando que a banda centrada em 322 nm é consequente do NFK, obteve-se a formação de $12,9 \pm 0,9 \%$

desse fotoproduto. Essas modificações em resíduos do triptofano podem ocasionar quebra de pontes de dissulfeto, mudanças conformacionais e estruturais e de atividade biológica proteica (HAYWOOD *et al.*, 2013).

Na Figura 11 estão os espectros de absorção eletrônica para a α -lactoalbumina não irradiada (α -La_NI) e para a proteína exposta à luz UV-C (266 nm) por 2 h (α -La_I). No caso da α -lactoalbumina, não é possível perceber nenhuma mudança aparente na absorbância da proteína irradiada, indicando que não ocorreram mudanças conformacionais mais acentuadas ou que sejam sensíveis a espectroscopia de absorção eletrônica no UV. Entretanto, é possível observar o surgimento da banda com máximo de absorção centrado em 322 nm, assim como verificado para a β -Lg. Esta banda de baixa absorção pode indicar a formação do fotoproduto N-formilquinurenina. A deconvolução dessa banda, seguindo a metodologia descrita para β -lactoglobulina sugere a formação de $6,8 \pm 0,8$ % do fotoproduto N-formilquinurenina.

Figura 11: Espectros eletrônicos de absorção no UV da α -lactoalbumina 58,6 μ M, onde α -La_NI representa a amostra não irradiada, α -La_I representa a proteína irradiada por 2 h e 266 nm (fluxo de fótons = $1,16 \cdot 10^{-10}$ einstein s^{-1} , i.e. 200 W m^{-2}), em tampão fosfato 0,01M, pD = 6,8 e I = 0,16 M de NaCl e o possível fotoproduto de irradiação, NFK.

4.1.2 Fluorescência intrínseca do triptofano no estado estacionário

A espectroscopia de fluorescência intrínseca do triptofano, no estado estacionário, permite obter informações sobre a estrutura terciária do microambiente dos triptofanos contidos em uma proteína (GHOSH *et al.*, 2018). Quando aplicada à β -lactoglobulina, tem por objetivo monitorar o microambiente do triptofano 19 e 61. O triptofano 19 encontra-se enterrado no bolsão proteico hidrofóbico, localizado anteriormente a β -fita A, sendo essencialmente inacessível ao solvente (BROWNLOW *et al.*, 1997). O triptofano 61 está localizado próximo a ponte de dissulfeto Cys 160 – Cys 66, na β -fita C, e se encontra relativamente exposto ao solvente.

Na Figura 12, pode-se observar os espectros de emissão de fluorescência para a β -lactoglobulina não irradiada (β -Lg_NI) e irradiada por 2 h em 266 nm (β -Lg_I). Após a integração dos espectros foi possível verificar uma diminuição na intensidade de fluorescência das amostras de β -Lg expostas a luz UV-C (266 nm) de $15,2 \pm 3,6$ %. Esta diminuição pode ser resultado da fotodegradação do Trp e formação do fotoprodutos de oxidação desse aminoácido, N-formil-quinurenina. Esta hipótese está de acordo com os resultados obtidos para a espectroscopia de absorção na região do UV – Vis, na qual se verifica o surgimento de uma banda de absorção centrada em 322 nm para as amostras irradiadas. A diminuição na intensidade de fluorescência também pode indicar supressão pela aproximação de outros resíduos de aminoácido principalmente tirosina, histidina carregada positivamente, cisteína e pontes de dissulfeto (KRISTO, HAZIZAJ e CORREDIG, 2012).

Outra indicação das modificações estruturais ao redor do microambiente do triptofano é o deslocamento do comprimento de onda máximo de emissão de fluorescência. Quando este deslocamento ocorre para menores comprimentos de onda é chamado de *blue shift* e quando ocorre para maiores comprimentos de onda é chamado de *red shift*. O deslocamento do comprimento de onda máximo de emissão esclarece quanto a exposição do triptofano ao solvente aquoso polar e pode ser calculado pelo centro de massa espectral. Verificou-se um aumento do comprimento de onda máximo de fluorescência (*red shift*) de 6 ± 2 nm para a β -lactoglobulina irradiada por 2 h (266 nm) em relação a β -Lg não irradiada (β -Lg_NI). Este aumento sugere uma maior exposição do triptofano ao solvente aquoso consequente de mudanças na estrutura terciária proteica, porém, sem haver completo desenovelamento proteico (GOMAA *et al.*, 2016).

Figura 12: Espectro de emissão de fluorescência intrínseca do triptofano para amostras de β -lactoglobulina 98,4 μ M, onde β -Lg_NI representa a amostra não irradiada e β -Lg_I a amostra irradiada com luz UV-C (266 nm) por 2 h em tampão fosfato 0,01M, pD = 6,8 e 0,16 M de NaCl

A α -lactoalbumina possui 4 triptofanos (Trp 26, Trp 60, Trp 104 e Trp 118), sendo que o triptofano 60 está disposto no domínio β -folha da proteína, enquanto o Trp 26, Trp 104, Trp 118 estão dispostos em seu domínio α -hélice. Os Trp 26 e 104 estão menos expostos ao solvente e o Trp 118 é o mais próximo a ponte de dissulfeto Cys28-Cys111. Os espectros de emissão de fluorescência registrados para α -lactoalbumina (Figura 13) também apresentam uma diminuição na intensidade de emissão para as amostras irradiadas. Após a integração das bandas de emissão verificou-se uma diminuição de $9,4 \pm 4,3$ %. Assim como para a β -lactoglobulina, essa diminuição pode ser resultante da formação do fotoproduto N-formilquinurenina (NKF) ou pela aproximação de resíduos de aminoácidos supressores (KRISTO, HAZIZAJ e CORREDIG, 2012). Realizou-se o cálculo do centro de massa espectral e não foi possível observar deslocamento no comprimento de onda máximo de emissão de fluorescência.

Figura 13: Espectro de emissão de fluorescência intrínseca do triptofano para amostras de α -lactoalbumina 96,2 μ M, onde α -La_NI representa a amostra não irradiada e α -La_I a amostra irradiada por 2 h (266 nm) em tampão fosfato 0,01M, pD = 6,8 e 0,16 M de NaCl

4.1.3 Análise da estrutura secundária proteica por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier por reflexão total atenuada (ATR – FTIR)

A técnica de FTIR é muito versátil e sensível quando se trata da análise da estrutura secundária de proteínas em solução aquosa, em sistemas complexos ou em estados funcionais, como na forma de géis e filmes. Geralmente a predição da estrutura secundária é obtida a partir da deconvolução da região espectral da amida I (1600-1700 cm^{-1}) (RAFE e RAZAVI, 2015). As vibrações na região da amida I são consequência, principalmente, do estiramento C=O e, em menor proporção do estiramento assimétrico C-N e dobramento N-H da cadeia polipeptídica. As vibrações da amida I de uma proteína dificilmente são afetadas pela natureza da cadeia lateral dos aminoácidos, mas dependem grandemente da estrutura secundária desta proteína. Por este motivo, as frequências obtidas na região da amida I (1600 – 1700 cm^{-1}) são utilizadas para predizer e

quantificar a estrutura secundária (BARTH, 2007). Entretanto, uma dificuldade na aquisição dos dados nessa região é a forte absorção da água em 1645 cm^{-1} . Para contornar este problema óxido de deutério foi utilizado como solvente nas análises de FTIR-ATR realizadas.

A Figura 14 apresenta os espectros de absorbância no infravermelho para β -lactoglobulina não irradiada (β -Lg_Ni) e para proteína exposta a luz (266 nm) por 2 h (β -Lg_I). É possível identificar 9 bandas vibracionais centradas em: 1618, 1626, 1636, 1646, 1653, 1661, 1668, 1675, 1684 cm^{-1} . Além disso, não há deslocamento das bandas apresentadas para proteína irradiada em relação ao controle. Outro fato a ser notado é uma diminuição na absorbância para a proteína irradiada, que pode ser consequência de mudança na estrutura secundária proteica.

Figura 14: Espectros de FTIR na região da amida I, de $1700 - 1600\text{ cm}^{-1}$, da β -lactoglobulina $98,4\text{ }\mu\text{M}$ não irradiada (β -Lg_Ni) e irradiada por 2 h em 266 nm (β -Lg_I) em tampão fosfato $0,01\text{M}$, $\text{pD} = 6,8$ e $I = 0,16\text{ M}$ de NaCl.

Bandas centradas em, aproximadamente, 1618 cm^{-1} estão associadas a formação de β -folhas intermoleculares ligadas características de agregação. Bandas centradas em, aproximadamente,

1627 cm^{-1} estão associadas a β -folhas fortemente ligadas, situação encontrada no motivo em β -barril da proteína (KEHOE *et al.*, 2008). A frequência com máximos em torno de 1636 cm^{-1} é atribuída a estrutura predominantemente em β -folha. A banda centrada em 1684 cm^{-1} está associada a β -folhas antiparalelas e sua posição dificilmente é afetada pelo número de amidas nas β -fitas que compõem a β -folha, porém, é fortemente afetada pelo número de fitas presentes na β -folha (BARTH, 2007; LEFÈVRE e SUBIRADE, 2000). Frequências em torno de 1646 e 1653 cm^{-1} , são características de estrutura secundária randômica e α -hélice, respectivamente. Bandas com frequência acima de 1657 cm^{-1} são associadas a β -volta, com exceção de frequências em torno de 1675 cm^{-1} que são associadas a β -folha. A presença concomitante de bandas em 1626 e 1636 cm^{-1} é características da forma dimérica da β -lactoglobulina. A presença concomitante das frequências em 1618 e 1684 cm^{-1} são atribuídas a agregação proteica. A presença dessas quatro frequências confirma a forma dimérica em que a β -lactoglobulina se encontra para o pD de trabalho (pD = 6,8) (LEFÈVRE e SUBIRADE, 2000).

Para a atribuição e quantificação da estrutura secundária da β -lactoglobulina foram feitas as deconvoluções em triplicata conforme o Anexo I e o descrito na Seção 3.5.3. A média das percentagens de estrutura secundária obtidas para a β -lactoglobulina irradiada (β -Lg_I) bem como para o controle não irradiado (β -Lg_Ni) são apresentadas na Tabela 7. Observa-se um aumento na estrutura secundária em β -folha, com forte indicação de diminuição de estrutura randômica e β -volta. Também há um indício de aumento na estrutura em α -hélice.

Tabela 7: Quantificação da estrutura secundária a partir das frequências na região da amida I do espectro de FTIR – ATR. β -Lg_I representa a solução proteica irradiada por 2 h em 266 nm e β -Lg_Ni representa o controle não irradiado, ambas em tampão fosfato 0,01M, pD = 6,8 e I = 0,16 M de NaCl.

Estrutura Secundária (%) - Tampão Fosfato (D₂O) 0,01 M, pD = 6,8, 0,16 M NaCl		
	β-Lg_Ni	β-Lg_I
β -folha	47 $\pm$ 0,2	52 $\pm$ 3
Randômica	12 $\pm$ 2	9 $\pm$ 1
α -hélice	15 $\pm$ 1	17 $\pm$ 1
β -volta	26 $\pm$ 2	22 $\pm$ 2

Os espectros de absorvância no infravermelho para α -lactoalbumina não irradiada (α -La_Ni) e para proteína exposta a luz (266 nm) por 2 h (α -La_I) são apresentados na Figura 15. É possível identificar 8 bandas vibracionais centradas em: 1615, 1631, 1641, 1650, 1658, 1663, 1677 e 1690 cm^{-1} . Além disso, não há deslocamento das bandas apresentadas para proteína irradiada em relação ao controle. Outro fato a ser notado é um aumento na absorvância para a proteína irradiada, que pode ser consequência de mudança na estrutura secundária proteica.

Bandas em, aproximadamente, 1615 cm^{-1} podem estar associadas a estrutura secundária em β -folha ou a vibrações provenientes das tirosinas presentes na α -La, mas, neste trabalho a banda em 1615 cm^{-1} foi associada a β -folha (DZWOLAK *et al*, 1999). Bandas em, aproximadamente, 1641 cm^{-1} estão associadas a 3_{10} -hélice. As frequências com máximos em torno de 1650 e 1658 cm^{-1} são atribuídas a α -hélice. As bandas centradas em 1631 e 1677 cm^{-1} estão associadas a β -folhas. Frequências em torno de 1663 e 1690 cm^{-1} , são características de estrutura secundária em β -volta.

Figura 15: Espectros de FTIR na região da amida I, de 1700 – 1600 cm^{-1} , da α -lactoalbumina, 124,5 μM , não irradiada (α -La_Ni) e irradiada (α -La_I) por 2 h em 266 nm e em tampão fosfato 0,01 M, pH = 6,8 e I = 0,16 M de NaCl.

A atribuição e quantificação da estrutura secundária da α -lactoalbumina foi obtida a partir das deconvoluções em triplicata conforme o apresentado no Anexo I e na Seção 3.5.3. A média das percentagens de estrutura secundária obtidas para a α -La irradiada (α -La_I) (2 h, 266 nm) bem como para não irradiada (α -La_Ni) são apresentadas na Tabela 8. Percebe-se uma possível diminuição nas estruturas secundárias em hélice e possível aumento na quantidade de voltas.

Tabela 8: Quantificação da estrutura secundária a partir das frequências na região da amida I do espectro de FTIR – ATR. α -La_I representa a solução proteica irradiada por 2 h em 266 e α -La_Ni representa o controle não irradiado, ambas em tampão fosfato 0,01 M, pD = 6,8 e I = 0,16 M de NaCl.

Estrutura Secundária (%) - Tampão Fosfato (D₂O) 0,01 M, pD = 6,8, 0,16 M NaCl		
	α-La_Ni	α-La_I
β -folha	28 $\pm$ 5	28 $\pm$ 4
Randômica	0	0
α -hélice	25 $\pm$ 8	17 $\pm$ 7
3_{10} -hélice	25 $\pm$ 4	22 $\pm$ 2
β -volta	23 $\pm$ 7	33 $\pm$ 8

4.1.4. Espectroscopia por Dicroísmo Circular

UV distante

A espectroscopia por dicroísmo circular no UV distante (195 – 260 nm) é uma técnica extensivamente empregada no estudo da estrutura secundária de proteínas. O espectro de dicroísmo circular na região do UV distante (195 – 260 nm) da β -lactoglobulina não irradiada (β -Lg_NI) e irradiada por 2 h na região do UV-C (266 nm) (β -Lg_I) está ilustrado na Figura 16. É possível verificar um mínimo na elipticidade molar residual entre 210 e 225 nm, característico de proteínas predominantemente compostas de β -folha, o que já é bem estabelecido para β -lactoglobulina na literatura (DALSGAARD *et al*, 2007; GOMAA *et al*, 2016).

A deconvolução dos dados foi realizada pelo *software* CDNN e a predição e quantificação das estruturas secundárias estão descritas na Tabela 9. A quantificação da estrutura secundária da β -lactoglobulina resultou em 13 % de α -hélice, 38 % de β -folha, 18 % de β -volta e 33 % de estrutura randômica. É possível observar a diminuição em 1 % na quantidade de β -folha e um aumento, também de 1 % na quantidade de α -hélice, ou seja, uma diferença muito pequena na estrutura secundária. Estes resultados estão em desacordo com os resultados obtidos para o FTIR – ATR.

Entretanto, isso ocorreu, provavelmente, devido a maior sensibilidade da espectroscopia no infravermelho para mudanças na estrutura secundária proteica, especialmente em β -folhas e nos microambientes, como grupos COOH e COO⁻ (GÜLER *et al.*, 2016).

Figura 16: Espectro de dicroísmo circular no UV distante da proteína β -lactoglobulina 6,52 μ M, em tampão fosfato 0,01 M, pD = 6,8 e I = 0,16 M de NaCl, onde β -Lg_NI representa a amostra não irradiada, β -Lg_I representa a amostra irradiada por 2 h utilizando comprimento de onda de 266 nm.

Tabela 9: Quantificação relativa da estrutura secundária da solução controle de β -lactoglobulina (β -Lg_NI) e a média das amostras irradiadas por 2 h (β -Lg_I) em 266 nm, ambas em tampão fosfato 0,01 M, pD = 6,8, I = 0,16 NaCl em D₂O. Deconvolução realizada pelo software CDNN.

	β -Lg_NI (%)	β -Lg_I (%)
α -hélice	13	14 $\pm$ 0
β -folha	38	37 $\pm$ 0
β -volta	18	18 $\pm$ 0
Randômica	33	33 $\pm$ 0

A α -lactoalbumina é uma proteína de estrutura rígida e globular, como já descrito anteriormente. Os espectros obtidos nas análises de espectroscopia por dicroísmo circular são apresentados na Figura 17. O perfil espectroscópico apresentado é característico de proteínas com estrutura composta por α -hélices, apresentando dois máximos de elipticidade molar residual em 208 e 222 nm.

Figura 17: Espectro de CD no UV distante da proteína α -lactoalbumina na concentração de 8,4 μ M, em tampão fosfato 0,01M, pD = 6,8 e I = 0,16 M de NaCl, onde α -La_NI representa a amostra não irradiada, α -La_I representa a amostra irradiada por 2 h em 266 nm.

A deconvolução do espectro de dicroísmo circular na região do UV distante (195 – 260 nm) é apresentada na Tabela 10. A quantificação da estrutura secundária resultou em 18% de α -hélice, 25 % de estrutura β -folha, 21 % de β -volta e 35 % de estrutura randômica. Não houve nenhuma mudança considerável na estrutura secundária da α -lactoalbumina exposta a luz na região do UV-C (266 nm). Entretanto, há um indicativo de mudança na quantidade da estrutura secundária

em voltas. Diferente do apresentado na espectroscopia por FTIR-ATR, a deconvolução do espectro de CD resultou em 35 % de estrutura randômica, entretanto, no CD não há distinção entre α -hélice e 3_{10} -hélice, tornando mais difícil a comparação entre os resultados obtidos para as duas técnicas.

Tabela 10: Quantificação relativa da estrutura secundária da solução controle de α -Lactoalbumina (α -La_Ni) e a média das amostras irradiadas por 2 h (α -La_I), ambas em tampão fosfato 0,01 M, pD = 6,8, I = 0,16 NaCl em D₂O. Deconvolução realizada pelo software CDNN.

	α -La_Ni (%)	α -La_I (%)
α -hélice	18	19 $\pm$ 1
β -folha	25	24 $\pm$ 1
β -volta	21	22 $\pm$ 0,1
Randômica	35	35 $\pm$ 0,1

UV próximo

A espectroscopia por dicroísmo circular no UV próximo (250 – 310 nm) é extensamente aplicada no estudo da estrutura terciária proteica. Nesta região do espectro o CD é resultado das absorções dos resíduos de aminoácidos aromáticos e pontes de dissulfeto. Os sinais gerados por esse resíduos dependem dos seus microambientes que, por sua vez, dependem da estrutura terciária global. Por esse motivo, o espectro de CD no UV próximo é sensível a mudanças na estrutura terciária proteica. Sinais de elipticidade entre 255-270 nm são consequentes da cadeia lateral da fenilalanina, elipticidades entre 275-285 nm são atribuídas ao grupo fenólico da tirosina e entre 285-305 nm são atribuídas ao grupo indol do triptofano. Pontes de dissulfeto dão origem a sinais fracos ao longo do espectro (RANJBAR e GILL, 2009).

Os espectros de dicroísmo circular na região do UV próximo registrados para o controle não irradiado (β -Lg_NI) e amostra irradiada por 2 h na região do UV-C (266 nm) (β -Lg_I) está ilustrado na Figura 18. Os espectros resultantes apresentam duas elipticidades molares residuais características da absorção de aminoácidos aromáticos, que estão de acordo com o descrito na literatura para a β -lactoglobulina (GOMAA *et al*, 2016). Em 285 e 293 nm as elipticidades estão atribuídas ao triptofano, principalmente ao Trp 19 que tem sua cadeia lateral indol localizada no cálice hidrofóbico da β -Lg. Estes sinais do Trp estão intimamente associados com a estrutura rígida

da β -lactoglobulina. Sendo assim, o aumento na intensidade da elipticidade molar residual dos triptofanos em 285 e 293 nm verificada para a proteína irradiada, sugere mudanças na estrutura terciária proteica, especialmente na estrutura do cálice hidrofóbico (GOMAA *et al*, 2016; MORO *et al*, 2011). Uma mudança nas elipticidade molar residual do triptofano está de acordo com os

Figura 18: Espectro de dicroísmo circular no UV próximo da proteína β -lactoglobulina na concentração de 98,4 μ M, em tampão fosfato 0,01M, pD = 6,8 e I = 0,16 M de NaCl, onde β -Lg_NI representa a amostra não irradiada e β -Lg_I representa a amostra irradiada por 2 h em 266 nm.

resultados obtidos para a espectroscopia no UV-Vis e por fluorescência, uma vez que há indicação de fotodegradação deste aminoácido e consequentemente mudança na estrutura proteica.

O espectro de dicroísmo circular na região do UV próximo (250 – 310 nm) da α -lactoalbumina é apresentado na Figura 19. Não há diferença aparente na estrutura terciária ou no microambiente dos aminoácidos aromáticos da proteína irradiada com luz UV-C (266 nm) por 2 h. Ainda que o espectro de absorção eletrônica no UV-Vis apresente uma banda em 322 nm, que

provavelmente é consequência da formação do fotoproduto NFK e ocorra diminuição na intensidade de fluorescência não há mudança na elipticidade molar residual na região atribuída aos Trp (285 e 293 nm). Isso pode ser atribuído a menor sensibilidade da técnica de CD em relação a espectroscopia de fluorescência quanto ao microambiente dos triptofanos ou então por que a diminuição na intensidade de fluorescência pode ser explicada pela aproximação de outros resíduos de aminoácidos.

Figura 19: Espectro de dicroísmo circular no UV próximo da proteína α -Lactoalbumina na concentração de 58,6 μ M, em tampão fosfato 0,01M, pD = 6,8 e I = 0,16 M de NaCl, onde α -La_NI representa a amostra não irradiada e α -La_I representa a amostra irradiada por 2 h na região do UV-C (266 nm).

4.1.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE) foi empregada a fim de verificar agregação via ligações covalentes que não sejam de pontes

de dissulfeto e/ou fragmentações. O perfil eletroforético da β -lactoglobulina em condições redutoras e desnaturantes está ilustrado na Figura 20A. Observa-se uma banda na região de massa molar de aproximadamente 18,4 kDa, referente a β -lactoglobulina monomérica. Pode-se verificar também uma banda em aproximadamente 36,8 kDa, que sugere a presença do dímero covalente dessa proteína. Esta banda em 36,8 kDa, provavelmente está associada a algum processo oxidativo e é observada para a solução de proteína recém preparada.

O perfil eletroforético da α -lactoalbumina pode ser visualizado na Figura 20B. É possível observar bandas correspondentes a três massas moleculares diferentes, são elas: 14 kDa, aproximadamente 20 kDa e entre 36 e 45 kDa. A banda em 14,2 kDa é a mais intensa e representa a α -Lactoalbumina monomérica, a banda em aproximadamente 20 kDa, provavelmente é consequente de alguma impureza advinda do fabricante. A banda entre 36 e 45 kDa pode ser consequente de alguma impureza ou estado oligomérico proteico.

Figura 20: A) Perfil eletroforético da β -Lactoglobulina não irradiada (β -Lg_Ni) e da triplicata de irradiação por 2 h (266 nm) (β -Lg_1, β -Lg_2, β -Lg_3) 49,2 μ M. B) Perfil eletroforético da α -lactoalbumina 62 μ M não irradiada (α -La_Ni) e da triplicata de irradiação por 2 h (266 nm).

4.1.6 Quantificação de Tióis Livres

As pontes de dissulfeto são ligações covalentes especialmente importantes na manutenção da estrutura terciária proteica, em processos de agregação via *cross-link* e função de algumas proteínas. Anteriormente foi descrito por KRISTO, HAZIZAJ e CORREDIG, 2012 e WU, 2018 o

aumento nos tióis livres acessíveis após exposição da β -lactoglobulina à luz na região do UV-C em 254 nm. Além disso, a formação de tióis livres para proteínas expostas a luz na região do UV-C (200-280 nm) é um fato bem consolidado na literatura (MANZOCCO, 2015; NEVES-PETERSEN *et al.*, 2009) e ocorre, principalmente, para proteínas que tem um triptofano espacialmente próximo a uma ponte de dissulfeto. Para as medidas de tióis livres acessíveis foi usado o DTNB que reage estequiometricamente com os tióis livres acessíveis ao solvente presentes na proteína. Quando na presença de tióis livres essa reação forma o produto 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB^{-1}) que se ioniza a TNB^{-2} (Figura 21). Este composto, TNB^{-2} , possui uma cor amarelada e pode ser espectroscopicamente quantificado.

Figura 21: Reação do DTNB com tióis livres acessíveis ao solvente em proteínas e formação do TNB^{2-} , produto amarelo e facilmente quantificável por espectroscopia no UV-Vis, em 412 nm.

Fonte: Autoria própria utilizando código 1BEB do PDB.

Na Figura 22 estão descritas as concentrações de tióis livres acessíveis ao solvente referente a β -lactoglobulina mantida como controle (β -Lg_NI) e a amostra irradiada por 2 h em 266 nm (β -Lg_I). Obteve-se uma concentração de 9,3 μM de grupos sulfidrilas livres para a amostra controle e um aumento de, aproximadamente, cinco vezes nessa concentração ($50,3 \pm 1,6 \mu\text{M}$) para β -Lg irradiada. Após a verificação da quantidade de tióis livres acessíveis realizou-se o cálculo do rendimento quântico aparente da quebra de pontes de dissulfeto para 1 h de radiação afim de verificar a eficiência deste processo, obtendo-se um valor igual a $0,0015 \pm 0,0003$. O rendimento quântico aparente da quebra das pontes de dissulfeto é baixo, como esperado, uma vez que este é um processo secundário.

O aumento de cinco vezes na concentração de sulfidrilas para a β -lactoglobulina irradiada indica que ambas as pontes de dissulfeto (Cys160 – Cys66 e Cys106 – Cys119) foram reduzidas.

A ponte de dissulfeto Cys106 – Cys119 está próxima a Cys121, livre na β -Lg em sua forma nativa, e a uma fenilalanina (5,96 Å), que pouco absorve ($\epsilon_{(266)} = 94,7$) no comprimento de onda de 266 nm. Por esse motivo, acredita-se que a quebra dessa ligação se dá via reação com radical superóxido, como descrito na Equação 15. Neste caso, são formados um tiolato (RS^-), um radical tiila ($RS^\bullet$) e oxigênio molecular.

Figura 22: Concentração de tióis livres formados a partir da exposição da β -lactoglobulina a luz UV-C (266 nm, 2 h), onde β -Lg_NI representa a amostra não irradiada e β -Lg_1, β -Lg_2 e β -Lg_3 representam a triplicata da amostra irradiada por 2 h.

Acredita-se que a quebra da ponte de dissulfeto Cys160 – Cys66 ocorre primariamente na β -lactoglobulina devido à proximidade desta ponte ao Trp61. Estes resíduos estão a 3,78 Å de distância e interagem através de força de Van der Waals, como é possível verificar na Figura 23 (NEVES-PETERSEN *et al.*, 2009). Além disso, próximo a essa ligação de dissulfeto também se encontra a Tyr42, a 5,76 Å de distância. O triptofano tripleto excitado pode transferir um elétron diretamente para a ponte de dissulfeto (Cys160-Cys66) gerando um ânion radical ($RSSR^{\bullet -}$) que se dissocia em um ânion (RS^-) e um radical tiila ($RS^\bullet$), levando a formação de tióis livres. Após doar seu elétron, o ^3Trp pode formar o cátion radical ($\text{Trp}^{\bullet +}$) passível de iniciar o processo de formação do fotoproduto N-formilquinurenina pela reação com oxigênio molecular. Este processo pode

explicar os resultados observados para as análises de espectroscopia no UV-Vis, por fluorescência e por FTIR-ATR que mostram mudanças na estrutura proteica. Resumidamente, o NFK pode ser formado ao passo que a quebra das pontes de dissulfeto desestabilizam, ainda que de forma sutil, a estrutura proteica.

Figura 23: Proximidade espacial entre o triptofano 61 (W 61) e tirosina 42 (Y 42) da ponte de dissulfeto C66 – C160.

Fonte: Imagem e medidas obtidas pelo *software* MolSoft utilizando o código 1BEB do *Protein Data Bank* (PDB)

A α -lactoalbumina nativa possui 4 pontes de dissulfeto, são elas: Cys28-Cys111, Cys91-Cys73, C120-C6, Cys77-Cys61. A análise de tióis livres para α -lactoalbumina exposta a luz por 2 h no UV-C (266 nm) não indicou a quebra dessas pontes de dissulfeto. Assim, acredita-se que nenhum tiol livre acessível ao solvente foi formado. Alguns resultados dão suporte a esta observação, como a espectroscopia por CD e FTIR-ATR que não indicaram variação significativa na estrutura proteica. Isso porque as pontes de dissulfeto são importantes na estabilização estrutural de proteínas e sua quebra provavelmente resultaria em mudanças conformacionais e estruturais.

Na α -lactoalbumina o Trp118, o mais próximo a uma ponte de dissulfeto, se encontra a 4,09 Å de distância da ponte Cys28-Cys111 no domínio β -folha. O Trp60 se encontra a 5 Å de distância da ponte Cys91-Cys73 e próximo a essa ponte (3,58 Å) também se encontra a Phe80. Entretanto, a fenilalanina absorve quase 47 vezes menos que o Trp na região de 266 nm. As outras pontes de dissulfeto não apresentam triptofanos próximos a elas. Neste contexto, acredita-se que devido a estrutura da α -lactoalbumina há uma menor suscetibilidade das pontes a quebra por incidência de luz UV-C (266 nm) em comparação a β -lg.

4.1.7 Ressonância Magnética Nuclear ^1H

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear possibilita o estudo das mudanças estruturais em proteínas e, combinado com o estudo da troca H_2/H_1 , permite investigar estados desenovelados, ainda que parcialmente (BELLOQUE, CHICÓN, LÓPEZ-FANDÑO, 2007). Os prótons NH, OH e SH das proteínas tem frequências de ressonância característica. Quando o próton é acessível ao solvente, ele pode ser trocado. Quando o solvente é óxido de deutério, a troca H/D dos prótons faz com que suas ressonâncias se modifiquem. Prótons que participam de ligações de hidrogênio em estruturas secundárias menos flexíveis (α -hélice e β -folha) não são trocados com o solvente, exceto quando há modificação dessa estrutura e/ou desenovelamento da proteína (BELLOQUE e SMITH, 1998).

O deslocamento químico dos prótons em uma proteína é determinado pelo seu ambiente químico. Prótons de determinados resíduos de aminoácidos tem seus deslocamentos químicos dependente de ligações de hidrogênio locais, conformação da cadeia lateral, resíduos próximos e conformação da estrutura secundária e terciária. Dessa maneira, a dispersão de ressonância depende grandemente da estrutura e composição proteica, por exemplo, a anisotropia magnética dos grupos CO e de cadeias laterais de aminoácidos aromáticos tem uma influência majoritária nos deslocamentos químicos dos prótons. A Tabela 11 apresenta os principais deslocamentos químicos apresentados para os prótons em diferentes estruturas encontrada em proteínas.

Tabela 11: Deslocamento químico dos prótons em proteínas

Tipo de Próton	Deslocamento químico (ppm)
CH_3	0,15
β ; outros prótons alifáticos	1 – 4
α ; β em Ser, Met	3,5 – 5,4
CH aromático	6,5 – 7,7
NH cadeia lateral	6,6 – 7,6
NH estrutura primária	8,1 – 8,8
NH (Trp)	~10

Fonte: GLASEL e DEUTSCHER, p.361, 1995.

A Figura 24 apresenta os espectros de RMN ^1H para a β -lactoglobulina não irradiada (β -Lg_Ni) e exposta luz UV-C (266 nm) por 2 h. A presença e intensidade dos sinais de ressonância são provenientes de átomos de H não expostos ao solvente. Estes prótons estão protegidos na estrutura rígida e em ligações de hidrogênio da proteína. A diminuição da intensidade que aparentemente ocorre para o Trp19 indica modificações nessa região proteica, tal como maior flexibilidade estrutural ou exposição ao solvente. Para o Trp19 pode estar ocorrendo também uma modificação em seu anel indol, como a formação do fotoproduto NFK, o que modificaria a intensidade de ressonância (BELLOQUE, CHICÓN, LÓPES-FANDÑO, 2007). A região entre -1 e 5 ppm não apresentou nenhuma mudança.

Figura 24: Espectros de ^1H RMN da β -lactoglobulina na concentração de 98,4 μM , em tampão fosfato 0,01M, pD = 6,8 e I = 0,16 M de NaCl, onde β -Lg_Ni representa a amostra não irradiada e β -Lg_I representa a amostra irradiada por 2 h em 266 nm. 1 representa a região de deslocamentos químicos da Tyr102 e Phe105

Parece haver uma diminuição na intensidade de ressonância também nas regiões entre 8,4 e 9,1 ppm (região 1 na Figura 24). Estas regiões são atribuídas na literatura aos aminoácidos Tyr102 e Phe105, que se encontram em uma região proteica com número considerável de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e uma ponte de dissulfeto (Cys106 – Cys119). Dessa maneira, na β -Lg nativa, esta região é muito estável e a diminuição na intensidade de ressonância desses aminoácidos

indica desestabilização e mudança estrutural. Isto está de acordo com os resultados obtidos para quantificação de tióis livres acessíveis que demonstra a quebra de todas as pontes de dissulfeto proteicas, modificando as regiões que elas se encontram (BELLOQUE, CHICÓN, LÓPEZ-FANDÑO, 2007).

Na Figura 25 é possível verificar os espectros de RMN ^1H para a α -lactoalbumina não irradiada (α -La_Ni) e expostas a luz no 266 nm por 2 h (α -La_I). A região de 6,4 a 8,7 ppm é considerada a região dos aminoácidos aromáticos. Não há diferença aparente entre os espectros de RMN ^1H das proteínas irradiadas e não irradiada. Este fato, é consistente com os resultados obtidos para a espectroscopia por CD, FTIR – ATR e quantificação de tióis livres acessíveis, que demonstram não haver mudanças mais acentuadas na estrutura proteica.

Figura 25: Espectros de ^1H RMN da proteína α -lactoalbumina na concentração de 58,6 μM , em tampão fosfato 0,01M, pD = 6,8 e I = 0,16 M de NaCl, onde α -La_Ni representa a amostra não irradiada e α -La_I representa a amostra irradiada por 2 h em 266 nm.

4.1.8 Cromatografia de exclusão molecular analítica

A cromatografia por exclusão de tamanho analítica foi empregada a fim de analisar a estrutura quaternária das proteínas após a irradiação e compará-las com o controle não irradiado por meio da medida do raio hidrodinâmico (raio de Stokes) e da massa molecular aparente. O raio

de Stokes (raio hidrodinâmico) é o raio da proteína considerando a camada de hidratação. A comparação entre o raio hidrodinâmico experimental e o teórico (razão friccional) dá informações sobre a assimetria proteica, ou seja, quanto a forma da molécula se distancia de uma esfera. Para tal comparação o raio hidrodinâmico teórico foi estimado utilizando o *software* Sednterp e a sequência de aminoácidos depositada no PDB (*Protein Data Bank*). O raio de Stokes experimental foi obtido a partir da curva do raio hidrodinâmico dos padrões versus $-\log(K_{av}^{1/2})$, como descrito no item 3.5.8.

O perfil de eluição dos padrões, da β -lactoglobulina exposta a luz UV-C (266 nm) por 2 h (β -Lg_I) e da proteína não irradiada (β -Lg_Ni) estão dispostos na Figura 26. Foi obtido um raio de Stokes teórico (R_0) igual a 17,57 Å para a β -lg, utilizando a sequência de aminoácidos referente ao código 1BEB do PDB. É importante ressaltar que o volume de eluição foi o mesmo para a proteína irradiada e não irradiada, por isso, há apenas um valor para o raio de Stokes experimental (R_s), igual a 27,7 Å. A razão entre o raio de Stokes experimental e o raio de Stokes teórico (R_s/R_0) – razão friccional – foi de 1.58. Isso significa que a β -lg se encontra em uma forma mais alongada, se distanciando da conformação completamente globular. Somado a isso, a massa aparente obtida para a β -lactoglobulina foi de 41 kDa, que é o dobro da massa molar monomérica. Dessa maneira, é possível confirmar que o valor do coeficiente friccional é maior que 1, se desviando do formato globular, devido a forma dimérica da β -Lg no pH da solução de trabalho.

O perfil de eluição dos padrões, da α -latoalbumina irradiada por 2 h com luz UV-C (266 nm) (α -La_I) e da α -latoalbumina mantida como controle (α -La_Ni) é apresentado na Figura 27. O raio de Stokes teórico (R_0) obtido para a α -latoalbumina irradiada e controle utilizando a sequência de aminoácidos referente ao código 1F6S do PDB, foi igual a 16 Å. Assim como para a β -lactoglobulina, também não houve mudança no volume de eluição para a α -latoalbumina irradiada e controle. O raio hidrodinâmico experimental obtido foi igual a 21,7 Å. A razão friccional calculada a partir da razão entre o raio de Stokes experimental e o raio de Stokes teórico (R_s/R_0) foi igual a 1,36 e a massa molecular aparente calculada foi igual a 19 kDa. A massa molecular aparente da proteína é maior que sua massa real (14,2 kDa). O conjunto dos valores obtidos para massa molecular aparente e razão friccional indicam que a proteína se comporta como um monômero mais alongado na solução.

Figura 26: A) Perfil de eluição das proteínas padrão, onde 1 é a BSA (66 kDa), 2 é a anidrase carbônica (29 kDa), 3 é o citocromo C (12,4 kDa) e 4 a apoproteína (6,5 kDa). β -Lg_Ni representa a proteína não irradiada e β -Lg_I a proteína irradiada por 2 h com luz UV-C (266 nm). B) Raio de Stokes da β -Lactoglobulina. C) Massa molecular aparente da β -Lactoglobulina

Figura 27: A) Perfil de eluição das proteínas padrão, onde 1 é a BSA (66 kDa), 2 é a anidrase carbônica (29 kDa), 3 é o citocromo C (12,4 kDa) e 4 a apoproteína (6,5 kDa). α -La_Ni representa a proteína não irradiada e α -La_I a proteína irradiada por 2 h com luz UV-C (266 nm). B) Raio de Stokes da α -lactoalbumina. C) Massa molecular aparente da α -lactoalbumina.

Mudanças na estrutura quaternária geralmente são observados para proteínas expostas à luz UV-C (200 – 280 nm), como descreve MANZOCCO, 2015. Entretanto, não há mudança no volume

de eluição das proteínas irradiadas em relação as proteínas não irradiadas, indicando que esse tipo de mudança não ocorreu. Este mesmo padrão foi verificado tanto para a β -lactoglobulina como para a α -lactoalbumina. Isso significa que não há indício de desenovelamento proteico ou mudança no estado oligomérico, via agregação não covalente ou *cross-link*.

4.2 Análise da digestão *in vitro* das proteínas do soro do leite por HPLC

O ensaio de digestão estática *in vitro* tem sido muito usado no estudo de digestibilidade proteica e biodisponibilidade de aminoácidos. Alguns ajustes nos parâmetros de digestão devem ser realizados quando este ensaio é aplicado a fim de mimetizar as condições digestivas de adultos saudáveis, idosos e crianças. Idosos têm uma relação diferente com alimentos quando comparados a adultos saudáveis, sua percepção sensorial diminui, bem como a capacidade de mastigar e digerir os alimentos (LEVI *et al*, 2017).

RÉMOND *et al* (2015) propuseram que, comparado a adultos saudáveis, idosos saudáveis não tem maior tempo de esvaziamento estomacal. Entretanto, idosos em situação de fragilidade têm essa taxa aumentada significativamente. Além disso, em geral, há um aumento no pH estomacal, diminuição da quantidade de enzimas digestivas secretadas e uma diminuição da atividade de outros órgãos que participam da digestão e absorção de nutrientes (LEVI *et al*, 2017; RÉMOND *et al*, 2015). Nesse sentido, o presente estudo considerou como parâmetros da digestão estática *in vitro* para idosos um maior tempo de esvaziamento (3 h) e menor quantidade de pepsina, porém o pH foi mantido em 3, sendo igual a condição definida para adultos.

A β -lactoglobulina tem difícil digestão e grande potencial alergênico, especialmente para idosos e crianças abaixo de 2 anos. Sua estrutura globular e rígida faz com que ela seja resistente à hidrólise por pepsina e quimotripsina, que não conseguem acessar seus sítios de clivagem. Sua alergenicidade se deve ao fato da β -Ig apresentar muitos epítomos que são regiões capazes de se ligar ao IgE (ZEECE, HUPPERTZ e KELLY, 2007). KURPIEWSKA *et al.*, 2019 resumizam alguns estudos que buscaram identificar os sítios de ligação da proteína ao IgE. O antígeno mais forte está localizado entre Lys75-Asp 85, em um *loop* proteico, e entre Glu127-Pro144 na α -hélice da β -lactoglobulina. Ademais, três epítomos menos alergênicos são propostos: Leu31-Pro48, Lys47-Lys60 e Leu57-Ile78. NIEMI *et al.*, 2007 também propuseram alguns antígenos para a β -Ig, incluindo grandes fragmentos de β -fitas, entre eles estão: Trp19-Tyr20 e Cys66-Gln68. Nesse

sentido, modificações nesses epítomos podem aumentar a digestibilidade e diminuir a alergenicidade proteica.

Para verificar o impacto da irradiação com luz UV-C (266 nm) as proteínas do soro do leite digeridas foram submetidas a HPLC. A β -lactoglobulina, foi submetida a cromatografia líquida e o cromatogramas obtidos para a β -Lg são apresentados na Figura 28. A digestão mimetizando condições gástricas de adultos e idosos para a proteína não irradiada apresentou pequena diferença entre os perfis cromatográficos dos peptídeos formados. Os picos que representam essa diferença estão destacados na Figura 28B. É possível verificar também uma mudança ainda mais acentuada no perfil cromatográfico da β -Lg irradiada (2 h, 266 nm) e digeridas sob condições gástricas de adultos e de idosos (Figura 28B). Neste caso, a mudança ocorre em todos os picos.

Figura 28: A) Cromatograma da β -lactoglobulina 9,8 μ M mantida como controle (β -Lg_Ni), β -Lg não irradiada digerida mimetizando condições gástricas de adultos (β -Lg_Ni_Adultos) e idosos (β -Lg_Ni_Idosos), β -Lg irradiada (β -Lg_I) e digerida mimetizando condições gástricas de adultos (β -Lg_I_Adultos) e idosos (β -Lg_I_Idosos). B) Destaque para mudanças no perfil cromatográfico, onde # representa picos que diferem entre β -Lg_Ni_Adultos e β -Lg_I_Adultos, o quadrado amarelo representa a similaridade entre β -Lg_Ni_Idosos e β -Lg_I_Idosos e os pontos (●) representam mudanças entre β -Lg_Ni_Idosos e β -Lg_I_Idosos

Ainda mais relevante é a análise entre a proteína não irradiada e irradiada, ambas digeridas nas condições gástricas de idosos e adultos. Quando se trata da digestão para adultos, poucas mudanças são observadas no perfil peptídico da proteína nativa (β -Lg_Ni_Adultos) em comparação a irradiada (β -Lg_I_Adultos). Quando se trata da digestão para idosos, as mudanças

no perfil peptídico são ainda mais substanciais e apenas um pico permanece igual para as duas condições (Figura 28B). Isso indica que os peptídeos liberados após a digestão são diferentes para adultos e idosos e a irradiação das amostras modifica grandemente a digestão, especialmente quando se trata da digestão mimetizando condições gástricas de idosos.

É possível verificar também que nem toda proteína foi digerida, tanto para as amostras expostas a luz UV-C (266 nm) (β -Lg_I) quanto para as não irradiadas (β -Lg_Ni) para ambas as condições digestivas. Com o intuito de verificar a eficiência da digestão determinou-se o índice de digestão relativo (IDR), conforme o descrito no item 3.6. No geral, a β -lactoglobulina não irradiada teve menor IDR, ou seja, foi menos digerida, quando comparada a proteína irradiada em 266 nm, por 2 h. A β -Lg não irradiada mimetizando condições gástricas de adultos (β -Lg_Ni_Adultos) foi 69,8 % digerida. A digestão a β -Lg não irradiada mimetizando as condições gástricas de idosos (β -Lg_Ni_Idosos) foi digerida em apenas 41,3 %. Quando se trata da β -lactoglobulina irradiada na condição de adultos (β -Lg_I_Adultos) 95,5 % da proteína foi digerida, enquanto 94 % foi digerida na condição de idosos (β -Lg_I_Idosos), representando um aumento na digestão de 25 e 50 pontos percentuais, respectivamente.

A α -Lactoalbumina também é alergênica, ainda que em menor proporção que a β -Lg. Geralmente a alergenicidade proteica está intimamente relacionada com a estrutura rígida que impede a digestão e dificulta a liberação de peptídeos positivamente bioativos. Poucos estudos demonstram quais os sítios de ligação da α -la ao anticorpo IgE. JARVINEN *et al.*, 2001 propuseram que os epítomos dessa proteína são predominantemente conformacionais, ou seja, não são reativos apenas pela sequência de aminoácidos, mas também por sua estrutura tridimensional. Porém, diferente da β -Lg, ela não é estável no pH estomacal. De acordo JARVINEN *et al.*, 2001 as principais sequências de aminoácidos da α -lactoalbumina capazes de se ligar ao IgE são: Glu1-Trp26, Ser47-Lys58, Lys93-Asn102.

A Figura 29 ilustra os perfis cromatográficos apresentados para as digestões da α -lactoalbumina não irradiada (α -La_Ni) e irradiada por 2 h com luz UV-C (266 nm) (α -La_I) mimetizando as condições gástricas de adultos saudáveis (α -La_Ni_Adultos, α -La_I_Adultos) e idosos (α -La_Ni_Idosos e α -La_I_Idosos). É possível perceber uma pequena mudança no tempo de retenção dos peptídeos liberados após digestão gástrica entre todas as amostras. Percebe-se também pequena mudança no perfil dos picos entre as amostras não irradiadas e irradiadas (2 h e

266 nm), como destacado na Figura 29B. É possível verificar também que a α -lactoalbumina irradiada é completamente digerida quando comparada a α -La não irradiada. Isso provavelmente ocorre devido as mudanças conformacionais e estruturais consequentes da irradiação, ainda que essas mudanças sejam sutis e verificadas apenas por espectroscopia de fluorescência. Calculando-se o IDR para a digestão das amostras em relação ao controle (α -La_Ni e α -La_I), 96,7 % da proteína foi digerida nas condições de adultos e 98,9 % foi digerida para idosos. A análise do IDR para α -lactoalbumina exposta à luz UV-C por 2 h em 266 nm mostrou que a proteína foi digerida quantitativamente.

Esperava-se que a digestão proteica mimetizando condições gástrica de idosos ocorresse em menor proporção, como para a β -lactoglobulina. Entretanto, o tempo de digestão é aumentado em uma 1 h em relação a adultos na tentativa de se aproximar do tempo de esvaziamento estomacal de idosos e a α -La é mais suscetível a pepsinólise. Nesse sentido, a exposição da proteína a pepsina por um maior período pode ter causado maior digestão. Ainda assim, a digestão simulando condições gástricas de idosos foi apenas 2 pontos percentuais maior que para adultos. Analisando estudos recentes sobre a digestão gástrica de idosos, especificamente o tempo de esvaziamento estomacal, fica claro que este parâmetro ainda deve ser ajustado.

Figura 29: Cromatograma da α -lactoalbumina mantida como controle (α -La_Ni) 12 μ M, α -La não irradiada digerida mimetizando condições gástricas de adultos (α -La_Ni_Adultos) e idosos (α -La_Ni_Idosos), α -La irradiada (α -La_I) e irradiada e digerida mimetizando condições gástricas de adultos (α -La_I_Adultos) e idosos (α -La_I_Idosos). Os símbolos # representam os picos com perfis diferentes entre si.

O aumento na digestibilidade de ambas proteínas irradiadas se deve a habilidade da luz em modificar a estrutura e conformação proteica. Tanto na α -La quanto na β -lg é possível verificar por espectroscopia no UV-Vis e de fluorescência que há provável formação do fotoproduto NFK e uma mudança no microambiente do triptofano, respectivamente. Provavelmente essas mudanças expõem sítios de clivagem da pepsina ao solvente facilitando sua digestão. Embora os peptídeos formados não tenham sido sequenciados a fim de verificar sua alergenicidade e bioatividade é possível inferir que a irradiação da proteína facilita a digestão, promovendo aumento no valor nutricional de alimentos à base das principais proteínas do soro do leite e alteração o perfil de peptídeos liberados.

5. CONCLUSÃO

O trabalho em questão buscou investigar o impacto do tratamento não-térmico de luz na região do UV-C (266 nm) nas proteínas majoritárias do soro do leite (β -lactoglobulina e α -lactoalbumina). Isso se deu a fim de atender uma demanda social: o envelhecimento saudável.

Conclui-se que o tratamento não-térmico com luz na região do UV-C (266 nm, 2 h e $\sim 300 \text{ W m}^{-2}$) das proteínas majoritárias do soro do leite influencia em suas estruturas, ainda que de forma sutil, o que tem grande impacto na digestibilidade proteica, principalmente, da β -lactoglobulina. Além disso, o perfil de peptídeos liberados após a digestão é diferente do observado para a proteína nativa, indicando mudanças na biodisponibilidade e bioatividade destes peptídeos. Assim, é relevante investigar futuramente os efeitos do tratamento com luz UV-C (266 nm) de proteínas do soro do leite na nutrição humana por meio do sequenciamento dos peptídeos gerados. Com base nestes dados, confirma-se o potencial do tratamento não-térmico com luz UV-C da β -lactoglobulina como alternativa para a futura produção de alimentos saudáveis, nutritivos e altamente digestíveis.

6. REFERÊNCIAS

- ATAMER, Z., SAMTLEBE, M., NEVE, H., HELLER, J. K., HINRICHS, J. .Review : elimination of bacteriophages in whey and whey products. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1–9, 2013. doi: 10.3389/fmicb.2013.00191
- BARTH, A.. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1767, p. 1073–1101, 2007. doi:10.1016/j.bbabo.2007.06.004
- BEAUDART, C., DAWSON, A., SHAW, S. C., HARVEY, N. C., KANIS, J. A., BINKLEY, N., REGINSTER J. Y., CHAPURLAT R., CHAN, D. C., BRUYÈRE, O., RIZZOLI, R., COOPER, C., DENNISON, E. M. Nutrition and physical activity in the prevention and treatment of sarcopenia: systematic review. **Osteoporosis International**, v. 28, p. 1817–1833, 2017. Doi: 10.1007/s00198-017-3980-9
- BELITZ, H. D. e GROSCH, W. e SCHIEBERLE, P. **Food chemistry**. 4 ed,Heidelberg: Springer-Verlag, 2009.
- BELLOQUE, J. e SMITH, G. M. Thermal Denaturation of β -Lactoglobulin. A 1 H NMR Study. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, n. 5, p. 1805–1813, 1998.
- BELLOQUE, J., CHICÓN, R., LÓPEZ-FANDIÑO. Unfolding and Refolding of β -Lactoglobulin Subjected to High Hydrostatic Pressure at Different pH Values and Temperatures and Its Influence on Proteolysis. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 5282–5288, 2007. Doi: 10.1021/jf070170w
- BEVERLY, R. L. e UNDERWOOD, M. A e DALLAS, D. C. Peptidomics Analysis of Milk Protein-Derived Peptides Released over Time in the Preterm Infant Stomach. **J. Proteome Res.**, p. 912-922, 2019. Doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00604
- BROWNLOW, S., CABRAL, J. H. M., COOPER, R., FLOWER D. R., YEWDALL, J. Y., POLIKARPOV, I., NORTH, A. C. T., SAWYER, L. Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution — still an enigmatic lipocalin. **Structure**, v. 5, n. 4, p. 481–495, 1997.
- CARDOSO, D. R. e LIBARDI, S. H. e SKIBSTED, L. H. Riboflavin as a photosensitizer. Effects on human health and food quality. **Food and Funct.**, v. 3, n. 5, p. 487–502, 2012. Doi: 10.1039/c2fo10246c
- CASTILLO-SANTAELLA, T., SANMARTIN, E., CABRERIZO-VÍLCHEZ, M. A., ARBOLEYA, J. C., MALDONADO-VALDERRAMA, J. Improved digestibility of β -lactoglobulin by pulsed light processing: a dilatational and shear study. **Soft Matter**, v. 10, n. 48, p. 9702–9714, 2014. Doi: 10.1039/c4sm01667j
- COOPER, L. A., BROWN A. L., HOCKING, E. MULLEN, A. C. The role of exercise, milk, dairy foods and constituent proteins on the prevention and management of sarcopenia. **International Journal of Dairy Technology**, v. 69, n. 1, p. 13–21, 2016. doi: 10.1111/1471-0307.12280

- CORREIA, M, NEVES-PETERSEN, M., JEPPESEN, P. B., GREGERSEN, S., PETERSEN, S. B. UV-Light Exposure of Insulin: Pharmaceutical Implications upon Covalent Insulin Dityrosine Dimerization and Disulphide Bond Photolysis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012. Doi: 10.1371/journal.pone.0050733
- DALSGAARD, T. K., OTZEN, D. NIELSEN, J. H., LARSEN, L. B. Changes in Structures of Milk Proteins upon Photo-oxidation. *J. Agric. Food Chem*, v. 55, p. 10968–10976, 2007. Doi: 10.1021/jf071948g
- DEUTZ, N. E. P., BAUER, J. M., BARAZZONI, R., BIOLO, G., BOIRIE, Y. BOSY-WESTPHAL, A., CADERHOM, T., CRUZ-JENTOFT, A., KRZYNARIC, Z., NAIR, SK. S., SINGER, P., TETA, D., TIPTON, K., CALDER, P.C. Protein intake and exercise for optimal muscle function with aging: Recommendations from the ESPEN Expert Group. **Clin Nutr.**, v. 76, p. 211–220, 2012, 2009. doi:10.1016/j.clnu.2014.04.007
- DONG, A., MATSUURA, J., ALLISON S. D., CHRISMAN, E., MANNING, M. C., CARPENTER, J. F. Infrared and Circular Dichroism Spectroscopic Characterization of Structural Differences between -Lactoglobulin A and B †. **Biochemistry**, v. 35, n. 5, p. 1450–1457, 1996.
- DZWOLAK, W., KATO, M., SHIMIZU, A., TANIGUCHI, Y. Fourier-transform infrared spectroscopy study of the pressure-induced changes in the structure of the bovine K -lactalbumin : the stabilizing role of the calcium ion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1433, p. 45–55, 1999.
- ELLMAN, G.L. **Arch Biochem Biophys**, v. 0747, n. 82, p. 70–7, 1959.
- ESPINOZA, J. H. e MERCADO-URIBE, H. Visible light neutralizes the effect produced by ultraviolet radiation in proteins. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 167, p. 15–19, 2017. Doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.11.023
- FENNEMA, O. R., DAMODARAN, S., PARKIN, K. L. **Food Chemistry**, 4 ed, 2008.
- GHOSH, R K., KAR, T., DUTTA, B., PATHAK, A., RAKSHIT, R., BASAK, R., DAS, A., WAHEEDA, K., BASAK, P., BHATTACHARYYA, M. Aberration in the structural paradigm of lens protein a crystallin by UV-C irradiation. **Applied Biological Chemistry**, v. 61, n. 3, p. 281–287, 2018. Doi: 10.1007/s13765-018-0351-y
- GILL, C e HIPPEL, P. H. Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino Acid Sequence Data. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY**, v. 326, p. 319–326, 1989.
- GOMAA, A. I., NSONZI, F., SEDMAN, J., ISMAIL, A. A. Enhanced Unfolding of Bovine β -Lactoglobulin Structure Using Microwave Treatment: a Multi-Spectroscopic Study. **Food Biophysics**, v. 11, n. 4, p. 370–379, 2016. Doi: 10.1007/s11483-016-9451-6

HAYWOOD, J. MOZZICONACCI, O., ALLEGRE, K. M., KERWIN, B. A. Light-induced conversion of trp to gly and gly hydroperoxide in IgG1. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 3, p. 1146–1150, 2013. Doi: 10.1021/mp300680c

HILARIO, E. C., STERN, A., WANG, H.C., et al. An Improved Method of Predicting Extinction Coefficients for the Determination of Protein Concentration. **PDA J Pharm Sci and Tech**, v. 71, p. 127-135, 2017. Doi: 10.5731/pdajpst.2016.007120

HOUCHINS, J. A., CIFELLI, C. J., DEMMER, E., FULGONI, V. L.. Diet modeling in older Americans: The impact of increasing plant-based foods or dairy products on protein intake. **J Nutr Health Aging**, v. 21, n. 6, p. 673–680, 2017.

INSTITUTE OF MEDICINE OF THE NATIONAL ACADEMIES, 2005. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids. Washington, DC. **The National Academies Press**. Doi: 10.17226/10490

JÄRVIE, K., CHATCHATEE, P., BARDINA, L., BEYER, K.. IgE and IgG Binding Epitopes on α Lactalbumin and β -Lactoglobulin in Cow ' s Milk Allergy. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 6574, p. 111–118, 2001.

KEHOE, J. J., REMONDETTO, G. E., SUBIRADE, M., MORRIS, E. R., BRODKORB, A. Tryptophan-Mediated Denaturation of β -Lactoglobulin A by UV Irradiation. **J. Agric. Food Chem**, v.56, p. 4720–4725, 2008. Doi: 10.1021/jf0733158

KOPF-BOLANZ, K., SCHWANDER, F., GIJS, M., VERGÈRES, G. Impact of milk processing on the generation of peptides during digestion. **International Dairy Journal**, v. 35, n. 2, p. 130–138, 2014. Doi: 10.1016/j.idairyj.2013.10.012

KRISTO, E., HAZIZAJ, A., CORREDIG, M. Structural Changes Imposed on Whey Proteins by UV Irradiation in a Continuous UV Light Reactor. **J. Agric. Food Chem**, v. 60, p. 6204-6209, 2012. Doi: 10.1021/jf300278k

KURPIEWSKA, K., BIELA, a., LOCH, J. I., LIPOWSKA, J., SIUDA, M., LEWINSKI, K. Towards understanding the effect of high pressure on food protein allergenicity: β -lactoglobulin structural studies. **Food Chemistry**, v. 270, n. July 2018, p. 315–321, 2019. Doi: 10.1016/j.foodchem.2018.07.104

LEFÈVRE, T e SUBIRADE, M. Molecular Differences in the Formation and Structure of Fine-Stranded and Particulate β -Lactoglobulin Gels. **Biopolymers**, v. 54, p. 578–586, 2000.

LEFÈVRE, T e SUBIRADE, M. Structural and interaction properties of beta-Lactoglobulin as studied by FTIR spectroscopy. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 34, p. 419–428, 1999.

LEVI, C. S., GOLDSTEIN, N., PORTMANN, R., LESMES, U. Emulsion and protein degradation in the elderly: Qualitative insights from a study coupling a dynamic *in vitro* digestion model with proteomic analyses. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 393–401, 2017. Doi: 10.1016/j.foodhyd.2017.02.017

MANDALARI, G., ADEL-PATIENT, K., BARKHOL, V., BARO, C., BENNETT, L., BUBLIN, M., GAIER, S., GRASER, G., LADICS, G.S., MIERZEJEWSKA, D., VASSILOPOULOU, E., VISSERS, Y.M., ZUIDMEER, L., RIGBY N.M., SALT, L.J., DEFERNEZ M., MULHOLLAND, F., MACKIE, A.R., WICKHAM, M.S.J., MILLS, E.N.C. In vitro digestibility of β -casein and β -lactoglobulin under simulated human gastric and duodenal conditions: A multi-laboratory evaluation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 55, n. 3, p. 372–381, 2009. Doi: 10.1016/j.yrtph.2009.08.010

MANZOCCO, L. Photo-Induced Modification of Food Protein Structure and Functionality. **Food Engineering Reviews**, v. 7, n. 3, p. 346–356, 2015. Doi: 10.1007/s12393-015-9110-6

MINEKUS, M., ALMINGER, M., ALVITO, P., BALANCE, S., BOHN, T., BOURLIEU, C., CARRIÈRE, F., BOUTROU, R., CORREDIG, M., DUPONT, D., DUFOUR, C., EGGER, L., GOLDING, M., KARAKAYA, S., KIRKHUS, B., LE FEUNTEUN, S., LESMES, E., MACIERZANKA, A., SANTOS, N. C., SINGH, R. P., VEGARUD, G. E., WICKHAM, M. S. J., WEITSCHIES, W. e BRODKORB, A. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. **Food Funct**, v. 5, n. 5, p. 1113–1124, 2014.

MORO, A., BAÉZ, G. D., BUSTI, P. A., BALLERINI, G. A., DELORENZI, N. J. Effects of heat-treated β -lactoglobulin and its aggregates on foaming properties. **Food hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 1009–1015, 2011. Doi: 10.1016/j.foodhyd.2010.09.021

NEVES-PETERSEN, M. T., KLITGAARD, S., PASCHER, T., SKOVSEN, E., POLIVKA, T., YARTSEV, A., SUNDSTROM, V., PETERSEN, S. B. Flash Photolysis of Cutinase: Identification and Decay Kinetics of Transient Intermediates Formed upon UV Excitation of Aromatic Residues. **Biophysical Journal**, v. 97, n. July, 2009. Doi: 10.1016/j.bpj.2009.01.065

NEVES-PETERSEN, M. T., GAJULA, G. P., PETERSEN, S. B. UV Light Effects on Proteins: From Photochemistry to Nanomedicine. **Molecular Photochemistry – Various Aspects**, 2011.

NIEMI, M., JYLHA, S., LAUKKANEN, M., SÖDERLUND, H., MÄKINEN-KILJUNEN, S., KALLIO, J. M., HAKULINEN, N., HAAHTELA, T., TAKKINEN, K., ROUVINEN, J. Molecular Interactions between a Recombinant IgE Antibody and the β -Lactoglobulin Allergen. **Cell Press**, v. 15, p. 1413–1421, 2007. Doi: 10.1016/j.str.2007.09.012

PATTISON, D. I., RAHMANTO, S., DAVIES, M. J. Photo-oxidation of proteins †. *Photochem. Photobiol. Sci*, v. 11, p. 38–53, 2012. Doi: 10.1039/c1pp05164d

PERAM, M. R., LOVEDAY, S. M., SINGH, H. In vitro gastric digestion of heat-induced

aggregates of β -lactoglobulin. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 1, p. 63–74, 2013. Doi: 10.3168/jds.2012-5896

PEREIRA, R. N. e VICENTE, A. A. Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing. **Food Research International**, v. 43, n. 7, p. 1936–1943, 2010. Doi: 10.1016/j.foodres.2009.09.013

PERMYAKOV, E. A., BERLINER, L. J. α -Lactalbumin: structure and function. **FEBS Letters** **473** v. 473, p. 269–274, 2000.

RAFE, A. e RAZAVI, S. M. A. Effect of Thermal Treatment on Chemical Structure of B - Lactoglobulin and Basil Seed Gum Mixture at Different States by ATR-FTIR Spectroscopy Effect of Thermal Treatment on Chemical Structure of B -Lactoglobulin and Basil Seed Gum Mixture at Different Sta. **International Journal of Food Properties**, v. 18, n. 12, p. 2652–2664, 2015. Doi: 10.1080/10942912.2014.999864

RAHAMAN, T. e VASILJEVIC, T. e RAMCHANDRAN, L. Digestibility and antigenicity of β -lactoglobulin as affected by heat, pH and applied shear. **Food Chemistry**, v. 217, p. 517–523, 2017. Doi: 10.1016/j.foodchem.2016.08.129

RANJBAR, B. e GILL, P. Circular Dichroism Techniques : Biomolecular and Nanostructural Analyses- A Review. **Chem Biol Drug Des**, v. 74, p. 101–120, 2009.

RÉMOND, D., SHAHAR, R., GILLE, D., PINTO, P., KACHAL, J., PEYRON, M., SANTOS, C. N., WALTHER, B., BORDONI, A., DUPONT, D., TOMÁS-COBOS, L., VERGERES, G. Understanding the gastrointestinal tract of the elderly to develop dietary solutions that prevent malnutrition. **Oncotarget**, v. 6, n. 16, p. 13858–13898, 2015. Disponível em: <<http://www.oncotarget.com/fulltext/4030>>.

RODRIGUEZ-GONZALEZ, O., BUCKNOW, R., KOUTCHAMA, T., BALASUBRAMANIAM, V. D. Energy Requirements for Alternative Food Processing Technologies — Principles , Assumptions , and Evaluation of Efficiency. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, 2015. Doi: 10.1111/1541-4337.12142

SIDDIQUE, M. A. B., MARESCA, P., PATARO, G., FERRARI, G. Effect of pulsed light treatment on structural and functional properties of whey protein isolate. **Food Research International**, v. 87, p. 189–196, 2016. Doi: 10.1016/j.foodres.2016.07.017

SILVA, C. O., PETERSEN S. B., REIS, C. P., RIJO, P., MOLPECERES, J., VORUM, H., NEVES-PETERSEN, M. T. Lysozyme photochemistry as a function of temperature. the protective effect of nanoparticles on lysozyme photostability. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–29, 2015.

UNTERSMAYER, E., JENSEN-JAROLIM, E., 2008. The role of protein digestibility and antacids on food allergy outcomes. **J. Allergy Clin. Immunol.** v. 121, n. 6, p. 1301–1308. doi: 10.1016/j.jaci.2008.04.025

VINCENT, G. K. e VELKOF, V. A. The Next Four Decades The older Population in the united states : 2010 to 2050. U.S. **Census Bureau**, 2010.

WIJAYANTI, H. B. e BANSAL, N., DEETH, H. C. Stability of Whey Proteins during Thermal Processing: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 6, p. 1235–1251, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Ageing and health**. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health>>. Acesso em: 5 out 2018.

WU, Y., ZHENG, Y., WANG, D., LIU, Z., DENG, Y. Structural and oxidative modifications, and antioxidant activity of β -lactoglobulin treated by ultraviolet light-C and ultrasound. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 3, p. S3289–S3300, 2018. Doi: 10.1080/10942912.2017.1397695

YANG, H. YANG, S., KONG, J., DONG, A., YU, S. Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy. **Nature Protocols**, v. 10, n. 3, p. 382–96, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25654756>>.

ZEECE, M., HUPPERTZ, T., e KELLY, A.. Effect of high-pressure treatment on in-vitro digestibility of β -lactoglobulin. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 62–69, 2008.

ANEXO I

Deconvolução dos espectros de FTIR na região da amida I ($1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$) da β -lactoglobulina $98,4 \mu\text{M}$ não irradiada ($\beta\text{-Lg_Ni}$) e irradiada por 2 h em 266 nm ($\beta\text{-Lg_I}$) em tampão fosfato $0,01\text{M}$, $\text{pD} = 6,8$ e $I = 0,16 \text{ M}$ de NaCl .

Deconvolução dos espectros de FTIR-ATR na região da amida I, de $1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$, da α -latoalbumina, $124,5 \mu\text{M}$, não irradiada ($\alpha\text{-La_Ni}$) e irradiada ($\alpha\text{-La_I}$) por 2 h em 266 nm e em tampão fosfato $0,01 \text{ M}$, $\text{pD} = 6,8$ e $I = 0,16 \text{ M}$ de NaCl .