



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

**EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA NA  $\beta$ -  
LACTOGLOBULINA: MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS E  
AGREGAÇÃO**

Lucía del Carmen de la Hoz Urrejola

Doutoranda

Profa. Dra. Flávia Maria Netto

Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de  
Campinas para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição

Campinas-SP

2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

H856e Hoz Urrejola, Lucía del Carmen de la  
Efeitos da radiação gama na  $\beta$ -lactoglobulina: modificações  
estruturais e agregação / Lucía del Carmen de la Hoz Urrejola. --  
Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Flávia Maria Netto  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade  
de Engenharia de Alimentos.

1. Dicroísmo circular. 2. Proteínas – Agregação. 3. Raios X –  
Espalhamento a baixo ângulo. 4. Soro do leite – Proteínas. I. Netto,  
Flávia Maria. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de  
Engenharia de Alimentos. III. Título.

Título em inglês: Gamma radiation effects on  $\beta$ -lactoglobulin: structural modifications  
and aggregation

Palavras-chave em inglês (Keywords): Circular dichroism, Proteins – Aggregation,  
X-ray – Small-angle scattering, Whey – Proteins

Área de concentração: Nutrição Experimental Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Doutor em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Flávia Maria Netto

Valdemiro Carlos Sgarbieri

Íris Torriani

Francisco Teixeira Pessine

Maria Teresa Bertoldo Pacheco

Susy Frei Sabato

Programa de Pós Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

Lucía del Carmen de la Hoz Urrejola

**EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA NA  $\beta$ -  
LACTOGLOBULINA: MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS E  
AGREGAÇÃO**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição

Profa. Dra. Flávia Maria Netto

Orientadora

Campinas -SP  
2006



## **BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Dra. Flávia Maria Netto**  
(ORIENTADORA) – DEPAN/FEA/UNICAMP

---

**Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri**  
(MEMBRO) – DEPAN/FEA/UNICAMP

---

**Profa. Dra. Íris Torriani**  
(MEMBRO) – IFGW/UNICAMP

---

**Prof. Dr. Francisco Teixeira Pessine**  
(MEMBRO) – IQM/UNICAMP

---

**Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco**  
MEMBRO) – ITAL

---

**Dra. Susy Frey Sabato**  
(MEMBRO) – IPEN



*Em especial, dedico:*

***As minhas filhas***  
*como símbolo de um novo*  
*recomeço na minha vida*



## **AGRADECIMENTOS**

*Aos professores e funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos pela oportunidade de aprendizado e apoio na realização de meu trabalho.*

*À Profa. Flavia Maria Netto pela orientação, pelo apoio constante e pela confiança e oportunidade de desenvolver a minha tese.*

*À Profa. Dra. Íris Torriani pela sua paciência, atenção e ajuda no propósito da utilização do Laboratório de luz Síncrotron, pela sua colaboração no projeto e pelos ensinamentos sobre a técnica de SAXS.*

*À Cristiano de Oliveira pela sua valiosa colaboração nas análises de SAXS, e pelas discussões esclarecedoras.*

*Ao Prof. Dr. Francisco Pessine pela sua pronta disposição para esclarecer dúvidas e pela ajuda indispensável na correção da tese.*

*À Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco pela sua cooperação na preparação e discussão do projeto de tese.*

*Ao Prof. Dr. Valdemiro Sgarbieri pelos ensinamentos e por partilhar comigo suas idéias e opiniões.*

*A todos os membros da banca examinadora pelas valiosas correções e sugestões que permitiram aperfeiçoar este trabalho.*

*À Profa. Débora Tavares pela amizade, confiança e pelos seus conselhos e constante apoio durante o tempo da realização de meu trabalho. Obrigada pelas jornadas musicais disfrutadas juntas.*

*Ao Prof. Carlos Grosso pelo estímulo, e pela atenção dispensada em todo momento que precisei de sua experiência e conhecimentos.*



*Ao IPEN, na pessoa de Elizabeth Somessari e Carlos Gaia pela atenção e responsabilidade em atender ao nosso pedido de realizar a irradiação de nossas amostras.*

*Ao CENA-USP /ESALQ, na pessoa do Prof. Dr. Julio Walder que disponibilizou os equipamentos para a irradiação e à Gilberto Furlan pela sua pronta colaboração na irradiação de nossas amostras.*

*À Profa. Dra. Eneida de Paula do Instituto de Biologia- Unicamp por disponibilizar o seu laboratório para as determinações de fluorescência.*

*À Daniel Rezza pela sua disposição e ajuda na realização das análises de dicroísmo circular e discussões afins.*

*Às colegas do laboratório de Bioquímica, Eliana, Beth, Duda, Soninha, Liz, Andréia, Mariza, Bete, pelos bons momentos partilhados, pelo apoio, amizade e carinho que me permitiram uma estadia inesquecível e proveitosa enquanto a realização de meu trabalho.*

*À Suzi pela amizade, bons momentos partilhados e pela ajuda nas análises estatísticas.*

*Ao Chico pelo apoio nas análises no laboratório central de instrumentação e pelas discussões esclarecedoras.*

*Á Florencia, Bia, Maria Inés, Nonó, mis queridas amigas, gracias por la amistad, incentivo y lindos momentos compartidos.*

*À meu amigo Guillermo pelo incentivo e constante apoio, obrigada pelos ensinamentos e pelos cafezinhos disfrutados e “discutidos” juntos.*

*Ào CNPq pela bolsa de doutorado concedida.*

*À Davisco por ternos proporcionado a matéria prima para nosso trabalho*

*A todos os que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta tese.*

*À minhas filhas que me compreenderam e apoiaram nesta nova empreitada.*



## ÍNDICE

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xxi</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xxix</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xxxiii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1. Geral.....</b>	<b>6</b>
<b>2.2. Específicos.....</b>	<b>6</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1. Proteínas de soro de leite.....</b>	<b>8</b>
<b>3.2. <math>\beta</math>-lactoglobulina.....</b>	<b>9</b>
<b>3.2.1. Características estruturais.....</b>	<b>9</b>
<b>3.2.1.1. Estrutura primária e secundária.....</b>	<b>9</b>
<b>3.2.1.2. Estrutura terciária.....</b>	<b>9</b>
<b>3.2.2. Relação estrutura-função.....</b>	<b>10</b>
<b>3.2.2.1. Estrutura e propriedades tecnológicas.....</b>	<b>10</b>
<b>3.2.2.2. Estrutura e propriedades fisiológicas.....</b>	<b>13</b>
<b>3.2.3. Digestibilidade da <math>\beta</math>-LG.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2.4. Propriedades antigênicas e alergênicas.....</b>	<b>14</b>
<b>3.3. Efeito do processamento na estrutura e nas propriedades da <math>\beta</math>-LG.....</b>	<b>15</b>
<b>3.3.1. Influência do pH.....</b>	<b>17</b>
<b>3.3.2. Efeito do aquecimento.....</b>	<b>18</b>
<b>3.3.3. Influência da alta pressão hidrostática.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3.4. Efeitos da irradiação gama.....</b>	<b>20</b>



<b>3.4. Técnicas analíticas para análise estrutural de proteínas em solução.....</b>	<b>22</b>
<b>3.4.1. Dicroísmo Circular (CD).....</b>	<b>23</b>
<i>Informação estrutural a partir de CD.....</i>	<i>24</i>
<i>Espectro de CD no UV-longínquo.....</i>	<i>25</i>
<i>Espectro de CD no UV-próximo.....</i>	<i>26</i>
<b>3.4.2. Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS).....</b>	<b>27</b>
<b>3.4.3. Fluorescência .....</b>	<b>29</b>
<i>Fluorescência intrínseca de proteínas e peptídeos.....</i>	<i>30</i>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
<b>4.1. Material e reagentes.....</b>	<b>34</b>
<b>4.2. Métodos.....</b>	<b>35</b>
<b>4.2.1. Delineamento experimental.....</b>	<b>35</b>
<b>4.2.2. Irradiação.....</b>	<b>35</b>
<b>4.2.3. Proteólise enzimática.....</b>	<b>36</b>
<b>4.2.4. Métodos espectrofotométricos .....</b>	<b>36</b>
<i>Dicroísmo Circular (CD).....</i>	<i>36</i>
<i>Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS).....</i>	<i>37</i>
<i>Grupos tiol (-SH) livres totais.....</i>	<i>37</i>
<i>Fluorescência.....</i>	<i>37</i>
<i>Espectrofotometria de UV e Visível.....</i>	<i>38</i>
<b>4.2.5. Métodos cromatográficos.....</b>	<b>39</b>
<i>Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa.....</i>	<i>39</i>
<i>Cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular.....</i>	<i>39</i>
<b>4.2.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2.7. Isotermas de sorção.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2.8. Análises estatísticas.....</b>	<b>40</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>5.1. Caracterização da <math>\beta</math>-LG.....</b>	<b>42</b>



<b>5.2. Efeitos da radiação gama na <math>\beta</math>-LG.....</b>	<b>44</b>
<b>5.2.1. Mudanças estruturais.....</b>	<b>44</b>
<i>Fluorescência intrínseca.....</i>	<i>44</i>
<i>Dicroísmo circular.....</i>	<i>48</i>
<i>Grupos sulfidril livre.....</i>	<i>59</i>
<b>5.2.2. Agregação.....</b>	<b>61</b>
<i>Turbidez medida pela transmitância a 550 nm.....</i>	<i>61</i>
<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....</i>	<i>62</i>
<i>Cromatografia de exclusão molecular (SE-HPLC).....</i>	<i>64</i>
<i>SAXS.....</i>	<i>67</i>
<b>5.2.3. Mecanismos de agregação.....</b>	<b>83</b>
<i>Eletroforese em gel (SDS-PAGE).....</i>	<i>84</i>
<i>Fluorescência de ligações cruzadas de bitirosil.....</i>	<i>85</i>
<b>5.2.4. Mudanças na funcionalidade.....</b>	<b>87</b>
<i>Poder ligante do retinol.....</i>	<i>87</i>
<i>Susceptibilidade às proteases.....</i>	<i>88</i>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>93</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>99</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>101</b>



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Condições experimentais do tratamento de irradiação das amostras de $\beta$ -LG sólida e nomenclatura das amostras.....	<b>35</b>
<b>Tabela 2.</b> Condições experimentais do tratamento de irradiação das amostras de $\beta$ -LG em solução e nomenclatura das amostras	<b>35</b>
<b>Tabela 3.</b> Conteúdo de estrutura secundária da amostra não irradiada, COA1, obtido por diferentes métodos de deconvolução do seu espectro de UV-longínquo.....	<b>49</b>
<b>Tabela 4.</b> Conteúdo de estrutura secundária da $\beta$ -LG no estado nativo, reportados na literatura.....	<b>49</b>
<b>Tabela 5.</b> Conteúdo de estrutura secundária de amostras de $\beta$ -LG irradiada sólida.....	<b>52</b>
<b>Tabela 6.</b> Conteúdo de estrutura secundária da $\beta$ -LG irradiada em solução (3mg/mL e 10mg/mL).....	<b>56</b>
<b>Tabela 7.</b> Teor de grupos sulfidríla (-SH) livre em amostras de $\beta$ -LG não irradiada e irradiada sólida ( $a_w$ 0,22; 0,53 e 0,74) e irradiada em solução (3 e 10 mg/mL). Dose de radiação em kGy. Resultados expressos como : moles-SH / mol de $\beta$ -LG.....	<b>60</b>
<b>Tabela 8.</b> Transmitância (%) medida a $\lambda=550$ nm da $\beta$ -LG não irradiada e irradiada sólida ( $a_w$ s 0,22; 0,53 e 0,74) lida em solução (10 mg/mL) em tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7,0) e $\beta$ -LG irradiada em solução de tampão fosfato (10 mM, pH 7,0) a 3 e 10(mg/mL), lida nestas mesmas concentrações.....	<b>62</b>
<b>Tabela 9.</b> Parâmetros estruturais obtidos nas medidas experimentais de espalhamento de raios-X da $\beta$ -LG submetida a diversas doses de radiação gama, na forma sólida.....	<b>71</b>
<b>Tabela 10.</b> Parâmetros estruturais obtidos nas medidas experimentais de espalhamento de raios-X da $\beta$ -LG submetida a diversas doses de radiação gama, em solução.....	<b>78</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama em fitas da $\beta$ -lactoglobulina, indicando as posições de substituição dos aminoácidos nas isoformas A e B.....	10
<b>Figura 2.</b> Esquema mostrando as partes de um espectropolarímetro.....	24
<b>Figura 3.</b> Espectro padrão de 100 % de folhas $\beta$ , 100% de hélices- $\alpha$ e 100% de estruturas randômicas.....	25
<b>Figura 4.</b> Diagrama de Jablonski para o sistema de níveis de energia, utilizando uma molécula de benzeno. <u>S0</u> é o nível fundamental; <u>S1</u> é o nível denominado singlete do qual quando o elétron volta ao nível fundamental emite luz fluorescente.....	29
<b>Figura 5.</b> Perfil eletroforético da $\beta$ -LG ( $a_w$ :0,22); A: PAGE e B: SDS-PAGE, em gel de poliacrilamida de 12,5%. Linha 1: padrão massa molar da Pharmacia (14,4-94 kDa), linha 2: amostra de $\beta$ -LG-0,22. ....	42
<b>Figura 6.</b> Cromatograma de RP-HPLC da $\beta$ -LG ( $a_w$ =0,22). Aliquotas de 20 $\mu$ L de solução de $\beta$ -LG (0,5 mg/mL em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0) foram injetados numa coluna $C_{18}$ equilibrada a 40°C. A eluição foi feita com fluxo de 1,0 mL/min em gradiente de acetonitrila e a absorbância monitorada a 214 nm.....	43
<b>Figura 7.</b> Isoterma de sorção da $\beta$ -LG a 25°C.....	44
<b>Figura 8.</b> Espectros de fluorescência intrínseca da $\beta$ -LG irradiada sólida com 0, 10, 25 e 50 kGy. (A) Amostras ( $a_w$ 0,22) C0A1, C10A1, C25A1 e C50A1; (B) ( $a_w$ 0,53), amostras C0A2, C10A2 C25A2 e C50A2; e (C) ( $a_w$ 0,74), amostras C0A3, C10A3, C25A3 e C50A3.....	45
<b>Figura 9.</b> Espectro de fluorescência intrínseca da $\beta$ -LG irradiada em solução com 0, 10, 25 e 50 kGy: (A) (10mg/mL) amostras C0S10, C10S10, C25S10, C50S10 e (B): $\beta$ -LG (3mg/mL) amostras C0S3, C10S3, C25S3 e C50S3. $\lambda_{exc}$ =280 nm e $\lambda_{emiss}$ = 300-450 nm.....	46
<b>Figura 10.</b> Espectros de UV-longínquo da $\beta$ -LG ( $a_w$ = 0,22), não irradiada (C0A1), irradiada sólida com dose de 10 kGy (C10A1) e com 50 kGy (C50A1).....	51
<b>Figura 11.</b> Espectros de UV-longínquo da $\beta$ -LG ( $a_w$ = 0,53), não irradiada (C0A2), irradiada sólida com 10 kGy (C10A2) e com 50 kGy (C50A2).....	51
<b>Figura 12.</b> Espectros de UV-longínquo da $\beta$ -LG ( $a_w$ = 0,74), não irradiada (C0A3), irradiada sólida com 10 kGy (C10A3) e com 50 kGy (C50A3).....	52
<b>Figura 13.</b> Espectro no UV-próximo da $\beta$ -LG com $a_w$ 0,22, não irradiada (C0A1), irradiada com 10 kGy (C10A1) e com 50 kGy (C50A1).).....	53
<b>Figura 14.</b> Espectro no UV-próximo da $\beta$ -LG $a_w$ 0,53, não irradiada (C0A2), irradiada com 10 kGy (C10A2) e com 50 kGy (C50A2).....	53



<b>Figura 15.</b> Espectro no UV-próximo da $\beta$ -LG $a_w$ 0,74, não irradiada (C0A3), irradiada com 10 kGy (C10A3) e com 50 kGy (C50A3).....	<b>54</b>
<b>Figura 16.</b> Espectro no UV-longínquo da $\beta$ -LG irradiada em solução em concentração de 10 mg/mL, não irradiada (C0S10) e irradiadas com 10 kGy (C10S10) e 50 kGy (C50S10).....	<b>54</b>
<b>Figura 17.</b> Espectro no UV-longínquo da $\beta$ -LG irradiada em solução em concentração de 10 mg/mL, não irradiada (C0S10) e irradiadas com 10 kGy (C10S10) e 50 kGy (C50S10).....	<b>55</b>
<b>Figura 18.</b> Espectro do dicroísmo circular no UV-longínquo (a) e UV-próximo (b) de $\beta$ -LG. (1) $\beta$ -LG dímero na sua forma nativa, antes do aquecimento; e (2), (3) e (4), produtos formados após aquecimento até 85°C e isolados por filtração em gel (2) dímero metaestável; (3) oligômeros; (4) agregados. Ref: Carrota et al. (2001).....	<b>57</b>
<b>Figura 19.</b> Espectro de CD no UV-próximo da $\beta$ -LG irradiada em solução em concentração de 10 mg/mL, não irradiada (C0S10) e irradiada com 10 kGy (C10S10) e 50 kGy (C50S10)....	<b>58</b>
<b>Figura 20.</b> Espectro de CD no UV-próximo da $\beta$ -LG irradiada em solução em concentração de 3mg/mL, não irradiada (C0S3) e irradiada com 10 kGy (C10S3) e 50 kGy (C50S3).....	<b>58</b>
<b>Figura 21.</b> Eletroforese em gel, PAGE, da $\beta$ -LG irradiada na forma de pó. (A) e (D): $\beta$ -LG $a_w$ 0,22. (B) e (E): $\beta$ -LG $a_w$ 0,53. (C) e (F): $\beta$ -LG $a_w$ 0,74. Em (A), (B), (C), (D), (E) e (F) a linha 1 corresponde ao padrão de massa molar de proteínas da Pharmacia (14,4-94 kDa). Em (A), (B) e (C) as linhas 2, 3, 4, 5 e 6 correspondem às amostras de $\beta$ -LG irradiadas com doses de: 10; 5; 2,5; 1 e 0 kGy respectivamente. Em (D), (E) e (F), a linha 2 corresponde à dose de radiação de 50 kGy e a linha 3 a 25 kGy.....	<b>63</b>
<b>Figura 22.</b> Perfil eletroforético nativo PAGE das amostras de $\beta$ -LG irradiadas em solução. (A): $\beta$ -LG irradiada em solução 3mg/mL; (B): $\beta$ -LG irradiada em solução 10mg/mL. Em (A) e (B) a linha 1 corresponde ao padrão de massa molar de proteínas da Pharmacia (14,4-94 kDa); a linha 2, 3, 4, 5 e 6 à $\beta$ -LG irradiada com doses de: 10; 5; 2,5; 1 e 0 kGy.....	<b>64</b>
<b>Figura 23.</b> Perfil de SE-HPLC da $\beta$ -LG ( $a_w$ =0,22) irradiada sólida com doses de 0; 5; 10; 25 e 50 kGy.....	<b>65</b>
<b>Figura 24.</b> Perfil SE-HPLC da $\beta$ -LG (10mg/mL), amostra não irradiada (C0S10) e irradiadas com 5 kGy (C5S10), 10 kGy (C10S10), 25 kGy (C25S10) e 50 kGy (C50S10).....	<b>66</b>
<b>Figura 25.</b> Perfil SE-HPLC da $\beta$ -LG (3mg/mL), amostra não irradiada (C0S3) e irradiadas com 5 kGy (C5S3), 10 kGy (C10S3), 25 kGy (C25S3) e 50 kGy (C50S3).....	<b>67</b>
<b>Figura 26.</b> Caracterização por SAXS das amostras de $\beta$ -LG não irradiadas (amostras controle) (A): curva de intensidade de espalhamento, (B): função de distribuição de distâncias, (C): gráfico de Kratky e (D): curva de ajuste com dados cristalográficos. As amostras de $\beta$ -LG analisadas foram : C0A1; C0A2 e C0A3.....	<b>69</b>
<b>Figura 27.</b> Descrição de gráficos A, B, C e D e de amostras de $\beta$ -LG como em Figura 26, somente que as amostras foram submetidas a 5,0 kGy de dose de radiação gama.....	<b>70</b>



<b>Figura 28.</b> Descrição de gráficos A, B, C e D e de amostras de $\beta$ -LG como na Figura 26, somente que as amostras foram submetidas a 10,0 kGy de dose de radiação.....	<b>72</b>
<b>Figura 29.</b> Descrição de gráficos A, B, C e D e de amostras de $\beta$ -LG como em Figura 26, somente que as amostras foram submetidas a 25,0 kGy.....	<b>73</b>
<b>Figura 30.</b> Descrição de gráficos A, B, C e D e de amostras de $\beta$ -LG como em Figura. 26. As amostras foram submetidas a 50,0 kGy de radiação gama.....	<b>74</b>
<b>Figura 31. A:</b> curva de intensidade de espalhamento, <b>B:</b> função de distribuição de distâncias, <b>C:</b> gráfico de Kratky e <b>D:</b> curva de ajuste com dados cristalográficos. Amostras de $\beta$ -LG em solução de tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7,0) em concentração de proteína de 3 mg/mL e 10 mg/mL, não irradiada.....	<b>75</b>
<b>Figura 32.</b> Descrição de gráficos A, B, C e D como em Figura 26. Amostras de $\beta$ -LG irradiadas em solução em tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7,0) em concentração de 3mg/mL e 10 mg/mL, irradiadas com dose de 5 kGy.....	<b>76</b>
<b>Figura 33.</b> Descrição de gráficos <b>A, B, C e D</b> como em Figura 26. Amostras de $\beta$ -LG em solução em tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7,0) em concentração de 3 mg/mL e 10 mg/mL, irradiadas com dose de 10 kGy.....	<b>77</b>
<b>Figura 34.</b> Ensaio de modelagem da amostra $\beta$ -LG (10 mg/mL) irradiada com dose de 5 kGy	<b>80</b>
<b>Figura 35.</b> Modelo de oligômero para a amostra C5S10.....	<b>80</b>
<b>Figura 36.</b> Ensaio de modelagem da amostra C10S10.....	<b>81</b>
<b>Figura 37.</b> Modelo de oligômero para a amostra C10S10.....	<b>81</b>
<b>Figura 38.</b> Ensaio de modelagem da amostra $\beta$ -LG (3mg/mL) irradiada com dose de 5 kGy....	<b>82</b>
<b>Figura 39.</b> Modelo de oligômero para a amostra $\beta$ -LG-L3 irradiada com 5 kGy.....	<b>83</b>
<b>Figura 40.</b> Caracterização da $\beta$ -LG irradiada em solução (3 mg/mL) usando SDS-PAGE: (A), sem redutor e (B) com $\beta$ -mercaptoetanol. Linhas 1, 2, 3, 4, 5, 6, e 7, doses de radiação de 0; 1; 2,5; 5, 10, 25 e 50 kGy. Linha 8, padrão de massa molar de proteínas (14,4-94,0 kDa).....	<b>84</b>
<b>Figura 41.</b> Espectro de fluorescência de “bitirosil” da amostra de $\beta$ -LG irradiada em solução (C25S3).....	<b>85</b>
<b>Figura 42.</b> Intensidade de fluorescência de bitirosil (ligações cruzadas) em amostras de $\beta$ -LG não irradiadas e em amostras irradiadas sólidas e em solução em concentração de 10 e 3 mg/mL ( $\lambda_{exc}$ 325nm, $\lambda_{emis}$ 411nm). Dentro de cada grupo de amostras (mesma $a_w$ ou mesma concentração em mg/mL), colunas com letras iguais não diferem significativamente entre si ao nível de 5%. Nas colunas com igual cor (correspondentes a uma mesma dose de radiação) valores com o mesmo número não diferem significativamente entre si ao nível de 5% (teste de Tukey).....	<b>86</b>



<b>Figura 43.</b> Curvas de titulação de fluorescência do retinol ligado à $\beta$ -LG; $\lambda_{exc}=330$ nm e $\lambda_{emiss}=470$ nm.....	<b>88</b>
<b>Figura 44.</b> Cromatograma de fase reversa (RP-HPLC) do branco sem tripsina (1) e dos hidrolisados trípticos (2) da $\beta$ -LG ( $a_w$ 0,22) irradiada com 25 kGy (C25A1). Eluição feita a 1mg/mL com gradiente de acetonitrila/água e temperatura de coluna de 40°C.....	<b>89</b>
<b>Figura 45.</b> Cromatograma de fase reversa (RP-HPLC) do hidrolisado péptico da $\beta$ -LG ( $a_w=0,22$ ) irradiada com 25 kGy (C25A1). Eluição feita a 1mg/mL com gradiente de acetonitrila/água e temperatura de coluna de 40°C.....	<b>90</b>
<b>Figura 46.</b> Áreas dos cromatogramas correspondentes à peptídeos formados pela ação da pepsina na $\beta$ -LG irradiada a diferentes dose (0; 10, 25, e 50 kGy). Numa mesma dose de radiação, colunas com letras iguais não diferem significativamente ao nível de 5%. Nas colunas com igual cor (correspondente a uma mesma $a_w$ ) números iguais indicam que elas não diferem significativamente entre si ao nível de 5% (teste de Tukey).....	<b>91</b>
<b>Figura 47</b> Absorbância a 280nm dos sobrenadantes das amostras de $\beta$ -LG irradiadas e hidrolisadas com pepsina, após precipitação com TCA da proteína intacta. Numa mesma dose de radiação, colunas com letras iguais não diferem significativamente ao nível de 5%. Nas colunas com igual cor (correspondente a uma mesma $a_w$ ) números iguais indicam que elas não diferem significativamente entre si ao nível de 5% (teste de Tukey).....	<b>91</b>



## Efeitos da radiação gama na $\beta$ -lactoglobulina: modificações estruturais e agregação

### RESUMO

Amostras de  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG) no estado sólido, com diferentes atividades de água ( $a_w$ ) (0,22; 0,53; 0,74), ou em solução, em concentração de proteína de 3 e 10 mg/mL, foram irradiadas (1-50 kGy) utilizando uma fonte de Cobalto-60. Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS), difração circular (CD) e fluorescência foram as técnicas utilizadas para estudar as mudanças conformacionais da  $\beta$ -LG por efeito da irradiação. A proteína irradiada foi também examinada por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e desnaturante (SDS-PAGE) sob condições redutoras e não redutoras, cromatografia de exclusão molecular (SE-HPLC) e -SH livre. A  $\beta$ -LG no estado sólido nas diferentes  $a_w$  estudadas não foi afetada pela irradiação. As amostras não apresentaram diminuição na digestibilidade sob ação da pepsina e tripsina e não mudaram seu poder ligante de retinol quando irradiadas com doses até 10 kGy. Nas amostras irradiadas em solução, houve modificações estruturais, ao nível de estrutura terciária, enquanto a estrutura secundária parece ter sido preservada, como indicado pela quantificação das estruturas obtidas a partir da deconvolução dos espectros de CD no UV-longínquo. Os dados de SE-HPLC e espalhamento de raios-X mostraram que a irradiação promoveu a formação de oligômeros e agregados, que resultaram ser altamente solúveis, como mostrado pelas medidas de turbidez. Da análise dos dados de SAXS e a construção de modelos pode ser mostrado que os oligômeros eram múltiplos de dímeros de  $\beta$ -LG, (tetrâmeros e hexâmeros, etc.), linearmente ordenados. Ligações cruzadas intermoleculares entre radicais tirosil teriam participação na agregação e as ligações dissulfeto, pelo contrário, não teriam sido relevantes para a formação dos agregados. O mecanismo de agregação da  $\beta$ -LG mediante ligações cruzadas de bitirosil, contrário ao que acontece em outros tratamentos físicos, como o térmico ou de alta pressão hidrostática, poderia estar gerando agregados com características e propriedades diferentes. O efeito da irradiação na proteína foi maior nas amostras mais diluídas e com maior dose de radiação, indicação da ocorrência do chamado “efeito indireto” da irradiação. Considerando que não houve alterações estruturais, nem perda de funcionalidade ou de digestibilidade da  $\beta$ -LG irradiada no estado sólido até com 10 kGy em diferentes  $a_w$ , o tratamento com radiação gama poderia ser usado para melhorar a



qualidade microbiológica da proteína e aumentar as condições de segurança se for aplicada uma radiação na faixa geralmente utilizada no processamento de alimentos (<10 kGy).

**Palavras chave:** *Dicroísmo circular; complexo  $\beta$ -lactoglobulina-retinol; agregação de proteína; espalhamento de raios-X a baixos ângulos; proteínas do soro de leite.*



## **Gamma radiation effects on $\beta$ -lactoglobulin: structural modifications and aggregation**

### **ABSTRACT**

$\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -LG) in solution at different protein concentrations (3 and 10 mg/mL) and in solid state, with different water activity ( $a_w$ ) (0.22; 0.53; 0.74), was irradiated using a Cobalt-60 radiation source at a dose level of 1-50 kGy. Small-angle X-ray scattering (SAXS), Circular Dichroism (CD) and Fluorescence spectroscopy were used to study the conformational changes of  $\beta$ -LG due the irradiation treatment. The irradiated protein was also examined by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and sodium dodecyl sulfate (SDS) PAGE under reducing and nonreducing conditions, size exclusion chromatography (SE-HPLC), and free SH.  $\beta$ -LG in the solid state, at different  $a_w$ , was not significantly affected by gamma radiation. The digestibility of these samples under pepsin or trypsin action was not diminished, and the retinol binding property was not changed by irradiation up to 10 kGy. The irradiation of  $\beta$ -LG in solution promoted structural changes at the tertiary structure level but the secondary structure seemed to be maintained, as indicated by the quantification of structures from the deconvolution of the far-UV CD spectra. The SE-HPLC, and X-rays scattering data showed that irradiation of  $\beta$ -LG solutions promoted oligomers and aggregates formation, which proved to be highly soluble, as shown by turbidity measurements. From the SAXS data analyses and the model building it could be shown that the formed oligomers were linear molecules, built by linear combinations of  $\beta$ -LG dimers (tetramers, hexamers, etc.). Formation of intermolecular cross-linking between tyrosil radicals are proposed to be at least partially responsible by this occurrence, and the disulphide bonds, in contrast, do not appear to be relevant to the formation of these aggregates. The mechanism of aggregation of  $\beta$ -LG through bityrosil cross-links, differently from the mechanism occurring in other physical treatments as heating or high pressure, could form aggregates with special and different characteristics. The radiation effect was more significant at low protein concentration and higher irradiation dose, being consistent with the occurrence of the "indirect effect" when proteins are irradiated in solution. Considering that neither structural changes or loss of functionality and digestibility of  $\beta$ -LG irradiated in the solid state at different  $a_w$ , with dose up to 10 kGy, was detected, the gamma radiation treatment could be used for improving the microbiological quality of



the protein, enhancing the safety conditions when applying the radiation range generally used in food processing (<10kGy).

**Keywords:** *Circular dichroism; retinol- $\beta$ -lactoglobulin complex; aggregation of protein; small-angle X-ray scattering; protein digestibility; whey.*



## **1. INTRODUÇÃO**

## **1. INTRODUÇÃO**

O soro de leite bovino foi considerado em décadas passadas como resíduo industrial altamente poluente proveniente da fabricação do queijo. Atualmente, é uma fonte proteica de grande importância, que possui excelentes propriedades nutritivas e funcionais. Como resultado de inúmeros estudos realizados, novos conhecimentos sobre as propriedades tecnológicas e fisiológicas de suas proteínas constituintes têm contribuído para incrementar a sua aplicação como ingrediente alimentício. Os concentrados de proteína do soro constituem uma importante fonte de ingredientes funcionais utilizados em diversas formulações alimentares, incluindo carnes processadas, produtos lácteos e de panificação (KINSELLA; WHITEHEAD, 1989; DE WIT, 1998; HUFFMAN; HARPER, 1999).

A  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG) é a principal proteína do soro de leite bovino, constituindo ao redor de 50% do seu total, pelo que tende a comandar o comportamento geral do sistema de proteínas de soro (PALAZOLO et al., 2000). A sua estrutura particular, do tipo lipocalina, apresenta uma espécie de cálice de caráter hidrofóbico, o qual lhe confere propriedades funcionais de grande importância para a indústria de alimentos, como a capacidade de emulsificação, formação de espuma, geleificação e de ligação com aromatizantes (MORR; FOEGEDING, 1990). Com o desenvolvimento do processo de ultrafiltração com membranas, ela pode ser obtida na sua forma nativa, em grandes quantidades e com alto grau de pureza (MAUBOIS et al., 1987; IMAFIDON; FARKYE; SPANIER, 1997; HUFFMAN; HARPER, 1999).

A estrutura da  $\beta$ -LG contribui para que ela seja uma proteína bastante estável em solução em um amplo intervalo de pH apresentando, no entanto, diferentes estados de associação (TAULIER; CHALIKIAN, 2001). Pela sua característica estrutural, a  $\beta$ -LG é uma proteína especialmente resistente à proteólise pela pepsina e quimotripsina (REDDY; KELLA; KINSELLA, 1988). A  $\beta$ -LG é considerada como a proteína com maior potencial alergênico dentre as proteínas do leite (SPIES, 1973; OTANI; UCHIO; TOKITA, 1985, SÉLO et al., 1999).

A  $\beta$ -LG é uma proteína termosensível e o aquecimento, geralmente utilizado no processamento de alimentos com diversas finalidades, pode ocasionar desnaturação. Alterações na estrutura da proteína podem alterar sua funcionalidade e tratamentos aplicados no processamento têm o potencial de transformar a estrutura nativa em estados não nativos. (FARREL et al., 2002). Alguns efeitos indesejáveis podem surgir, como a perda de solubilidade, porém, um tratamento controlado pode também originar efeitos

desejáveis, tais como uma melhora nas propriedades funcionais de superfície (espumante e emulsificantes) (IBRAHIM; KOBAYASHY; KATO, 1993).

A descontaminação de alimentos pela radiação ionizante é um processo seguro, eficiente e ambientalmente limpo (FARKAS, 1998). Tem sido uma das tecnologias mais discutidas e polêmicas dos últimos anos, no entanto, está aprovada em 37 países (BRENNAND, 1995). A irradiação com raios gama é um tratamento que vem sendo utilizado como meio de diminuir a carga microbiana de diversos alimentos, proporcionando maior vida de prateleira. A radiação gama, em dose que atenda ao requisito de pasteurização poderia levar vantagem sobre o tratamento térmico, ao evitar a exposição da proteína a temperaturas que conhecidamente estariam causando efeitos deletérios afetando suas propriedades funcionais. Além disso, o tratamento permite a aplicação direta da radiação na sua embalagem final (FARKAS, 1998).

Existe também grande potencial de aplicação da radiação para propósitos tecnológicos, como por exemplo, a obtenção de melhorias na cor de produtos cárneos (BYUN et al., 1999) e das propriedades mecânicas de filmes comestíveis biodegradáveis desenvolvidos com proteínas (BRAULT; D'APRANO, LACROIX, 1997; SABATO et al., 2001; LETENDRE et al., 2002). Biofilme obtido de soluções de proteínas de soro de leite irradiadas exibiu melhores propriedades que os obtidos por tratamento térmico (LE TIEN et al., 2000). A radiação ionizante também tem sido estudada como meio para reduzir a imunogenicidade de alguns alérgenos do leite como a  $\beta$ -lactoglobulina (LEE et al., 2001).

No entanto, faltam estudos sobre o efeito da irradiação na estrutura e processo de agregação, essenciais para o entendimento e controle de suas propriedades tecnológicas e nutricionais. Para explicar a mudança conformacional e o comportamento na desnaturação da proteína é necessário o conhecimento completo da sua estrutura. No caso da  $\beta$ -LG, tem-se informações detalhadas da sua estrutura, seja por difração de raios-X da proteína cristalizada ou por Ressonância Nuclear Magnética (NMR) da proteína em solução. As macromoléculas em solução apresentam importantes efeitos de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS), que permitem determinar várias características geométricas, tais como raio de giro, dimensão máxima, volume, superfície molecular e curvas de distribuição de distâncias intramoleculares, relacionadas com a forma da molécula (PESSON, KUMOSINSKI; TIMASHEFF, 1971; WITZ, TIMASHEFF; LUZZATI, 1964). Estes efeitos permitem caracterizar o estado conformacional da proteína e suas alterações decorrentes dos diversos tratamentos.

As técnicas de SAXS e de dicroísmo circular têm sido utilizadas com sucesso nas análises dos estados de associação da  $\beta$ -LG induzidos por sais (BALDINI et al., 1999) e das características de oligômeros isolados resultantes de tratamento térmico da  $\beta$ -LG (CARROTA et al., 2001, 2003). A desnaturação e agregação da  $\beta$ -LG induzida por pressão e temperatura foram também monitoradas por SAXS em estudo de Panick, Malessa e Winter (1999).

Este estudo tem como objetivo avaliar as mudanças conformacionais da proteína por efeito da radiação gama e tentar delinear o possível processo de agregação utilizando as técnicas analíticas de espalhamento de raios-X a baixos ângulos, dicroísmo circular, fluorescência, cromatografia de exclusão molecular e eletroforese em gel de poliacrilamida. Nestas circunstâncias, mostra-se interessante a irradiação da  $\beta$ -LG, tanto no estado sólido como em diferentes graus de atividade de água e em solução, para melhor avaliar a magnitude do efeito produzido na proteína em estudo.

## **2. OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

- **Estudar as alterações estruturais, o processo de agregação e a funcionalidade da  $\beta$ -LG submetida à radiação gama.**

### **2.2. Objetivos específicos**

- Estudar as alterações nas estruturas secundária e terciária da  $\beta$ -LG tratada com radiação gama, utilizando dicroísmo circular e fluorescência.
- Delinear o processo de formação de oligômeros e de agregação utilizando a técnica de SAXS e cromatografia de exclusão molecular.
- Estudar o mecanismo envolvido na oligomerização e agregação da proteína e propor modelos para os oligômeros formados.
- Estudar a funcionalidade da proteína irradiada mediante estudo da sua capacidade ligante de retinol e de sua digestibilidade.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. Proteínas do soro de leite**

Historicamente, as proteínas do soro de leite foram consideradas produto residual na indústria de fabricação do queijo. Nas últimas décadas ganharam o *status* de produto de alto valor agregado, ao serem obtidas na forma de concentrados protéicos com diferentes teores de proteínas. As proteínas do soro incluem:  $\alpha$ -lactalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina, albumina sérica bovina, lactoferrina, lactoperoxidase, imunoglobulinas e uma variedade de fatores de crescimento.

As proteínas de soro cumprem papel importante na nutrição por serem uma fonte excepcionalmente rica e balanceada de aminoácidos (REGESTER et al., 1996), além de apresentarem ações fisiológicas específicas *in vivo* (McINTOSH et al., 1998). Entre as ações fisiológicas a elas atribuídas estão: estimulante do sistema imunológico, antioxidante, antihipertensiva, antitumoral, protetora da mucosa gástrica contra a agressão de agentes ulcerogênicos, protetora contra vários tipos de câncer, antiviral e antibacterial. Importantes artigos de revisão abordando as variadas propriedades fisiológicas destas proteínas têm sido publicados (MARSHALL, 2004; SGARBIERI, 2004). Por outro lado, elas apresentam boas propriedades funcionais tecnológicas que derivam principalmente da sua elevada solubilidade em uma ampla faixa de pH. Destacam-se o poder geleificante, a propriedade formadora de espuma e a capacidade de emulsificar quantidades significantes de lipídeos (MARSHALL; HARPER, 1988).

A  $\beta$ -lactoglobulina é a principal proteína do soro do leite bovino, perfazendo de 7 a 12% do total de proteínas no leite desnatado (WONG; CAMIRAND; PAVLATH, 1996). Sua função biológica ainda não está totalmente elucidada, no entanto, vários experimentos têm revelado que a proteína nativa é capaz de ligar-se a pequenas moléculas hidrofóbicas como retinol e ácidos graxos (PANICK; MALESSA; WINTER, 1999). Sua estrutura, do tipo lipocalina, lhe confere a característica de ser a principal proteína alergênica do leite (SPIES, 1973; OTANI; UCHIO; TOKITA, 1985; KURISAKI et al., 1982; CLEMENT et al., 2002).

## 3.2. $\beta$ -Lactoglobulina

### 3.2.1. Características estruturais

A estrutura da  $\beta$ -LG é responsável pela sua estabilidade em solução em um amplo intervalo de pH e também pelas suas propriedades funcionais: capacidade geleificante, emulsificante, formadora de espuma e ligante de pequenas moléculas hidrofóbicas (MORR; FOEGEDING, 1990).

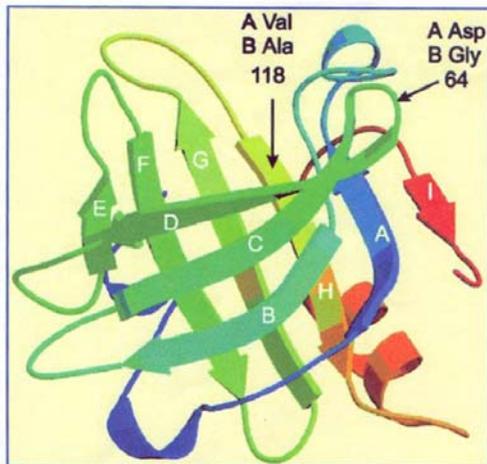
#### 3.2.1.1. Estruturas primária e secundária

A  $\beta$ -LG é uma pequena proteína globular constituída por 162 aminoácidos, apresentando duas pontes dissulfeto e uma cisteína livre. A estrutura secundária consiste de folhas- $\beta$  antiparalelas formadas por nove filamentos- $\beta$  ( $\beta$ -strands). A estrutura cristalina mostra que o monômero consiste predominantemente de folhas- $\beta$  (50%) e uma pequena porção de hélices- $\alpha$  (15%), estruturas ao acaso ou desordenadas (15%) e estruturas *turns* (20%) (PAPIZ et al., 1986; MONACO et al., 1987, BROWNLOW et al., 1997).

Diversas variantes foram identificadas no leite bovino, mas as duas principais são a  $\beta$ -LG A e B, que apresentam diferenças nos aminoácidos na posição 64 e 118, sendo Asp<sup>64</sup> e Val<sup>118</sup> para  $\beta$ -LG A e Gly<sup>64</sup> e Ala<sup>118</sup> para a  $\beta$ -LG B. A massa molar da variante genética A é 18.362 Da, e da variante B, 18.276 Da. O ponto isoelétrico da  $\beta$ -LG é ao redor de 5,2, levemente mais alto para a variante B que para a variante A (FOX; McSWEENEY, 1998).

#### 3.2.1.2. Estrutura terciária

A conformação espacial da  $\beta$ -LG foi completamente elucidada por Brownlow et al. (1997). Possui oito filamentos  $\beta$  denominadas de A à G (Figura 1) formando folhas- $\beta$  antiparalelas que se arranjam formando uma espécie de cálice ou barril achatado, capaz de ligar e acomodar pequenas moléculas hidrofóbicas no seu interior. A  $\beta$ -LG é, então, categorizada como um membro da família das lipocalinas, que compreende as proteínas com função de transporte (ROUVINEN et al., 1999). A estrutura também contém um curto filamento- $\beta$  (I) (em vermelho na Figura 1); uma hélice  $3_{10}$ , entre os filamentos A e B; uma hélice- $\alpha$  entre os filamentos H e I (cor laranja na Figura 1) e uma hélice  $3_{10}$  C-terminal. A Figura 1 apresenta a estrutura da  $\beta$ -LG, baseada em dados cristalográficos de raios-X do Banco de Dados de Proteínas e produzida usando MOLSCRIPT (KRAULIS, 1991).



**Figura 1.** Diagrama em fitas da  $\beta$ -lactoglobulina, indicando as posições de substituição dos aminoácidos nas isoformas A e B (Ref: BOTELHO et al., 2000).

### 3.2.2. Relação estrutura- função

#### 3.2.2.1. Estrutura e propriedades tecnológicas

Alterações conformacionais da proteína a partir do seu estado nativo têm levado à elucidação da relação estrutura-função em estudo da capacidade de formação e de estabilização de espuma (PHILLIPS; HAWKS; GERMAN, 1995) ou na propriedade de formação de géis da  $\beta$ -LG (STADING; LANGTON; HERMANSSON, 1993).

A capacidade da  $\beta$ -LG de ligar-se aos ácidos graxos tem sido explorada em seu uso como agente emulsificante na indústria de alimentos (SHIMIZU; SAITO; YAMAUCHI, 1985). As propriedades emulsificantes da  $\beta$ -LG mudam dependendo do pH. Menor atividade emulsificante e de superfície foi observada em meio ácido (pH 3) quando comparada a meio neutro, possivelmente devido à baixa flexibilidade das moléculas neste pH (SHIMIZU; SAITO; YAMAUCHI, 1985).

A formação de filme interfacial e a de espuma são predominantemente dependentes da hidrofobicidade superficial e da flexibilidade da proteína. Qualquer mudança que altere um destes fatores resultará em mudança nas propriedades de formação de espuma do sistema. Phillips, Hawks e German (1995) observaram forte correlação entre a estrutura secundária da  $\beta$ -LG em solução e as propriedades espumantes.

Proteínas globulares formam dois tipos de géis, dependendo da quantidade de carga que a proteína nativa carrega. A  $\beta$ -LG, que é uma proteína globular, forma géis particulados brancos na região de pH 4-6, e géis transparentes constituídos por uma rede de filamentos finos abaixo e acima deste intervalo de pH (LANGTON; HERMANSSON, 1992).

A estrutura conformacional do tipo lipocalina é a responsável pela interação da  $\beta$ -LG com o retinol e pequenos ácidos graxos. Em 1972, Futterman e Heller, usando técnica de fluorescência, demonstraram que a  $\beta$ -LG bovina, assim como a proteína ligante de retinol (RBP), formam complexos com retinol solúveis em água. A ligação de retinol com  $\beta$ -LG envolve principalmente interações hidrofóbicas (FUGATE; SONG, 1980; JANG; SWAISGOOD, 1990). Assim, a porção apolar do ligante é amplamente responsável pela ligação, e o sítio de ligação provavelmente inclui resíduos de triptofano que servem para fixar o anel da  $\beta$ -ionona do retinol (FUGATE; SONG, 1980). Vários estudos têm sido feitos com o propósito de definir os sítios de ligação existentes na  $\beta$ -LG para o retinol, mas um consenso não tem sido atingido. Para Papiz et al. (1986) e Cho, Batt e Sawyer (1994), o retinol liga-se na região interna do cálice hidrofóbico. Já para Monaco et al. (1987) e Lange et al. (1998), o sítio de ligação estaria na região externa da estrutura proteica, na fenda de entrada do cálice. Moléculas como porfirinas e bilirubinas se ligam na entrada da cavidade localizada atrás da hélice- $\alpha$ . (ZSILA, 2003).

É conhecido que, *in vitro*, a  $\beta$ -LG liga fortemente uma molécula de retinol por monômero, mas observações de Dufour e Haertle (1990) apontam que a estequiometria pode ser dobrada quando a  $\beta$ -LG está no estado *molten globule*, que pode ser induzido por mudanças na polaridade do meio.

Estudos sobre a ligação da  $\beta$ -LG com ligantes em solução tem sido realizados utilizando diversas técnicas espectroscópicas, incluindo Ressonância Nuclear Magnética (NMR), cromatografia de afinidade e equilíbrio de diálise (WANG; ALLEN; SWAISGOOD, 1997; CURLEY et al., 1999; RAGONA et al., 2000; SAWYER; KONTOPIDIS, 2000; MURESAN; VAN DER BENT; DE WOLF, 2001). A maioria dos estudos cristalográficos com ligantes (palmitato, retinol e colesterol) tem mostrado que estes se ligam dentro da cavidade central da proteína (QIN et al., 1998; WU et al., 1999; SAWYER; KONTOPIDIS, 2000). O efeito desta ligação é um aumento na estabilização da proteína à desnaturação térmica e pela uréia (DUFOUR; BERTRAND-HARB; HAERTLÉ, 1993; PUYOL et al., 1994, JAMESON; ADAMS; CREAMER, 2002). Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) foi usada para estudo da estabilidade térmica da  $\beta$ -LG ligada ao retinol (PUYOL et

al., 1994). O pico de temperatura máxima e a entalpia aparente de desnaturação da  $\beta$ -LG mostraram um leve aumento quando comparada à  $\beta$ -LG não ligada ( $79,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$  e  $267,5 \pm 26,5$  kJ/mol, respectivamente).

A percepção de aromatizantes em alimentos é altamente influenciada pelas interações entre eles e outros componente da matriz. A força e natureza das interações afetam a liberação do aroma durante o processamento ou consumo de alimentos (GUICHARD; LANGOURIEUX, 2000). Em solução aquosa, a presença de  $\beta$ -LG induz diminuição da volatilidade da maioria dos compostos aromatizantes hidrofóbicos, principalmente devido às interações na cavidade central da proteína, diminuindo significativamente a percepção do odor. Em emulsões, a presença de  $\beta$ -LG na interface óleo-água aumenta a resistência à transferência de massa para a maioria dos compostos hidrofóbicos, o que pode induzir a alguma persistência do aroma durante a degustação. (GUICHARD; LANGOURIEUX, 2000).

A propriedade da  $\beta$ -LG de se ligar a um sem número de pequenas moléculas hidrofóbicas passa a ser de grande interesse para a indústria farmacêutica e de alimentos. Dentre os ligantes mais estudados com relação a  $\beta$ -LG estão o retinol (DUFOUR; MARDEN; HAERTLÉ, 1990; FUGATE; SONG, 1980; BYCHKOVA et al., 1992; CHO; BATTIS; SAWYERS, 1994), ácido retinóico, (ZSILA; BIKÁDI; SIMONYI, 2002) retinil acetato,  $\beta$ -caroteno (DOUFOUR; HAERTLÉ, 1991), colesterol, protoporfirina (DUFOUR; MARDEN; HAERTLÉ, 1990), bilirubina (ZSILA, 2003).

Em estudo de Moller, Stapelfeldt e Skibsted (1998), o tratamento com alta pressão hidrostática (até 400 MPa) levou a  $\beta$ -LG a apresentar propriedades antioxidantes, relacionadas ao grupo tiol da  $\beta$ -LG. Na proteína desnaturada pela ação da alta pressão, o grupo sulfidrila livre fica mais exposto e ativo. Este grupo atuaria como antioxidante, interrompendo a propagação da cadeia de peroxidação do ácido linoléico em emulsões óleo em água, formando radicais estáveis na reação com grupos peroxi de lipídeos.



A  $\beta$ -LG apresenta efeito protetor na destruição térmica do ácido ascórbico em solução aquosa (DAI-DONG; NOVAK; HARDY, 1990). O efeito protetor pode ser devido ao efeito antioxidante do grupo tiol presente nos resíduos de cisteína da proteína.

### 3.2.2.2. Estrutura e propriedades fisiológicas da $\beta$ -LG

Estudos sobre propriedades fisiológicas da  $\beta$ -LG mostram os diversos efeitos que esta proteína poderia causar no organismo, enquanto mantém em parte sua conformação nativa, ou quando hidrolisada pela ação das enzimas proteolíticas digestivas. Alguns exemplos são apresentados a seguir.

Puyol et al. (1995) utilizaram monocamadas de células *Caco-2* (cultura de tecido como enterócito de carcinoma de cólon humano) para estudar o efeito da  $\beta$ -LG na absorção e transporte do retinol e ácido palmítico. Esta linha de células possui características morfológicas e bioquímicas similares às das células intestinais absorptivas como a polarização e a expressão de várias enzimas da borda de escova. O estudo demonstrou que a  $\beta$ -LG como proteína ligante pode facilitar a entrada de ácido palmítico e retinol por essas células

Neurath et al. (1996) verificaram que a  $\beta$ -LG ligada ao anidrido 3-hidroxiftálico forma um composto (3-HP- $\beta$ -LG) que bloqueia o vírus HIV ligando-se ao receptor do vírus.

Ouwehand et al. (1997) descreveram o poder da  $\beta$ -LG em inibir a adesão de enteropatógenos às glicoproteínas de ileostomia humana, impedindo a infecção em um primeiro estágio da colonização. Quando as pontes dissulfeto eram reduzidas, a proteína não mais apresentava esta atividade, sugerindo que sua estrutura com as pontes dissulfeto e áreas circundantes preservadas eram cruciais para ela apresentar esta atividade.

Em estudo realizado por Nagaoka et al. (2001) foi observado que peptídeos trípticos derivados da  $\beta$ -LG bovina induziram a supressão da absorção do colesterol, evidenciado tanto pelas medidas de absorção de colesterol *in vivo* como pelo estudo *in vitro* com células *Caco-2*. O peptídeo derivado da  $\beta$ -LG, IIAEK pode influenciar poderosamente o nível de colesterol sérico e a sua atividade hipocolesterolêmica foi maior que a do medicamento  $\beta$ -sitosterol, em ratos. O estudo sugere que haveria uma interação direta no epitélio intestinal entre o colesterol misturado às micelas e o hidrolisado tríptico da  $\beta$ -LG. Esta interação causaria inibição da solubilidade micelar de colesterol levando, assim, à supressão da absorção do colesterol.

A digestão proteolítica por tripsina gera alguns peptídeos com atividade bactericida (PELLEGRINI et al., 2001). A atividade bactericida dos fragmentos de  $\beta$ -LG, que eram negativamente carregados, foi restrita a bactérias Gram-positivas.

Mullaly, Meisel e Fitzgerald (1997) analisaram a atividade antihipertensiva de hidrolisados enzimáticos de  $\beta$ -LG, determinada pela capacidade de inibição da enzima conversora da angiotensina I. Os autores reportaram que permeados de 3 kDa de hidrolisados trípticos apresentaram maior atividade que os hidrolisados trípticos não fracionados e maior atividade que a proteína não hidrolisada, equivalente a 87% de inibição e com um  $C_{50}$  de 130 mg/L (mg de proteína por litro de hidrolisado).

### **3.2.3. Digestibilidade da $\beta$ -LG**

A estrutura compacta da  $\beta$ -LG, estabilizada por duas pontes dissulfeto, faz desta proteína um substrato pobre para muitas enzimas. A  $\beta$ -LG nativa é hidrolisada facilmente pela tripsina, mas é resistente à digestibilidade péptica e quimiotríptica. O aquecimento até 70°C não altera sua resistência à digestibilidade péptica e somente o tratamento térmico à temperatura entre 80 - 90°C diminui sua resistência à hidrólise (REDDY; KELLA; KINSELLA, 1988).

Outros tratamentos, como o de alta pressão hidrostática ou o uso de diferentes solventes podem aumentar sua susceptibilidade à hidrólise enzimática (DIB et al., 1996; STAPELFELDT et al., 1996).

Os efeitos da radiação gama na digestibilidade *in vitro* e na liberação de aminoácidos da  $\beta$ -LG foram investigados por Voisine, Parent e Savoie (1990), em amostras líquidas ou congeladas (ambas com  $a_w$  0,93), ajustadas a pH 5,2 ou 7,0 e em amostras secas ( $a_w$  0,13) e irradiadas com doses de 1-50 kGy. A composição aminoacídica, a digestibilidade *in vitro* e a liberação de aminoácidos não foram diminuídas pela irradiação até as mais altas doses (50 kGy). Os autores concluíram que a qualidade nutricional da  $\beta$ -LG não foi afetada pela irradiação nas doses recomendadas para o processamento de alimentos (<10 kGy).

### **3.2.4. Propriedades antigênicas e alergênicas**

A atividade antigênica de proteínas refere-se ao reconhecimento de alguns epítomos nas proteínas por anticorpos específicos (ABBAS; LITCHMAN, 2005) e o termo “alergia” refere-se às condições clínicas causadas por resposta imune imprópria e prejudicial em pessoas geneticamente predispostas. A alergia alimentar é definida como uma reação adversa a um alimento devido a um mecanismo imunológico, envolvendo principalmente reações mediadas pelas imunoglobulinas E (Ig-E) (BUSINCO; BRUNO; GIAMPIETRO, 1998).

Quase todas as proteínas do leite são antigênicas e, embora, nem todas as substâncias antigênicas tenham sido caracterizadas como alergênicas, elas devem ser consideradas como alergênicas potenciais (SPIES, 1973). A atividade alergênica das proteínas  $\beta$ -LG,  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -La), albumina de soro bovina (BSA) e caseína tem sido as mais estudadas dentre as proteínas do leite (SPIES, 1973).

A  $\beta$ -LG se apresenta como particularmente alergênica devido a sua característica conformacional. Em anos recentes, tem se evidenciado que praticamente todos os alérgenos respiratórios caracterizados a nível molecular, do tipo animal, pertencem a família das lipocalinas, à qual também pertence a  $\beta$ -LG (MÄNTYJÄRVI; RAUTIAINEN; VIRTANEN, 2000).

Estudos reportados inicialmente por Otani, Uchio, e Tokita (1985) e Kurisaki et al. (1982) mostraram que a estrutura terciária da  $\beta$ -LG era necessária para sua imunoreatividade. Recentemente, CLEMENT et al. (2002) realizaram um estudo completo da antigenicidade da  $\beta$ -LG, utilizando anticorpos monoclonais (mAb). Eles reportaram que não somente na hélice- $\alpha$  e laços externos havia regiões antigênicas, mas que também as folhas  $\beta$  continham epítomos (CLEMENT et al., 2002).

Ao que parece, segundo Sélo et al. (1999), nenhuma forma estrutural em particular é responsável por um grau maior de alergenicidade na  $\beta$ -LG. Os epítomos são numerosos e amplamente difundidos ao longo da molécula. Eles podem estar localizados nas partes hidrofóbicas da molécula, inacessíveis para os anticorpos IgE na conformação nativa da proteína, mas chegam a ser bio-acessíveis depois do processo digestório. Hidrolisados de  $\beta$ -LG retêm a maior parte da imunoreatividade da proteína nativa. Vários peptídeos trípticos, capazes de ligar-se especificamente às IgsE em humanos, têm sido identificados.

### ***3.3. Efeito do processamento na estrutura e nas propriedades da $\beta$ -LG***

As alterações estruturais da  $\beta$ -LG são de grande interesse já que suas propriedades funcionais e biológicas são altamente afetadas pela sua conformação e pelo seu estado de associação (MORGAN et al., 1999).

Métodos de obtenção da proteína na forma nativa permitem maior exploração das propriedades funcionais no processamento de produtos alimentícios (DE JONGH; GRÖNEVELD; DE GROOT, 2001). Técnicas de ultrafiltração são utilizadas para a obtenção de concentrados de proteínas do soro não desnaturadas (MAUBOIS et al.,

1987). A ultrafiltração apresenta várias vantagens sobre outros processos de separação já que não envolve mudança de fases; pode ser conduzido a baixas temperaturas e pressão hidrostática, não afetando substâncias termosensíveis e não precisa de reagentes químicos (PORTER; MICHAELS, 1970).

A ultrafiltração é a técnica preferida para a fabricação dos concentrados protéicos de soro com >50% de proteína (MORR; FOEGEDING, 1990). De acordo com Morr e Ha (1993), a ultrafiltração é um processo industrial utilizado para o fracionamento do soro com o objetivo de produzir um concentrado protéico de soro com alto teor de proteína. Geralmente, o processo é seguido de uma diafiltração com água desionizada para a remoção de lactose residual e dos minerais do retentado antes da secagem. A diafiltração aumenta a pureza do concentrado protéico e a funcionalidade dos ingredientes (HUFFMAN, 1996).

Na obtenção de proteínas, normalmente o processo de liofilização é utilizado para conseguir maior estabilidade da proteína na estocagem. Em geral, as proteínas liofilizadas são mais estáveis em meios com menor conteúdo de água (LAI; TOPP, 1999). Liu, Langer e Klibanov (1991) reportaram um estudo sobre agregação de proteínas liofilizadas no estado sólido induzidas pela umidade. A umidade residual, normalmente é considerada a responsável pela instabilidade química de proteína e peptídeos no estado sólido (LIU; LANGER; KLIBANOV, 1991).

A interação água/proteína é bem representada pelas isotermas de sorção. Uma isoterma de sorção se define como a representação do conteúdo de água em um alimento (g de água por g de matéria seca) como função da pressão de vapor em equilíbrio ( $p/p_0$ ), a uma temperatura constante (FENNEMA, 1996). As isotermas de sorção fornecem informações importantes para otimizar formulações, nos processos de concentração e de desidratação, empacotamento, condições de crescimento microbiano e a estabilidade física e química do produto como uma função de seu conteúdo de água (HARDY; SCHER; BANON, 2002).

As isotermas de sorção de umidade das proteínas e biomoléculas geralmente exibem forma sigmoideal. Vários modelos teóricos têm sido propostos para descrever isotermas de sorção de biomoléculas ou proteínas. Entre eles estão o modelo simplificado de Langmuir, o de Brunauer e colaboradores e o método de GAB desenvolvido por Guggenheim, Anderson e De Bøer (HAGEMAN et al., 1992; HARDY; SCHER; BANON, 2002). Ainda que os parâmetros de hidratação avaliados por estes modelos sejam de limitado significado físico (KUNTZ; KAUZMANN, 1974), estas teorias são ainda

empregadas para predizer mudanças na mobilidade em água e estabilidade da proteína (IGLESIAS; BUENO, 1999).

Os diferentes graus de hidratação ou quantidade de água na proteína pode ser um indicativo da flexibilidade de sua molécula podendo resultar num comportamento diferente frente aos tratamentos. Moléculas da proteína hidratada poderão ser mais susceptíveis a mudanças estruturais pela diferente atividade da água nos vários graus de hidratação (RUPLEY; CARERI, 1991).

### **3.3.1. Influência do pH**

A  $\beta$ -LG é uma proteína bastante estável em solução em um amplo intervalo de pH, apresentando, no entanto, diferentes estados de associação. A  $\beta$ -LG experimenta cinco transições induzidas por pH que podem ser identificadas no intervalo de pH 1-13 (TAULIER; CHALIKIAN, 2001).

A primeira transição começa em pH 2, mas não é completada mesmo em pH 1. Neste pH, a  $\beta$ -LG retem a maior parte de sua estrutura secundária, mas são evidentes algumas alterações na estrutura terciária. A segunda transição ocorre entre pH 2,5 e 4 e tem sido identificada como uma transição de dímero a monômero. A terceira transição ocorre entre pH 4,5 e pH 6 e resulta em uma leve mudança na sua estrutura terciária, mas sem qualquer alteração significativa na secundária (TAULIER; CHALIKIAN, 2001).

Timasheff et al. (1966) qualificaram a transição da forma nativa e compacta (N) existente em pH 6, para a forma acídica (Q), em pH  $\sim$ 4,5, como “mudança conformacional da  $\beta$ -LG induzida por pH”. Alguns autores mencionam que em pH  $\sim$ 4,5, a  $\beta$ -LG está propensa a formar octâmeros (TIMASHEFF et al., 1966; MCKENZIE; SAWYER, 1967), mas em estudo de Taulier e Chalikian (2001), análises de anisotropia de fluorescência e análises volumétricas não revelaram nenhum indício de octamerização da proteína neste pH.

A quarta transição ocorre entre pH 6,5 e pH 8,5 e é conhecida como transição de Tanford (TAULIER; CHALIKIAN, 2001). Ela é acompanhada por alterações na estruturas secundária e terciária da  $\beta$ -LG, que sendo alterações mais bem localizadas não causam uma mudança global na conformação da proteína. A principal alteração estrutural da proteína está relacionada com o deslocamento da alça EF que abre o interior do cálice acima de pH 7,5. A transição é também acompanhada por uma mudança no microambiente da Tyr42, causando uma alteração de 5 graus na orientação relativa dos monômeros no dímero (OLIVEIRA et al., 2001; BROWNLOW et al., 1997).

A quinta transição ocorre entre pH 9 e pH 12,5, identificada também como desnaturação induzida por álcalis. Ela resulta em ruptura de toda e qualquer estrutura de tipo dimérica nativa em monômeros desnaturados. No estado desnaturado em pH 12,5 há uma diminuição significativa da estrutura secundária e pouca rigidez da estrutura terciária. No entanto, estima-se que aproximadamente 20 % das folhas- $\beta$  e 10 % das hélice- $\alpha$  são preservadas (CASAL; KÖHLER; MANTSCH, 1988; TAULIER; CHALIKIAN, 2001). A desnaturação da  $\beta$ -LG induzida por álcalis é irreversível (TAULIER; CHALIKIAN, 2001).

### **3.3.2. Efeito do aquecimento**

A  $\beta$ -LG é uma proteína termosensível e vários efeitos são produzidos nela pela ação da temperatura. Estudos sobre sensibilidade térmica da  $\beta$ -LG em pH neutro mostram que modificações estruturais da proteína representam os passos iniciais das subseqüentes mudanças macroscópicas. Entre elas, perda de solubilidade e exposição de regiões adequadas para diferentes tipos de interação com outros componentes em sistemas complexos (IAMETTI et al., 1996).

A desnaturação térmica ocorre em diferentes estágios característicos e em temperaturas relativamente definidas. Estes passos podem levar à modificações reversíveis (ao redor de 50°C) ou irreversíveis (acima de 65-70°C). Em meio neutro, o aquecimento origina em primeiro lugar a monomerização da proteína dimerizada (nativa) (CROGUENNEC et al., 2003), seguida por perda da conformação globular compacta. Forma-se um estado intermediário de maior flexibilidade da estrutura terciária e maior volume onde há aumento de grupos hidrofóbicos expostos, denominado de estado *moltem globule* (CARROTA et al., 2001) Em seguida ocorre a associação (intermolecular de estruturas folhas- $\beta$ ) e agregação através de pontes dissulfeto e interações hidrofóbicas (SHIMADA; CHEFTEL, 1989; IAMETTI et al., 1996; PRABAKARAN; DAMODARAN, 1997; PALAZOLO et al., 2000; PANICK; MALESSA; WINTER, 1999; PHOTCHANACHAI; KITABATAKE, 2001).

Estudos sobre a  $\beta$ -LG tratada termicamente utilizando espalhamento de luz estático e hidrodinâmico apontam, como primeira etapa, a formação de oligômeros, solúveis, metaestáveis, linearmente interligados por ligações dissulfeto intermoleculares (HOFFMANN et al., 1996; ELOFSSON; DEJMEK; PAULSSON, 1996).

Durante o processamento do leite em escala industrial, a  $\beta$ -LG é apontada como responsável pelo início do processo de agregação, que conduz à obstrução e conseqüente ineficiência dos trocadores de calor (SAWYER; KONTOPIDIS, 2000).

### **3.3.3. *Influência de alta pressão hidrostática***

O tratamento de alta pressão tem sido muito estudado como método alternativo ao processo térmico, tanto para preservação como para melhorar a funcionalidade do alimento (BELLOQUE; LOPEZ-FANDINO; SMITH, 2000). O uso de alta pressão no leite induz à inativação microbiana e enzimática, assim como também modifica as características físico-químicas dos componentes do leite (MESSENS; VAN CAMP; HUYGHEBAERT, 1997).

O tratamento de alta pressão tem sido investigado como alternativa para a formação de géis de proteínas do soro do leite no lugar do aquecimento, principalmente porque alimentos processados por alta pressão retêm as propriedades sensoriais e nutricionais do produto fresco e porque os géis assim formados têm texturas únicas (KANNO et al., 1998; DUMOULIN; OZAWA; HAYASHI, 1998).

A investigação dos efeitos da pressão nas reações de desnaturação e procedimentos de geleificação é guiada pela relativa importância da  $\beta$ -LG no processamento de alimentos e, também em parte, pela possibilidade de extrair  $\beta$ -LG do soro por meio de alta pressão (PANICK; MALESSA; WINTER, 1999)

Nos estudos sobre tratamentos a alta pressão da  $\beta$ -LG verifica-se que há similaridade com os fenômenos ocorridos no tratamento térmico. Dependendo da pressão aplicada, mudanças reversíveis e irreversíveis acontecem (BOTELHO et al., 2000; BELLOQUE; LOPEZ-FANDINO; SMITH, 2000; PANICK; MALESSA; WINTER, 1999; FUNTENBERGER; DUMAY; CHEFTEL, 1997; YANG et al., 2001). Em geral, pode-se dizer que entre 100-150 MPa há um começo da monomerização. Já entre 140 e 250 MPa haveria modificação da estrutura secundária, mas as estruturas  $\beta$  não são completamente quebradas até pressão de 330 MPa. Entre 300-400 MPa, a estrutura da  $\beta$ -LG apresenta grande flexibilidade e, retiradas as condições de pressão, ela se re-natura (monômero modificado). Ao aumentar a pressão para 600 e 900 MPa, há formação de agregados, estabilizados por interações hidrofóbicas e, principalmente, por ligações de intercâmbio tiol-dissulfeto. Em estudo por NMR do efeito da alta pressão na  $\beta$ -LG, Belloque, Lopez-

Fandiño e Smith (2000) concluíram que os agregados resultantes seriam polímeros de proteínas bem estruturadas.

Valores de pressão de 600 e 900 MPa estão acima dos requeridos para a preservação de alimentos (IAMETTI et al., 1997).

#### **3.3.4. Efeitos da radiação gama**

No processo de irradiação gama, utiliza-se como fonte de energia o Cobalto-60 ( $^{60}\text{Co}$ ). Durante o processo de decaimento, o  $^{60}\text{Co}$  emite raios gama que são aproveitados para tratar diversos produtos médicos, farmacêuticos, cosméticos e alimentos, com o objetivo de inativar ou eliminar organismos indesejáveis (micróbios patógenos, insetos e parasitas) (DELINCÉE, 1998; FARKAS, 1998; GROLIHOVÁ; DVORÁK; MUSILOVÁ, 2004).

No caso dos alimentos, no Brasil, as normas gerais para irradiação, aprovadas pela Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos (DINAL) em 08/03/85 estabeleciam que a dose média global absorvida não deveria exceder os 10kGy, com a finalidade de assegurar a sua inocuidade sob os pontos de vista toxicológico, nutricional e microbiológico. Esta legislação foi revisada e atualizada pela Resolução RDC n.21 de 26 de janeiro de 2001 da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, publicada no D.O.U. de 29 de janeiro de 2001 (ANVISA, 2001). Trata-se de um “Regulamento técnico para irradiação de alimentos”. Segundo a Resolução RDC n. 21, fica liberada a irradiação de qualquer tipo de alimento, observadas as seguintes condições: a dose mínima absorvida deve ser suficiente para alcançar a finalidade pretendida; a dose máxima absorvida deve ser inferior àquela que comprometeria as propriedades funcionais e ou atributos sensoriais do alimento.

Comparada com outras tecnologias de esterilização, a irradiação com raios gama apresenta uma evidente vantagem ambiental, sem emissões tóxicas, sem impacto sobre a qualidade da água e do ar e sem resíduos nocivos (FARKAS, 1998).

A aplicação da irradiação gama em concentrados ou isolados protéicos de soro de leite obtidos por técnicas de ultrafiltração por membranas pode fornecer a garantia de qualidade bacteriológica (ausência de germes) requerida, dada à facilidade com que uma contaminação microbiana pode vir a acontecer no processo de obtenção destes materiais (DIAS, 2003).

Embora a pasteurização seja considerada como tratamento satisfatório para a descontaminação de alimentos líquidos, ela não é tão adequada para alimentos sólidos ou ingredientes secos (FARKAS, 1998).

Os procedimentos de sanitização química têm problemas inerentes no que concerne a resíduos e poluição ambiental (FARKAS, 1998). Neste sentido é que a irradiação de alimentos surge como alternativa de descontaminação para o futuro (CORRY et al., 1995).

Moléculas de proteína irradiada no estado sólido absorvem diretamente a radiação, produzindo vários radicais. O chamado “efeito direto” pode levar à modificação parcial ou total da configuração da proteína. Em soluções aquosas de proteína, a radiação atua primeiro sobre as moléculas de água, produzindo espécies ativas como radicais hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) e elétrons hidratados ( $e_{\text{aq}}^-$ ), que irão reagir com resíduos de aminoácidos, num processo chamado de “efeito indireto” da radiação. O grau de modificação no estado sólido é muito menor se comparado ao observado no estado aquoso. Esta diferença pode ser atribuída à recombinação dos radicais ( $\text{RH} \rightarrow \text{R}\cdot + \cdot\text{H} \rightarrow \text{RH}$ ) devido à baixa mobilidade das espécies no estado sólido (YAMAMOTO, 1992).

Os resíduos de aminoácidos que contêm enxofre (cisteína, cistina e metionina) e os que contêm anel aromático (fenilalanina, tirosina, triptofano) e histidina, são as partes das proteínas mais sensíveis à radiação, particularmente quando em solução aquosa. Estes resíduos de aminoácidos facilmente formam radicais livres por reação com  $\cdot\text{OH}$  e são, mais adiante, facilmente oxidados ou ligados ao anel de resíduos de aminoácidos aromáticos, resultando em ligações cruzadas ou agregação (YAMAMOTO, 1992; SEVILLA; BECKER; YAN, 1990).

A radiação gama não é a única capaz de produzir transformações químicas e nutricionais nos alimentos. Estudos demonstraram que até 10 kGy, estas transformações na maioria dos alimentos são pequenas e raramente exclusivas de produtos irradiados, sendo semelhantes ao resultado de outros processos de conservação como cozimento, secagem, extrusão e outros (DIEHL, 1995).

Não obstante, alguns alimentos como leite e produtos lácteos não são adequados para serem irradiados devido ao desenvolvimento de aromas indesejáveis. Também alguns vegetais e frutas frescas não toleram doses acima de 2-3 kGy, pela destruição das vitaminas. A esterilização pode, também, afetar o sabor e textura em muitos produtos (CRAWFORD; RUFF, 1996).

A produção de radicais livres tem sido a principal razão do questionamento sobre a segurança dos produtos irradiados. No entanto, produtos radiolíticos não são exclusivos da irradiação, pois também são produzidos em outros tratamentos de alimentos, como o térmico, ao tostar pão, fritar, ou secar alimentos por liofilização (ICGFI, 1991).

A maioria das alegações sobre os aspectos adversos da irradiação não se aplicam às doses típicas aprovadas para pasteurização e sim às doses mais elevadas requeridas para esterilização. Há três níveis de dosagem comumente recomendados, dependendo da finalidade de aplicação: dose baixa (até 1 kGy), para desinfecção e demora no processo de amadurecimento; dose média (1-10 kGy) para pasteurização, e dose alta (10-50 kGy) para esterilização (CRAWFORD; RUFF, 1996; WHO, 1999).

Lee et al. (2001) avaliaram a aplicação da tecnologia de irradiação alimentar como método para reduzir a alergia provocada pelo leite. Tratando caseína e  $\beta$ -LG com radiação gama, os autores observaram diminuição das propriedades alergênicas e antigênicas *in vitro*, utilizando o método ELISA. Os autores sugeriram que esta diminuição das propriedades alergênicas seria resultado de mudanças estruturais das proteínas e, possivelmente, de mascaramento dos epítopos devido à agregação molecular.

A técnica clássica utilizada para descontaminação de alimentos é o aquecimento, mas outras tecnologias estão ganhando popularidade e a alta pressão hidrostática tem sido proposta como alternativa aos já estabelecidos procedimentos de sanitização térmica (IAMETTI et al., 1997). O efeito da radiação gama e de uma combinação de alta pressão e irradiação sobre a qualidade microbiológica de carne de porco fresca foi descrito por Paul et al. (1997). O estudo mostrou um efeito sinérgico ao ser aplicada uma combinação de radiação e alta pressão, melhorando a qualidade sensorial e a segurança microbiológica do produto.

### **3.4. Técnicas analíticas para análise estrutural de proteínas em solução**

Pesquisas utilizando espectroscopia de UV/Vis, fluorescência, dicroísmo circular (CD), espectroscopia de ressonância nuclear magnética (NMR), calorimetria diferencial de varredura (DSC), dispersão óptica rotatória (ORD), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, assim como dispersão de luz e espalhamento de raios-X a baixos ângulos, têm conseguido desvendar as mais diversas mudanças de estrutura em estudo de enovelamento (*foldi*ng) e desenovelamento (*unfolding*) de proteínas, além de

permitir o monitoramento das diferentes propriedades físico-químicas de proteínas em solução.

Cada uma destas técnicas investiga diferentes alterações estruturais. A espectroscopia UV/Vis e fluorescência, por exemplo, monitora as interações de um grupo prostético ou um fluoróforo, como triptofano, com seu microambiente. Dicroísmo circular é sensível principalmente à estrutura secundária (KAUFFMANN et al., 2001). Espectroscopia de NMR pode fornecer informações sobre determinados resíduos de aminoácidos (DYSON; WRIGHT, 1996), contudo, os espectros sobre estados desnaturados são difíceis de interpretar. A espectroscopia de infravermelho com transformação de Fourier (FTIR), por outro lado, é capaz de distinguir claramente entre todos os tipos de estrutura secundária, é sensível à estrutura terciária e capaz de detectar reações de um só resíduo numa escala de tempo de um nanosegundo. Já a técnica de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) permite obter informações do tamanho e forma de uma molécula (proteína) em solução (ARAI et al., 1998). A técnica denominada de “*stopped-flow*” utilizando SAXS é relevante em estudos relacionados com o enovelamento e desenovelamento de proteínas.

#### **3.4.1. Dicroísmo Circular (CD)**

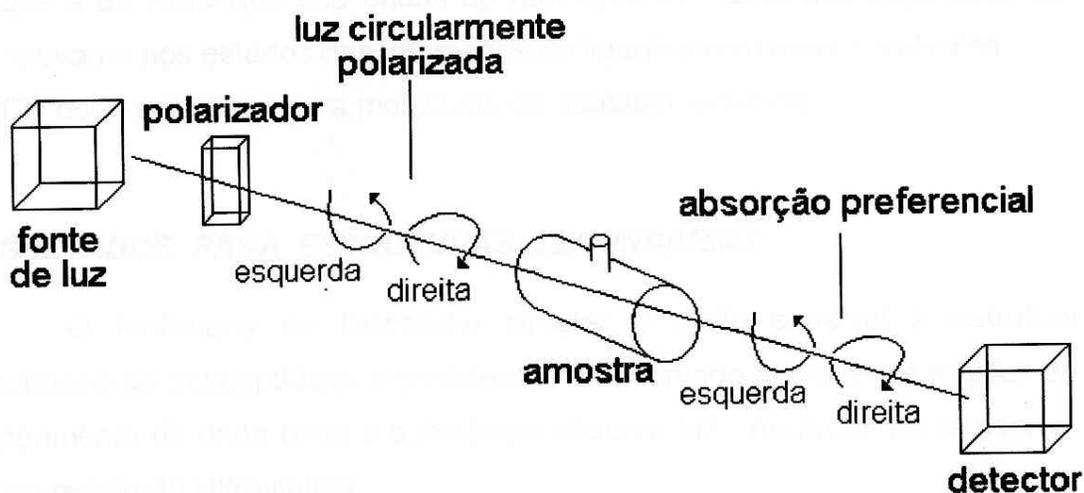
O Dicroísmo Circular (CD) é uma técnica óptica que permite a detecção e quantificação da quiralidade das estruturas moleculares. Denomina-se de CD a absorção diferencial das componentes circularmente polarizadas à esquerda e à direita da radiação polarizada plana. Este efeito ocorre quando um cromóforo é opticamente ativo (quiral), situação alcançada em três condições: (1) intrinsecamente por razão estrutural ou (2) por estar ligado covalentemente a um centro quiral, ou (3) por ser colocado num ambiente assimétrico. Na prática, o instrumento de CD (espectropolarímetro) não recombina os componentes, apenas detecta os dois componentes separadamente, e em seguida, apresenta o dicroísmo a um dado comprimento de onda, expresso como a diferença em absorbância dos dois componentes ( $\Delta A = A_{esq} - A_{direi}$ ) ou como a elipticidade em graus ( $\theta$ ) ( $\theta = \tan^{-1}(b/a)$ , onde  $b$  e  $a$  são os eixos menor e maior da elipse resultante. Há uma relação numérica simples entre  $\Delta A$  e  $\theta$  ( $\theta$  em graus).  $\theta = 32,98\Delta A$  (KELLY; PRICE, 1997).

A elipticidade molar por resíduo de aminoácido ( $\theta_{mr}$ ) é a unidade mais usada para descrever o dicroísmo circular em pesquisas envolvendo proteínas e peptídeos. É

necessário considerar, o caminho óptico  $l$ , a concentração  $c$ , a massa molar  $M$  e o número de resíduos  $n_r$  da proteína.

$$\theta_{mr} = \theta_d \cdot \frac{M}{c \cdot l \cdot n_r} \quad (1)$$

A Figura 2 mostra um esquema simplificado de um sistema para medir dicroísmo circular.



**Figura 2:** Esquema mostrando as partes de um espectropolarímetro (Ref: LORENZI, 2002).

A maioria dos espectropolarímetros convencionais fornece dados espectrais confiáveis entre ~190 e 300 nm. Em anos recentes, o uso da radiação síncrotron como fonte de luz intensa levou ao desenvolvimento da técnica de espectroscopia de dicroísmo circular por radiação síncrotron (SRCD), que permite obter espectros em menores comprimentos de onda no ultravioleta no vácuo (VUV), incluindo a faixa entre 160 e 190 nm (WALLACE, 2000).

### ➤ Informação estrutural a partir de CD

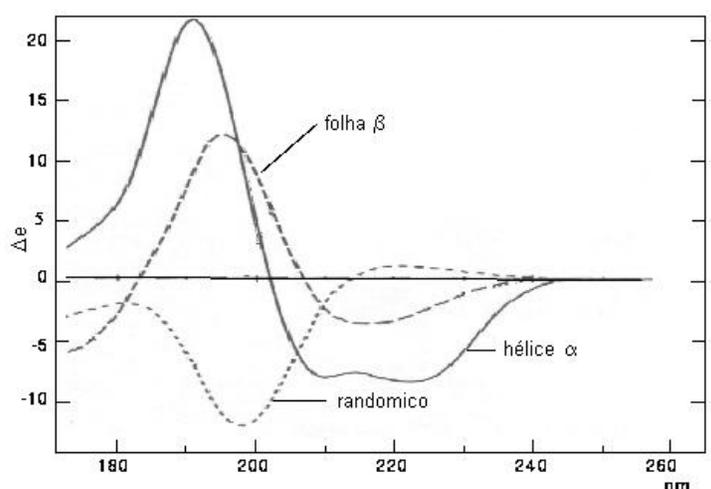
Um espectro de CD é obtido quando o sinal é medido como função do comprimento de onda. Geralmente, dividem-se os espectros gerados para proteínas em duas regiões: UV-próximo e UV-longínquo. Na região do UV-próximo, as cadeias laterais de resíduos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) absorvem na faixa 250-290 nm. Na região do UV-longínquo (tipicamente de 180-190 a 240 nm) absorve principalmente o grupo peptídico. Em compostos modelos que contêm ligações dissulfeto, o ângulo

dihédrico desta ligação pode ser deduzido do espectro de CD na região 240-290 nm (KELLY; PRICE, 1997).

### ➤ Espectro de CD no UV-longínquo

É conhecido desde muitos anos que as diferentes formas de estrutura secundária encontradas em peptídeos e proteínas exibem distintos espectros de CD no UV-longínquo (KELLY; PRICE, 1997). Foram criados espectros modelos utilizando amostras de conformação secundária “pura”, como os obtidos de soluções de poli-L-lisina com variações de temperatura e pH, o que provoca a formação de 100% de hélice  $\alpha$ , 100% de folhas  $\beta$  e 100% de estrutura randômica.

A Figura 3 mostra os espectros característicos das estruturas secundárias conhecidas.



**Figura 3** . Espectro padrão de 100 % de folhas- $\beta$ , 100% de hélices- $\alpha$  e 100% de estruturas randômicas (Ref: BRAHMS & BRAHMS, 1980).

Os espectros de CD que caracterizam hélice  $\alpha$  possuem duas bandas negativas, uma em 222nm ( $n \rightarrow \pi^*$ ) e outra em 208nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$  paralela) de mesma intensidade; e uma positiva em 190nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$  perpendicular). Os espectros característicos para folha  $\beta$ , apresentam uma banda negativa em 216nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) e uma positiva em 195nm ( $n \rightarrow \pi^*$ ). Por último, os espectros que representam as estruturas randômicas apresentam uma banda negativa intensa em ~200nm ( $n \rightarrow \pi^*$ ) e uma faixa positiva por volta de 218nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) (YANG et al., 1986).

Os espectros de CD no UV-longínquo são a soma dos múltiplos fracionários dos componentes estruturais de uma proteína, isto é, representam o conteúdo de estruturas secundárias de tipo hélice  $\alpha$ , estruturas  $\beta$  e estruturas desordenadas (*random coil*).

A tarefa de deduzir as contribuições dos diferentes formas estruturais a partir de qualquer espectro observado não é simples. Diversas tentativas têm sido realizadas, com base em procedimentos sofisticados de ajustes de curvas, envolvendo conjuntos de espectros de proteínas bem caracterizadas de estrutura secundária conhecida (geralmente estruturas que têm sido determinadas por cristalografia de raios-X de alta resolução). Entre os procedimentos mais conhecidos estão: CONTIN, (PROVENCHER; GLOCKNER, 1981), SELCON3 (SREERAMA; WOODY, 1993; SREERAMA; VENYAMINOV; WOODY, 1999); CDSSTR (COMPTON; JOHNSON, 1986); VARSLC (MANAVALAN; JOHNSON, 1987) e K2d (ANDRADE et al., 1993).

Em estudos da  $\beta$ -LG utilizando dicroísmo circular, os resultados encontrados na quantificação da estrutura secundária da forma nativa podem variar dependendo principalmente das condições de pH e concentração das amostras e metodologia utilizada no cálculo. Na literatura, os resultados reportados mostram valores aproximados de 10-15% para estrutura  $\alpha$ -hélice, 40-50% para folhas- $\beta$  (GRIFFIN et al., 1993; QI et al., 1997), valores estes sustentados em estudos de estrutura cristalina por raios-X (PAPIZ et al., 1986; MONACO et al., 1987; BROWNLOW et al., 1997; QIN et al., 1998, 1999) e em estudos por NMR (BELLOQUE; SMITH, 1998).

#### ➤ **Espectro de CD no UV-próximo**

Cada um dos aminoácidos aromáticos tem máximo de absorção em comprimento de onda característico: triptofano, em 290 nm; tirosina, entre 275 e 282 nm e fenilalanina entre 255 e 270 nm.

Três fatores tendem a influenciar a intensidade das bandas aromáticas em CD: (1) a rigidez da proteína, quanto maior a mobilidade das cadeias laterais, menor a intensidade das bandas; (2) interações entre aminoácidos aromáticos, que é especialmente significativo se a distância entre eles for menor que 1 nm; (3) número de aminoácidos aromáticos. Proteínas com grande número desses aminoácidos podem apresentar banda menor que a esperada em CD devido às contribuições positivas e negativas dos mesmos. Observa-se, também, que os sinais em UV-próximo e na região do visível no espectro são muito mais fracos do que aqueles obtidos em UV-longínquo,

refletindo uma concentração molar muito menor de cromóforos, comparada com as ligações peptídicas presentes (KELLY; PRICE, 1997)

### **3.4.2. Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS)**

O SAXS é uma técnica que permite o estudo de macromoléculas em solução, como as proteínas, com dimensões típicas de 1-100 nm. A partir desta técnica podem ser determinados: tamanho molecular, forma molecular e estrutura terciária (baixa resolução).

A teoria de espalhamento a baixos ângulos pode ser encontrada detalhadamente descrita em vários livros texto como o de Guinier e Fournet (1955), Glatter e Kratky (1982), entre outros.

O SAXS pode ser usado para investigar a conformação global da proteína pela medição de seu raio de giro e pela função de distribuição de distâncias  $p(r)$ , que são sensíveis às dimensões e forma da partícula (PANICK; MALESSA; WINTER, 1999). Geralmente, uma solução monodispersa de proteínas é um requisito necessário para investigações de SAXS.

SAXS é também muito adequado para visualizar processos de desnaturação ou de associação–dissociação. O desenovelamento espacial da estrutura nativa de uma proteína sob desnaturação, por exemplo, pode ser claramente seguido pelo aumento do raio de giro (GLATTER; KRATKY, 1982).

Para uma solução de partículas, a intensidade do espalhamento  $I(q)$  pode ser escrita em termos da função de pares de distâncias  $p(r)$ , onde  $q$  é o vetor de espalhamento, e  $r$  a distância entre pares de pontos contidos no volume da partícula. Sendo:

$$q = \left( \frac{4\pi}{\lambda} \right) \text{sen}\theta \quad (2)$$

onde  $\theta$  é a metade do ângulo de espalhamento e  $\lambda$  é o comprimento de onda da radiação utilizada.

$$I(q) = 4\pi \int p(r) \frac{\text{sen}qr}{qr} dr \quad (3)$$

A função de distribuição de distâncias  $p(r)$  está dada pela transformada de Fourier da intensidade espalhada medida  $I(q)$ .

$$p(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty I(q)(qr) \text{sen}(qr) dq \quad (4)$$

A função  $p(r)$  fornece informação essencial sobre a partícula e  $p(r) \rightarrow 0$  para  $r = D_{\text{max}}$ .

O quadrado do raio de giro  $R_g$  da partícula espalhadora é obtido do segundo momento normalizado de  $p(r)$ .

$$R_g^2 = \frac{\int_0^{R_{\text{max}}} p(r)r^2 dr}{2 \int_0^{R_{\text{max}}} p(r)r dr} \quad (5)$$

Várias equações para determinação da massa molar são apresentadas em diversos trabalhos (GLATTER; KRATKY, 1982).

Tendo-se dados da intensidade espalhada para  $q=0$ ,  $I(0)$ , em escala absoluta (referida ao espalhamento por um elétron), pode-se obter a massa molar da partícula espalhadora, já que

$$I_1(0) = (\Delta\rho)^2 V^2 \quad (6)$$

$$I_1(0) = (\Delta\rho)^2 M_1 \cdot \bar{v} \quad (7)$$

$$M_1 = \frac{I_1(0)}{(\Delta\rho)^2 \cdot \bar{v}} \quad (8)$$

sendo  $\bar{v}$ , o volume parcial específico da partícula espalhadora e  $M_1$ , a massa molar (em gramas) da partícula espalhadora. Sabendo que a massa molar  $M_M$  é definida como  $M_M = M_1 \cdot N_A$ , sendo  $N_A$  o número de Avogadro, tem-se para a massa molar da partícula espalhadora,

$$M_M = \frac{N_A I_1(0)}{(\Delta\rho)^2 \cdot \bar{v}} \quad (9)$$

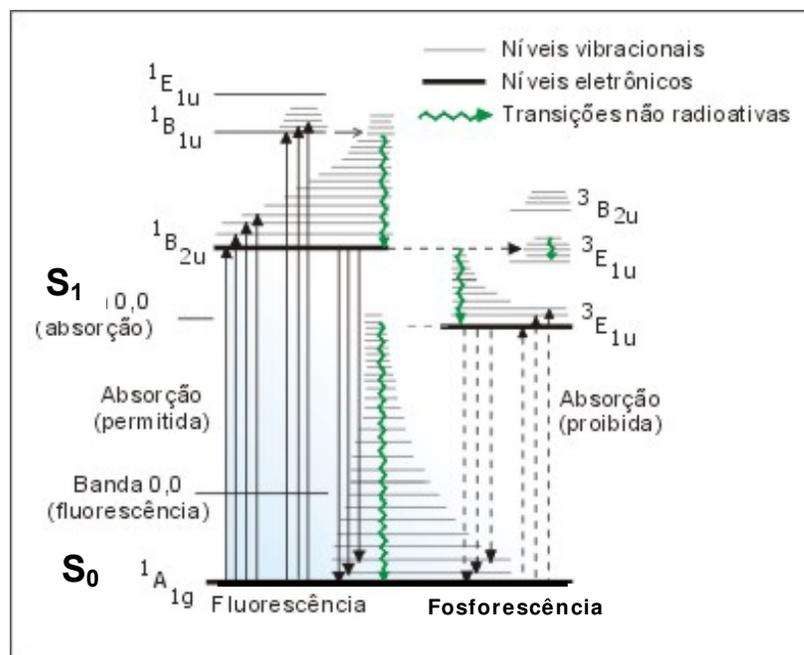
Um gráfico de Kratky (KRATKY, 1982),  $q^2 \times I(q)$  vs  $q$ , é muito útil para descrever características estruturais dos variados estados conformacionais. Um máximo no gráfico de Kratky, ou curva em forma de sino, corresponde a uma estrutura globular compacta da proteína (KATAOKA et al., 1993, 1995; LATTMAN; FIEBIG; DILL, 1994).

Devido ao tamanho relativamente pequeno da partícula, o espalhamento de raios-X a baixos ângulos de uma solução de proteína pode dar informação valiosa do estado de agregação e do formato da proteína (GLATTER; KRATKY, 1982; GUINIER; FOURNET, 1955).

### 3.4.3. Fluorescência

Todas as moléculas absorvem luz. No entanto, um número relativamente pequeno de espécies moleculares (geralmente hidrocarbonetos poliaromáticos conjugados ou heterocíclicos) emite luz como resultado da absorção da luz. Se essa emissão é imediata, isto é, tem origem em um estado de excitação eletrônica singlete, esse fenômeno é denominado de fluorescência (LAKOWICZ, 1983).

Estes fenômenos estão ilustrados no diagrama de estados eletrônicos na Figura 4.



**Figura 4.** Diagrama de Jablonski para o sistema de níveis de energia, utilizando uma molécula de benzeno. S<sub>0</sub> é o nível fundamental; S<sub>1</sub> é o nível denominado singlete do qual quando o elétron volta ao nível fundamental emite luz fluorescente (Ref: ATVARIS e MARTELLI, 2002).

### ➤ **Fluorescência intrínseca de proteínas e peptídeos**

Dentre os 20 aminoácidos usualmente encontrados em proteínas, os aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano são os únicos com intensidade de fluorescência suficiente para ser medida diretamente em solução. A fluorescência destes resíduos é uma ferramenta altamente específica e sensível no estudo de enovelamento e conformação de proteínas. Mudanças na fluorescência intrínseca podem ser usadas para monitorar alterações estruturais numa proteína (LAKOWICZ, 1983; CHEN; BARKLEY, 1998).

A fluorescência de uma proteína enovelada é o resultado da fluorescência de cada resíduo aromático. Os três resíduos têm distintos comprimentos de onda de absorção e emissão. Eles diferem enormemente nos seus rendimentos quânticos e tempos de vida. Devido a estas diferenças e à transferência de energia por ressonância de uma fenilalanina próxima para a tirosina e de uma tirosina para o triptofano, o espectro de fluorescência de uma proteína contendo os três resíduos é parecido com o espectro do triptofano (EFTINK, 1991).

A fluorescência e o rendimento quântico do triptofano são muito maiores que dos outros dois aminoácidos aromáticos. A intensidade, rendimento quântico e comprimento de onda de máxima emissão de fluorescência do triptofano são muito dependentes do solvente. Quando a polaridade do solvente ao redor do resíduo de triptofano diminui, o espectro de fluorescência é deslocado para comprimentos de onda menores (*blue-shift*) e a intensidade da fluorescência aumenta. Resíduos que estão “enterrados” no centro hidrofóbico de proteínas podem ter um deslocamento no seu espectro de 10 a 20nm comparado a triptofanos da superfície da proteína. A fluorescência desse resíduo pode ser suprimida por grupos acídicos protonados vizinhos, como ácido aspártico ou glutâmico (CHEN; BARKLEY, 1998).

A tirosina, como o triptofano, apresenta alta absorção à 280nm, e, quando excitada por luz nesse comprimento de onda, tem também o mesmo perfil de emissão. O resíduo de tirosina é um emissor mais fraco que o triptofano, mas ela ainda assim pode contribuir significativamente para a fluorescência de proteínas, pois geralmente está presente em grande número. A fluorescência da tirosina pode ser facilmente suprimida por um resíduo de triptofano próximo devido à transferência de energia. Além disso, a tirosina sofre ionização no estado excitado, o que pode resultar na perda do próton do grupo hidroxila aromático, levando à supressão da fluorescência deste resíduo.

A fenilalanina, com apenas um anel benzênico e um grupo metila, é pouco fluorescente. A sensibilidade experimental (produto entre rendimento quântico e

absorvidade molar máxima) é muito baixa para este resíduo. A fluorescência da fenilalanina é observada somente na ausência de tirosina e triptofano (MOCZ, 2006).

O comprimento de onda do máximo na intensidade de fluorescência ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) é universalmente e inquestionavelmente usado como um indicador de exposição à água. Por exemplo, como indicador de quanto profundamente o Trp está enterrado na proteína. Um deslocamento do máximo da intensidade de fluorescência para comprimentos de onda maiores (*red shift*) é garantido num ambiente polar somente se há suficiente mobilidade dos grupos polares para relaxar ao redor do dipolo apresentado pelo Trp (CALLIS, 1997).

A  $\beta$ -LG contém dois resíduos de triptofano, Trp 19 e Trp 61. O exame da estrutura da  $\beta$ -LG determinada por cristalografia por raios-X mostra que o Trp 19 está enterrado no cálice hidrofóbico e é essencialmente inacessível ao solvente, enquanto o Trp 61 está em uma posição substancialmente exposta ao solvente e também muito próximo à ponte dissulfeto formada entre Cys 66 e Cys 160 (BROWNLOW et al., 1997). A fluorescência intrínseca da proteína é quase exclusivamente atribuída ao Trp 19 (CHO; BATT; SAWYER, 1994; MANDERSON; HARDMAN; CREAMER, 1999a). No entanto, o Trp 19 pode ter sua fluorescência intrínseca diminuída pela proximidade do Arg 124 que se localiza a somente 3,0-4,0 Å do anel indol do Trp 19 (BROWNLOW et al., 1997). Tem sido demonstrado que a Arginina conduz a uma eficiente supressão da fluorescência em outras proteínas (YU et al., 1992).



## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material e reagentes

➤ Material:  $\beta$ -LG *BioPURE Betalactoglobulina* (variantes A e B, ~95% de proteína,  $a_w=0,22$ ) foi doada pela Daisco Foods International Inc. (Le Sueur, MN, USA).

➤ Reagentes:

Acetonitrila grau cromatográfico (J. T. Baker, Mallinckrodt Baker, Xalostoc, México); metanol, grau cromatográfico (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, USA).

Outros reagentes utilizados foram de grau analítico: reagente de Ellman 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid), (DTNB) Sigma (D-8130) da Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Germany);  $\beta$ -mercaptoetanol (Merck, Hohenbrunn, Germany); uréia foi obtida da Merck (Darmstadt, Germany); o dodecilsulfato de sódio (SDS) (Sigma L5750), as enzimas pepsina e tripsina, sal sódica do ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Sigma ED2SS) e o retinol todo-trans (Sigma R7632) com pureza mínima de 95% foram comprados da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Água ultra pura (18,2 M $\Omega$ ) foi obtida em purificador *Maxima ultra pure water Elga* (Elga High Wycombe, England).

➤ *Preparação de amostras de  $\beta$ -LG sólida com diferentes  $a_w$ .*

Para obter  $\beta$ -LG com diferente  $a_w$ ,  $\beta$ -LG em pó ( $a_w=0,22$ ) foi rapidamente passada através de uma fina nuvem de água atomizada, gerada por um vaporizador de ultrassom (MOD. US-2000, ICCEL, Manaus, AM, Brasil). Porções da proteína hidratada foram colocadas em dessecadores, em atmosfera de umidade relativa (UR) constante de 52,9 %, utilizando solução saturada de Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> e de 75,1 %, com solução saturada de NaCl, a 25 °C , até alcançar o equilíbrio. As medidas de  $a_w$  das amostras foram feitas após 2 dias usando um aparelho AquaLab Modelo Serie 3TE (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA, USA). A  $a_w$  das amostras após o equilíbrio foi 0,53 para as amostras equilibradas à UR de 52,9 % e 0,74 para as equilibradas à UR de 75,1 % .

➤ *Preparação de amostras em solução*

Soluções de  $\beta$ -LG ( $a_w=0,22$ ) em concentrações de 3 e 10 mg/mL de proteína foram preparadas em tampão fosfato 10 mM, pH 7,0 com água ultra pura para serem irradiadas. Soluções de  $\beta$ -LG em concentrações de 1 mg/mL e 0,1 mg/mL foram preparadas em tampão fosfato 10 mM e pH 7,0 a partir de  $\beta$ -LG sem irradiar e irradiadas na forma sólida e em solução para análise por Dicroísmo Circular no UV próximo e longínquo, respectivamente. Para análise de fluorescência intrínseca, as amostras tinham uma concentração de 1 mg/mL em tampão fosfato 10 mM.

## 4.2. Métodos

### 4.2.1. Delineamento experimental.

No presente trabalho foi utilizada a proteína  $\beta$ -LG comercial *BioPURE* da Davisco fornecida em pó, em embalagem de papel aluminizado, impermeável. O tratamento de irradiação da proteína foi realizado nas amostras sólidas e nas amostras em solução. As amostras de  $\beta$ -LG no estado sólido foram preparadas em três atividades de água 0,22, 0,53 e 0,74 e as amostras em solução em duas concentrações, 3 e 10 mg/ mL, como explicado em Material e Métodos, na seção Material e reagentes.

A irradiação das amostras no estado sólido e em solução foi efetuada no Centro de Tecnologia das Radiações do IPEN-CNEN/SP e no Departamento de Irradiação de Alimentos do CENA, na ESALQ-Piracicaba. As amostras foram submetidas a diferentes doses de radiação (0; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0 e 50,0 kGy).

Nas Tabelas 1 e 2 podem ser visualizados o delineamento experimental e a nomenclatura utilizada para as amostras.

**Tabela 1.** Condições experimentais do tratamento de irradiação das amostras de  $\beta$ -LG sólida e nomenclatura das amostras

Tratamento	Dose kGy	Atividade de água A1 / A2 / A3	Nomenclatura das amostras
Sem tratamento	0	0,22 / 0,53 / 0,74	C0A1 / C0A2 / C0A3
Tratada solida	1	0,22 / 0,53 / 0,74	C1A1 / C1A2 / C1A3
	2,5	0,22 / 0,53 / 0,74	C2,5A1 / C2,5A2 / C2,5A3
	5	0,22 / 0,53 / 0,74	C5A1 / C5A2 / C5A3
	10	0,22 / 0,53 / 0,74	C10A1 / C10A2 / C10A3
	25	0,22 / 0,53 / 0,74	C25A1 / C25A2 / C25A3
	50	0,22 / 0,53 / 0,74	C50A1 / C50A2 / C50A3

**Tabela 2.** Condições experimentais do tratamento de irradiação das amostras de  $\beta$ -LG em solução e nomenclatura das amostras.

Tratamento	Dose kGy	Concentração de proteína (mg/mL)	Nomenclatura das amostras
Sem tratamento	0	3 / 10	C0S3 / C0S10
Tratada em solução	1	3 / 10	C1S3 / C1S10
	2,5	3 / 10	C2,5 S3 / C2,5S10
	5	3 / 10	C5S3 / C5S10
	10	3 / 10	C10S3 / C10S10
	25	3 / 10	C25S3 / C25S10
	50	3 / 10	C50S3 / C50S10

### 4.2.2. Irradiação

As amostras foram irradiadas em irradiador de Co-60, Gamma cell 220, GC220 AECL, (Ottawa, Canadá) com atividade  $c_{ia}$ : 12500ci, taxa de dose: 4,34 kGy/h, e Gamma

cell 220, Excel (Northern, Canadá) com atividade  $c_{ia}$ : 2600ci, taxa de dose: 0,974 kGy/h, com doses de radiação entre 1 e 50 kGy, à temperatura ambiente.

As amostras irradiadas no estado sólido (atividade de água 0,22; 0,53 e 0,74) foram acondicionadas em saquinhos de papel laminado (internamente plastificado), selados à vácuo. As irradiadas em solução (3 e 10 mg/mL em fosfato de sódio 10 mM) foram acondicionadas em tubos de vidro Pyrex (14 x 1,5 cm) com tampa de rosca sob atmosfera normal. As amostras foram mantidas a 4°C até análises.

#### **4.2.3. Proteólise enzimática**

Foi realizada segundo Bertrand-Harb et al. (2002). Amostras de  $\beta$ -LG foram preparadas em concentração de 2 mg/mL em tampão citrato de sódio 0,015 M, pH 2,5 e incubadas a 37°C com pepsina em uma relação de E/S (p/p) de 1:100 por 17 horas. Ao final desse tempo, a reação foi interrompida ajustando-se o pH para 7,0 por adição de quantidades apropriadas de solução tampão de TRIS-HCl 1 M, pH 8,9.

Para a hidrólise com tripsina, amostras de  $\beta$ -LG foram preparadas na concentração de 2 mg/mL em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 8,0 e incubadas a 37°C em uma relação de E/S (p/p) de 1:200, por 17 horas. A hidrólise foi interrompida por abaixamento do pH a 2,0, com a adição de HCl 0,2 N. As amostras hidrolisadas foram mantidas congeladas (-18 °C) até análise por RP-HPLC e/ou por espectrometria.

#### **4.2.4. Métodos espectrofotométricos**

##### **➤ Dicroísmo Circular (CD)**

Os espectros de CD foram registrados em um espectropolarímetro JASCO J-720 acoplado com banho de água RD306 (Japan Spectroscopic Co., Japan) nas seguintes condições: temperatura 22,5°C, velocidade de varredura = 100 nm/min, largura de banda=1,0 nm, resolução=1 nm (para UV-longínquo) 0,2 nm (para UV-próximo), tempo de resposta= 1 seg, (no UV-longínquo) 0,25 seg (no UV-próximo) e 9 acumulações. As amostras de  $\beta$ -LG foram analisadas em solução de tampão fosfato 10 mM a pH 7,0 em concentração de 0,1 mg/mL and 1 mg/mL para UV-longínquo e UV-próximo, respectivamente. A concentração de proteína foi estimada usando  $\epsilon_{280nm}=17600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ou  $\epsilon_{280nm} = 0,96 \text{ mL mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (EIGEL et al., 1984). Os espectros da proteína foram obtidos usando cubetas de quartzo cilíndricas de caminho óptico de 0,1 cm (para UV-longínquo, 185-260 nm) e 1,0 cm (para UV-próximo, 250-350 nm). Para cálculo da estrutura secundária, foi utilizado o método baseado em algoritmos CDSSTR, como descrito por Whitmore e Wallace (2004), na DICHROWEB (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb>).

#### ➤ **Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS)**

As medidas de espalhamento a baixos ângulos foram realizadas na linha SAXS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron do Brasil (LNLS). Os experimentos foram feitos usando um porta-amostra capilar ( $\varnothing$  1,5 mm) (CAVALCANTI et al., 2004) a 20 °C, comprimento de onda do raio-X = 1,488 Å e distância amostra-detector de 744,9 mm. Amostras de  $\beta$ -LG (3 e 10 mg/mL) foram avaliadas em tampão de fosfato de sódio 10 mM. Para cada amostra, quatro *frames* de 10 min foram coletados. O tratamento dos dados foi feito usando o programa TRAT1D (OLIVEIRA, 2003). Correções, padrão e cálculos de erros estão incluídos nesta rotina. Para a análise de dados, foi usado o programa GNOM (SEMENYUK; SVERGUN, 1991). Este programa permite o ajuste teórico e o cálculo da função de distribuição de pares de distâncias  $p(r)$ . O programa CRY SOL (SVERGUN; BARBERATO; KOCH, 1995) foi usado para efetuar o cálculo das curvas teóricas de SAXS a partir das coordenadas cristalográficas e permitiu o ajuste dos dados experimentais de espalhamento.

#### ➤ **Grupos tiol (-SH) livres totais**

Os grupos SH totais foram determinados usando o reagente de Ellman (5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzoico)) (DTNB), de acordo com Yang et al. (2001). O DTNB, usado em concentração 2,5 mM foi preparado em tampão fosfato (10 mM, pH 7,0), contendo uréia 8,0 M e sal dissódico de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1 mM. Uma alíquota de 0,5 mL de solução de  $\beta$ -LG em concentração de 5 mg/mL em tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7,0) foi misturada com 1,95 mL de tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7,0), contendo uréia 8,0 M e EDTA 1 mM, e adicionados 0,05 mL da solução de DTNB (2,5 mM). Depois de 15 minutos, foi medida a absorvância a 412 nm e estimado o número de moles de SH por mol de  $\beta$ -LG utilizando um coeficiente de extinção de  $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para cálculo dos moles de SH (YANG et al., 2001; ELLMAN, 1959). A concentração da  $\beta$ -LG foi medida pela absorvância das amostras a 280 nm, usando o coeficiente de extinção molar de  $17600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (DUFOUR; HOA; HAERTLÉ, 1994; EIGEL et al., 1984).

#### ➤ **Fluorescência**

Medidas de fluorescência Intrínseca e de fotometria de fluorescência foram obtidas utilizando um Espectrofluorímetro Hitachi F-4500 (Hitachi, Tokyo, Japan).

*Fluorescência Intrínseca do Trp*: foi medida para avaliar o grau de desnaturação da proteína. Foram utilizadas amostras de  $\beta$ -LG (1 mg/mL) em solução tampão (fosfato de

sódio 10 mM, pH 7,0). Foram usadas  $\lambda_{exc}=280$  nm e  $\lambda_{emiss}=350-450$  nm, largura de banda de 5 nm, fendas de excitação=2,5 nm e de emissão=5 nm, velocidade de varredura =240 nm/min e PMT voltagem =700 V.

*Fotometria de fluorescência das bitirosinas:* foi realizada para estimar o conteúdo de ligações cruzadas entre radicais tirosil formados no tratamento de irradiação da proteína (DAVIES, DELSIGNORE, LIN, 1987). Amostras de  $\beta$ -LG diluídas a 0,5 mg/mL em solução tampão (fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0) foram utilizadas. Utilizou-se comprimento de onda de excitação de 325 nm e as medidas de intensidade de fluorescência foram obtidas no comprimento de onda de emissão de 416 nm. Foi fixada uma velocidade de varredura de 240 nm/min e uma fenda de excitação e de emissão em 5 nm.

*Fotometria de fluorescência do retinol ligado à  $\beta$ -LG:* realizada para avaliar o grau do poder ligante de  $\beta$ -LG irradiada segundo método empregado por Subramaniam, Steel e Gafni (1996). Neste método, monitora-se o aumento da fluorescência do retinol a 470 nm após ligação a  $\beta$ -LG. Alíquotas de retinol (15  $\mu$ L) dissolvido em etanol em concentração 3 mM são adicionados à uma cubeta contendo 3 mL de proteína 1,0 mg/mL em tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7,0). Os componentes são cuidadosamente misturados e deixados para equilibrar durante 3-4 minutos antes de fazer a leitura de fluorescência, logo adiciona-se mais uma alíquota e assim sucessivamente até os valores da leitura ficarem constantes. Utiliza-se excitação a 330 nm e emissão a 470 nm. A velocidade de varredura se fixou em 240 nm/min e as fendas de emissão e excitação em 10 e 5 nm, respectivamente.

#### ➤ **Espectrofotometria de UV e Visível**

##### *Transmitância*

A transmitância das amostras de  $\beta$ -LG dissolvidas em tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7,0), em concentração de 10 mg/mL de proteína (com exceção das amostras irradiadas em solução em concentração de 3 mg/mL) foi medida a 550 nm. Foi utilizado um espectrofômetro UV-Visível, BECKMAN DU-70 (Fullerton, CA, USA).

##### *Absorbância*

As medidas de absorbância a 280 nm de soluções de  $\beta$ -LG foram efetuadas utilizando espectrofômetro de UV-Visível, BECKMAN DU-70 (Beckman, Fullerton, CA,

USA). A concentração de  $\beta$ -LG em soluções preparadas para as diversas análises foi estimada usando  $\epsilon_{280\text{nm}}=17600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ou  $\epsilon_{280\text{nm}} = 0,96 \text{ mL mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (EIGEL et al., 1984)

Para determinação da concentração proteica nos hidrolisados de  $\beta$ -LG com pepsina, foram retiradas alíquotas de 2 mL e misturadas com 2 mL de solução 20 % de ácido tricloroacético (TCA) e centrifugadas a 10000 g por 10 min à temperatura ambiente. Foi medida a absorvância a 280 nm para avaliar o grau de degradação da proteína. Para cálculo do teor protéico, foram utilizados os mesmos coeficientes de extinção molar usados para cálculo da concentração de proteína acima mencionada. (REDDY; KELLA; KINSELLA, 1988).

#### **4.2.5. Métodos cromatográficos**

##### **➤ Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de fase reversa (RP-HPLC).**

Esta técnica foi utilizada para avaliar o grau de pureza da  $\beta$ -LG utilizada no trabalho. Foi também utilizada para estudo do perfil cromatográfico dos proteólisados trípticos e pépticos, utilizando o método descrito por Croguennec et al. (2003). O cálculo das áreas dos peptídeos no cromatograma foi realizado como indicado por Otte et al. (1997).

Em todas as análises, um volume de 20  $\mu\text{L}$  de amostra foi injetado manualmente no cromatógrafo líquido de marca Varian (Varian, Walnut Creek, CA, USA) que inclui bomba Varian 9012, detector de absorvância UV-VIS de duplo comprimento de onda Varian 9050 e o software Star Chromatography Workstation, munido de coluna Varian C<sub>18</sub> (250 mm x 4,5 mm DI). As condições cromatográficas foram: temperatura da coluna 40°C, fluxo de 1,0 mL/min. A fase móvel foi composta de solvente A: água/ácido trifluoroacético (99:1) e solvente B: acetonitrila, água e ácido trifluoroacético (65:35:1). Os solventes foram filtrados através de membrana 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore) e sonicados por 10 min em ultrassom. Foi aplicado um sistema de gradiente iniciado com 20 % de solvente B, passando para 100% em 30 min, decrescendo para 20% aos 40 min. O detector foi fixado em 214 nm.

##### **➤ Cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (SE-HPLC)**

A análise de exclusão molecular foi realizada em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, consistindo de uma bomba Varian 9012, um detector de absorvância de duplo comprimento de onda Varian 9050 e o software Star Chromatography Workstation (todos da Varian, Walnut Creek, CA, USA) que permite a

obtenção e processamento da informação cromatográfica. Volume de 20  $\mu$ L de  $\beta$ -LG 0.5 mg/mL em tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7,0) foi aplicado a uma coluna RES-ELUT-SEC 3000 (300 x 7,75 mm d.i.) (Varian, Palo Alto, CA, USA) e eluída com tampão fosfato de sódio (50 mM, NaCl 0.15 M pH 6.8) a um fluxo de 0,8 mL/min e monitorada por absorção a 280 nm. A massa molar aparente correspondente aos picos eluídos foi estimada a partir de uma curva de calibração construída usando marcadores da Bio-Rad (Hercules, CA, USA): tiroglobulina bovina (670 kDa), gama globulina bovina (158 kDa), ovalbumina (44 kDa), mioglobulina (17 kDa) e vitamina B-12 (1,35 kDa).

#### **4.2.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativa, desnaturante e redutora**

As análises de PAGE e SDS-PAGE da  $\beta$ -LG sem tratamento e da  $\beta$ -LG irradiada foram realizadas como descrito por Laemmli (1970), utilizando equipamento *Phast System*, Pharmacia Biotech (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) usando géis *Phast-System* de 12,5% (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden).

As amostras foram preparadas em tampão de amostra contendo SDS, contendo ou não 5%  $\beta$ -mercaptoetanol e aquecidas a 95°C por 5 min. Os géis foram corados com Comassie Brilliant Blue R250. Um kit de marcadores de baixa massa molar (14,4-94 kDa), da Pharmacia (Uppsala, Sweden), foi usado para calibração.

#### **4.2.7. Isoterma de sorção**

A isoterma de sorção foi obtida segundo método proposto por Labuza, Kaanane, e Chen (1985). As amostras de  $\beta$ -LG com umidade inicial de 4,3% foram colocadas em sistemas fechados contendo soluções saturadas de sais de LiCl, MgCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NaCl, KCl e BaCl<sub>2</sub> a 25°C por 12 dias, tempo em que o equilíbrio foi alcançado. Os dados foram analisados pelo modelo GAB (Guggenheim – Anderson – de Bôer), utilizando o programa Water Analyzer Series – Isotherm/BET/GAB, Versão 2.05p. As análises foram feitas em triplicata.

#### **4.2.8. Análises Estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa SAS® Statistical Analysis System (Cary, North Carolina, USA. SAS Institute Inc., SAS Campus Drive), Version 8.0, 2000. Os resultados experimentais foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

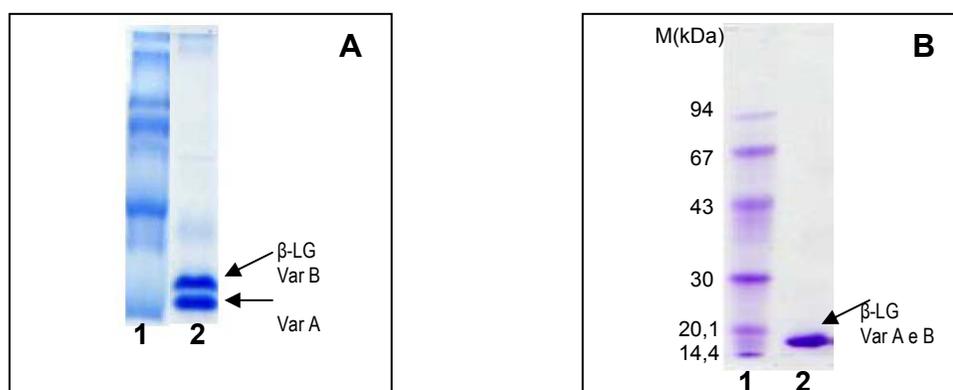
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Caracterização da $\beta$ -LG

A  $\beta$ -LG apresentou teor de proteína de  $93,6 \pm 0,6\%$ , umidade de  $4,29 \pm 0,02\%$  e atividade de água de  $0,22 \pm 0,01$  medida à  $25^\circ\text{C}$ .

O grau de pureza foi avaliado por eletroforese em gel com e sem desnaturante e por cromatografia líquida de fase reversa.

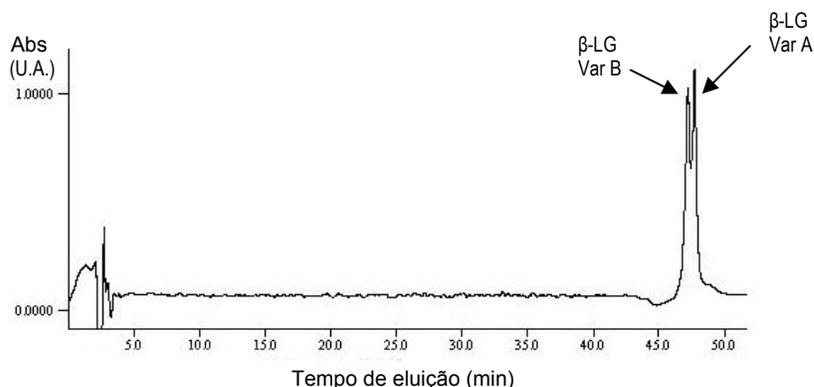
A Figura 5 mostra o perfil eletroforético da  $\beta$ -LG com  $a_w$  inicial de 0,22 no sistema PAGE (A) e no SDS-PAGE (B).



**Figura 5.** Perfil eletroforético da  $\beta$ -LG ( $a_w$ :0,22); A: PAGE e B: SDS-PAGE, em gel de poliacrilamida de 12%. Linha 1: padrão massa molar da Pharmacia (14,4-94 kDa), linha 2: amostra de  $\beta$ -LG.

Na eletroforese em gel PAGE (Figura 5 A) observa-se a presença de duas bandas na parte inferior do gel, a inferior correspondendo à  $\beta$ -LG variante A e a superior à variante B (MANDERSON; HARDMAN; CREAMER, 1998; YANG et al., 2001). Já na eletroforese SDS-PAGE (Figura 5B), observa-se apenas uma banda pois as cargas de ambas as variantes se igualam, dando origem a uma banda única correspondente à  $\beta$ -LG monômero, de massa molar  $\sim 18,4$  kDa que corresponde ao valor aproximado para uma mistura das variantes A e B da  $\beta$ -LG.

No cromatograma de fase reversa (Figura 6) observa-se um pico no tempo de ~46-47 minutos de eluição, dividido em dois máximos que correspondem à  $\beta$ -LG variante B o primeiro, e à variante A o segundo (CAESSENS et al., 1999; ELGAR et al., 2000).



**Figura 6.** Cromatograma de RP-HPLC da  $\beta$ -LG ( $a_w=0,22$ ). Aliquotas de 20  $\mu$ L de solução de  $\beta$ -LG (0,5 mg/mL em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0) foram injetados numa coluna  $C_{18}$  equilibrada a 40 °C. A eluição foi feita com fluxo de 1,0 mL/ min em gradiente de acetonitrila e a absorbância monitorada a 214 nm.

A análise de eletroforese e a cromatografia de fase reversa sugerem que a  $\beta$ -LG possui alto grau de pureza, indicado pela presença exclusiva do pico da  $\beta$ -LG no cromatograma (Figura 6) e pela única banda na região que corresponde ao monômero da proteína em meio desnaturante com SDS. (Figura 5 B)

A isoterma obtida para a  $\beta$ -LG (Figura 7) tem a forma característica das isotermas da maioria dos alimentos. O conteúdo de água na monocamada ( $M_0$ ) foi de 0,0728 g por 1 g de sólidos (corresponde a ~74 moléculas de água por mol de  $\beta$ -LG monômero).

No presente experimento, amostras de  $\beta$ -LG sólida com  $a_w$  de 0,22, 0,53 e 0,74 foram submetidas a tratamento de irradiação e, segundo a isoterma de sorção mostrada na Figura 7, estes valores de  $a_w$  correspondem aproximadamente, a 6, 12 e 18 g de água / 100 g de produto seco, respectivamente. Estes valores de hidratação da proteína podem garantir sua estabilidade enquanto não for submetida a tratamento (LAI; TOPP, 1999; LIU; LANGER; KLIBANOV, 1991; RUPLEY; CARERI, 1991).

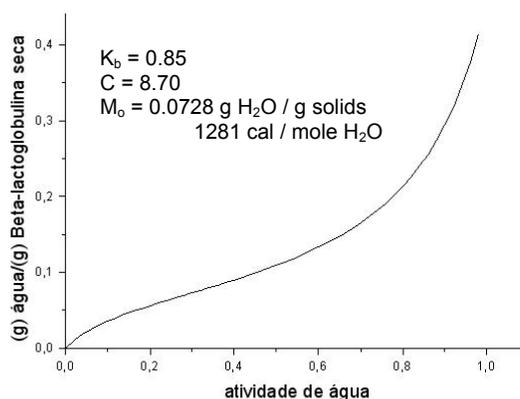


Figura 7. Isotherma de sorção da  $\beta$ -LG a 25°C.

Diferentes graus de hidratação da proteína podem significar diferentes susceptibilidades aos tratamentos como o de irradiação, onde reações ou alterações poderão ocorrer, e afetar a sua estabilidade. É conhecido, que à baixa atividade de água, fatores importantes como a falta de flexibilidade conformacional e resistência a reações envolvendo ligações covalentes contribuem para uma maior estabilidade da proteína (ZAKS, 1992).

## 5.2. Efeitos da radiação gama na $\beta$ -LG

Os resultados foram agrupados considerando três aspectos importantes: (1) mudanças estruturais, (2) agregação e (3) mecanismo de agregação para explicar melhor a amplitude dos efeitos da irradiação gama na proteína  $\beta$ -LG.

### 5.2.1. Mudanças estruturais

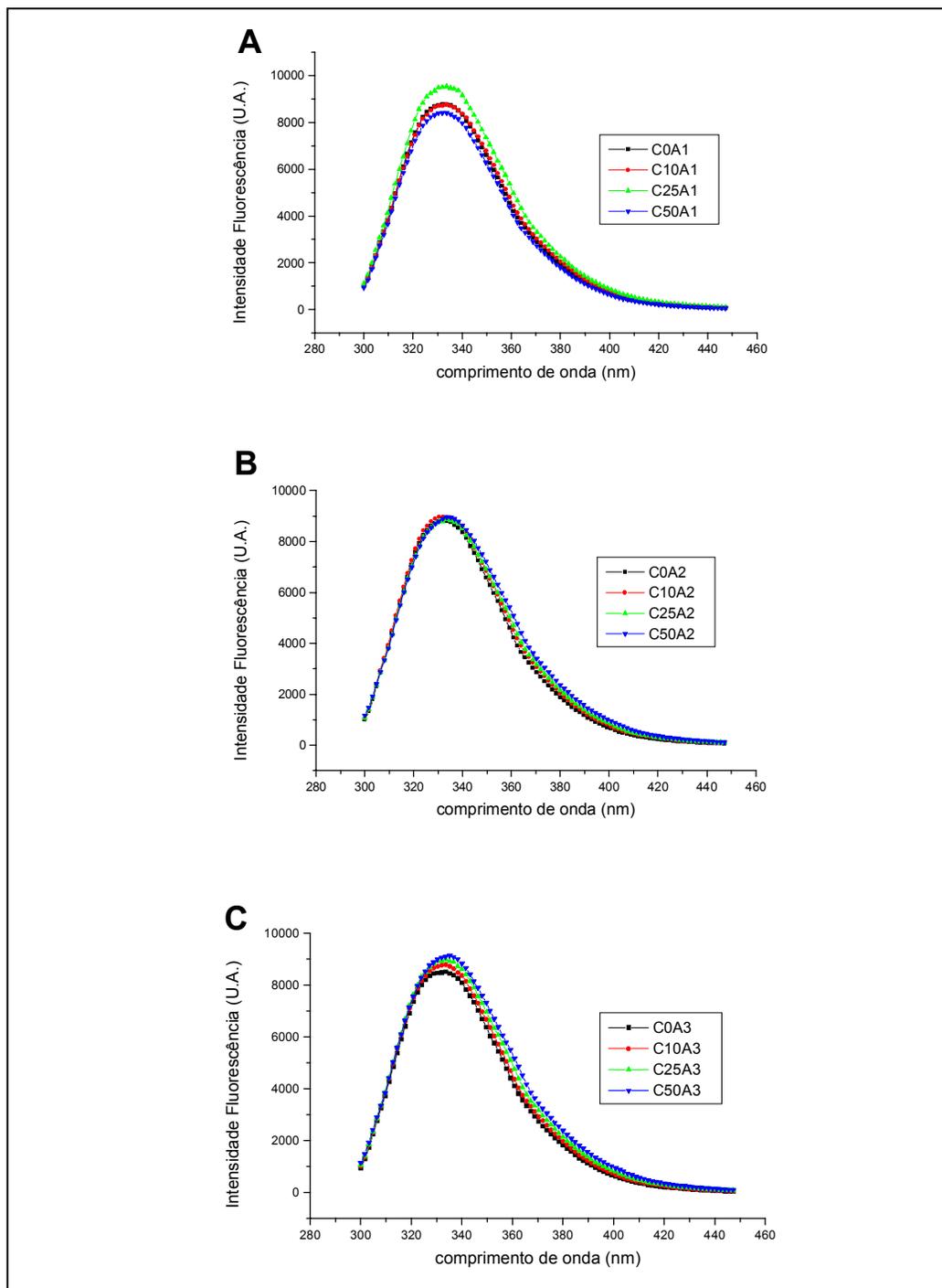
As mudanças estruturais foram avaliadas por análises de fluorescência intrínseca, dicroísmo circular e grupos sulfidril livre. Embora as análises de SAXS também forneçam dados estruturais, estes serão expostos no item sobre agregação.

#### ➤ Fluorescência intrínseca

##### *Amostras irradiadas sólidas*

Foram feitas medidas de fluorescência intrínseca para avaliar modificações estruturais da proteína irradiada. As amostras irradiadas sólidas ( $a_w$  0,22, 0,53 e 0,74) com doses até 50 kGy não mostraram diferenças com respeito à amostra não irradiada (Figura 8, A, B, C), apresentando a mesma intensidade e igual máximo (333 nm) na curva de

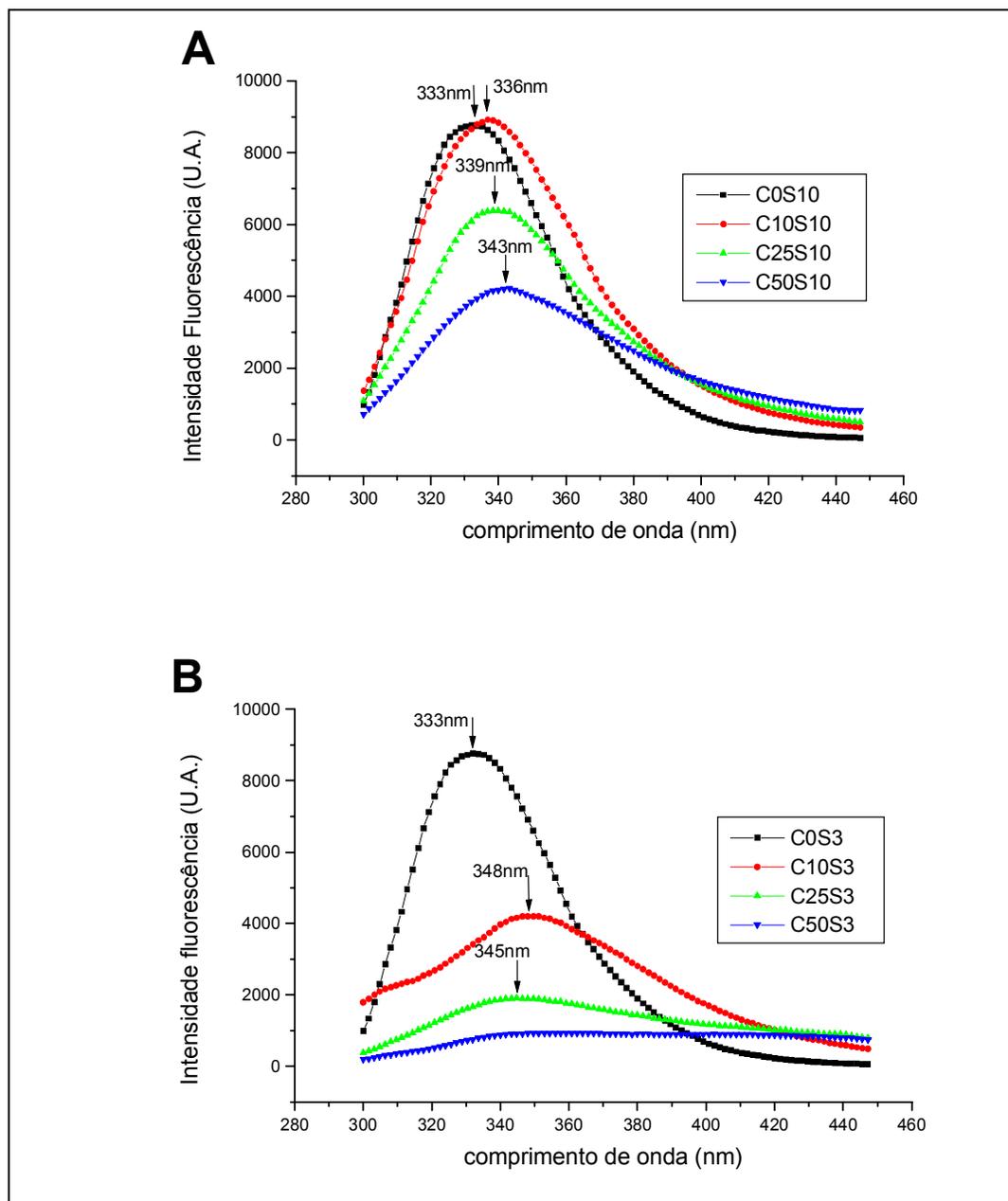
fluorescência. As pequenas variações na intensidade entre as amostras estão dentro do erro experimental de ~10 % (SUBRAMANIAM; STEEL; GAFNI, 1996).



**Figura 8.** Espectros de fluorescência intrínseca da  $\beta$ -LG irradiada sólida com 0, 10, 25 e 50 kGy. (A) Amostras ( $a_w$  0,22) C0A1, C10A1, C25A1 e C50A1; (B) ( $a_w$  0,53), amostras C0A2, C10A2, C25A2 e C50A2; e (C) ( $a_w$  0,74), amostras C0A3, C10A3, C25A3 e C50A3.

### Amostras irradiadas em solução

As amostras de proteína irradiada em solução, com exceção da irradiada a 10 kGy e concentração de 10 mg/mL (C10S10), apresentaram diminuição da intensidade de fluorescência, em conjunto com deslocamento do máximo da intensidade para comprimentos de onda maiores (*red-shift*) (Figura 9).



**Figura 9.** Espectro de fluorescência intrínseca da  $\beta$ -LG irradiada em solução com 0, 10, 25 e 50 kGy: (A) (10mg/mL) amostras C0S10, C10S10, C25S10, C50S10 e (B):  $\beta$ -LG (3mg/mL) amostras C0S3, C10S3, C25S3, e C50S3.  $\lambda_{exc}$ =280 nm e  $\lambda_{emiss}$ = 300-450 nm.

As curvas correspondentes à  $\beta$ -LG irradiada em solução em concentração 10 mg/mL (C10S10, C25S10 e C50S10) (Figura 9A) apresentaram máximos de intensidade de fluorescência em 336, 339 e 343 nm, respectivamente. A amostra não irradiada (C0S10) apresentou máximo de intensidade em 333 nm, indicando a ocorrência de um deslocamento para o vermelho (*red-shift*) de 3, 6 e 10 nm para as amostras irradiadas com 10, 25 e 50 kGy, respectivamente.

As amostras irradiadas em solução em concentração de 3 mg/mL com 10 e 25 kGy (C10S3 e C25S3) apresentaram máximos de intensidade de fluorescência nos comprimentos de onda 348 e 345 nm, respectivamente (Figura 9B). Para a dose de 50 kGy (C50S3), o máximo não foi definido exatamente devido aos baixos valores de intensidade de fluorescência, mas estima-se que esteja entre 351-359 nm. Considerando o máximo da curva da  $\beta$ -LG sem irradiar em 333 nm, houve um deslocamento para o vermelho de 15, 12 e ~18 nm para as amostras irradiadas com 10, 25, e 50 kGy, respectivamente.

O deslocamento para o vermelho é decorrente da maior estabilização do estado excitado do Trp ao passar de um meio apolar para outro mais polar ou mais exposto ao solvente, o que poderia ser uma indicação de desnaturação da proteína (CHEN; BARKLEY, 1998; CALLIS, 1997). Os valores de deslocamento para o vermelho, relatados na literatura são de: ~13 nm para a desnaturação da  $\beta$ -LG pela ação da uréia 8M (YANG et al., 2001), 18 nm na presença de uréia 9,48 M, (CRAEMER, 1995) e de 20 nm na presença de cloreto de guanidínio 6M (SUBRAMANIAM; STEEL; GAFNI, 1996). Outros valores de deslocamento para o vermelho, encontrados na literatura são 4 nm quando a  $\beta$ -LG é submetida a pressão de 600 MPa (YANG et al., 2001) e ~8 nm quando a  $\beta$ -LG é submetida ao aquecimento até 85°C (MANDERSON; HARDMAN; CRAMER, 1999b).

Embora o deslocamento para o vermelho tenha sido observado para algumas amostras irradiadas em solução, ele não é suficiente para caracterizar desnaturação, pois deve ser analisado juntamente com a intensidade da fluorescência.

Observou-se diminuição na intensidade de fluorescência intrínseca do Trp nas amostras C25S10, C50S10, C10S3, C25S3 e C50S3 (Figura 9A e B), o que não seria esperado para amostras de  $\beta$ -LG que apresentam deslocamento para o vermelho, ou desnaturação. Para a  $\beta$ -LG, ao contrário do que ocorre para a maioria das proteínas globulares que apresentam desnaturação por aquecimento ou por reagentes químicos desnaturantes, o deslocamento para o vermelho, vem acompanhado de aumento na intensidade da fluorescência (YANG et al., 2001; VALENTE-MESQUITA; BOTELHO;

FERREIRA, 1998) devido, possivelmente, à diminuição da supressão da fluorescência do triptofano na proteína desnaturada. A diminuição da intensidade de fluorescência, observada nas amostras irradiadas em solução neste experimento, poderia ser explicada, ao menos parcialmente, pela ocorrência de perda de Trp devido à irradiação ou porque o Trp passou a ocupar uma posição com maior supressão que na estrutura nativa, devido à nova conformação ou agregação da proteína.

Com respeito ao deslocamento para o vermelho apresentado pelas amostras irradiadas em solução, duas observações são relevantes: a primeira, é que as bandas de fluorescência apresentam alargamento indicando que espécies fluorescentes diferentes do Trp podem estar interferindo no espectro de fluorescência e, conseqüentemente, o deslocamento para o vermelho mostrado não corresponda exclusivamente ao Trp mudando de ambiente. A segunda é que, com a irradiação, pode ter ocorrido desestabilização do estado singlete fundamental ( $S_0$ ) do Trp para um valor de energia mais alto, mais próximo do estado excitado ( $S_1$ ). Ao sofrer excitação, o Trp emitirá fluorescência de menor energia ao voltar a este estado singlete fundamental alterado, gerando um deslocamento para o vermelho que não teria como causa a mudança de ambiente do Trp de um meio apolar para um ambiente mais polar.

Desta forma, embora a ordem de grandeza dos valores de deslocamento para o vermelho observados nas amostras irradiadas em solução seja similar aos encontrados em caso de desnaturação por calor ou por desnaturantes químicos, não representa o mesmo grau de alteração estrutural. A possibilidade de ter ocorrido desestabilização do estado singlete fundamental do Trp e do surgimento de outras espécies fluorescentes nas amostras irradiadas em solução que influenciariam nos valores de deslocamento para o vermelho, levam a supor uma alteração estrutural maior da que realmente aconteceu.

#### ➤ **Dicroísmo Circular (CD)**

Foram analisadas por dicroísmo circular as amostras irradiadas sólidas e em solução, com doses de irradiação de 0, 10 e 50 kGy.

##### *Amostras irradiadas sólidas*

##### *Estrutura secundária. UV-longínquo*

Para o cálculo da estrutura secundária das amostras, foi utilizado o programa CDSSTR (WHITMORE; WALLACE, 2004; COMPTON; JOHNSON, 1986), (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb>) do servidor DICHROWEB e os resultados encontram-

se na Tabela 5. Antes de definir o método de cálculo do conteúdo de estrutura secundária, foram testados diferentes métodos de deconvolução do espectro de CD para a amostra C0A1 com o propósito de visualizar as diferenças no conteúdo da estrutura secundária, inerentes ao método de cálculo. Para esta amostra (C0A1), os valores obtidos utilizando os três métodos de cálculo apresentaram boa concordância. Foi escolhido o método CDSSTR por apresentar maiores facilidades de entrada dos dados no software correspondente.

**Tabela 3.** Conteúdo de estrutura secundária da amostra não irradiada, C0A1, obtido por diferentes métodos de deconvolução do espectro de UV-longínquo.

método	hélices- $\alpha$ %	filamentos- $\beta$ %	turns %	desordenadas %
CDSSTR	13	33	23	29
SELCON	14,3	34,1	22,6	26,9
CONTIN	16,6	32,9	22,1	28,6

A faixa de comprimento de onda analisado foi de 190-240 nm em todos os métodos.

Na literatura encontram-se diferentes valores para o conteúdo de estrutura secundária da  $\beta$ -LG nativa (Tabela 4), que são influenciados principalmente pela faixa de comprimento de onda utilizada na análise. Destaca-se, por exemplo, as diferenças encontradas para a mesma amostra analisada, utilizando o método SELCON (valores em negrito na Tabela 4), ao considerar faixas diferentes de comprimento de onda.

**Tabela 4.** Conteúdo de estrutura secundária da  $\beta$ -LG no estado nativo, reportados na literatura.

método	hélices- $\alpha$ %	filamentos- $\beta$ %	turns %	desordenadas %	autor
*X-rays	6,8	51,2	9,9	32,1	Brownlow et al. 1997
PROSEC	12	51	11	26	Phillips et al. 1995
CONTIN	16,6	45,2	12,3	25,8	Griffin et al. 1993
Regressão	15	54	12	19	De Jongh, 2001
**SELCON	<b>10</b>	<b>50</b>	<b>8</b>	<b>35</b>	Qi et al. 1997
***SELCON	<b>28</b>	<b>22</b>	<b>17</b>	<b>33</b>	Qi et al. 1997

Todas amostras foram analisadas a pH 7,0 com exceção de:

\*amostra analisada a pH 6,8

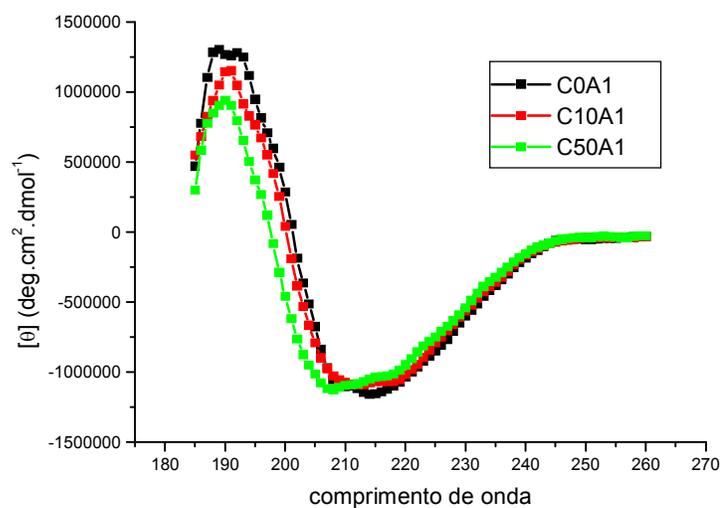
\*\*analisada a pH 6,75 e na faixa de 170-260 nm

\*\*\*mesma amostra que em \*\*, analisada a pH 6,75 e na faixa de 200-260 nm

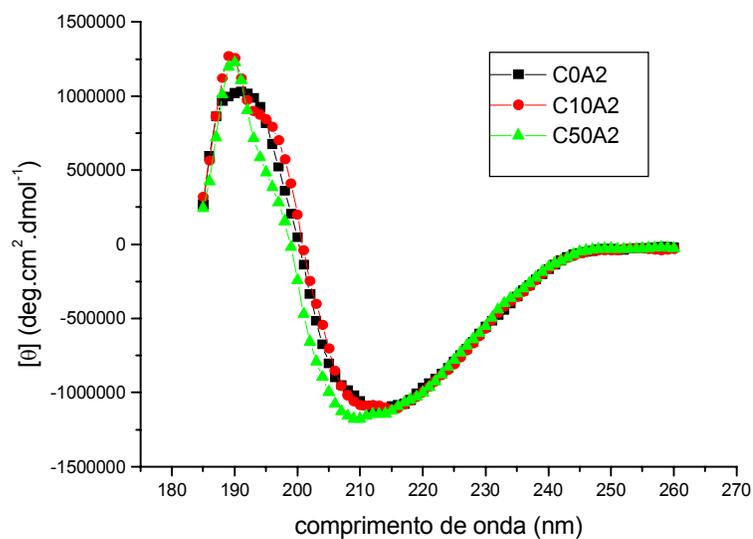
Os espectros de CD no UV-longínquo das amostras de proteína não irradiadas e das irradiadas no estado sólido (com diferente  $a_w$ ) são mostrados nas Figuras 10, 11 e 12. Para as amostras não irradiadas, o espectro de CD mostrou um extremo negativo ao redor de 216 nm, um cruzamento no dicróismo zero a 203 nm e um extremo positivo ao redor de 195 nm, características que sinalizam um alto conteúdo de filamentos- $\beta$  (CHANG WU; YANG, 1978). A deconvolução de espectro mostrou conteúdo de 13% de hélices- $\alpha$ , 33% de filamentos- $\beta$ , 23% de *turns* e 30% de estrutura desordenadas, confirmando a predominância de estruturas  $\beta$  (Tabela 5). Os valores calculados estão na faixa do conteúdo da estrutura secundária reportada por outros autores que também utilizaram dicróismo circular no cálculo para  $\beta$ -LG nativa, como alguns já mostrados na Tabela 4 (GRIFFIN et al., 1993; KUWAJIMA; YAMAYA; SUGAI, 1996; QI et al., 1997; PRABAKARAN; DAMODARAN, 1997; CROGUENEC et al., 2004).

Os espectros de CD das amostras irradiadas com doses de 10 e 50 kGy (Figuras 10, 11 e 12) foram quase idênticos na forma e intensidade aos das amostras não irradiadas, ressaltando que nas amostras irradiadas com 50 kGy, o máximo negativo em 216 nm (indicação de estrutura folhas- $\beta$ ) (KELLY; PRICE, 1997), deslocou-se para um comprimento de onda mais baixo, ~207- 209 nm, indicando efeito batocrômico.

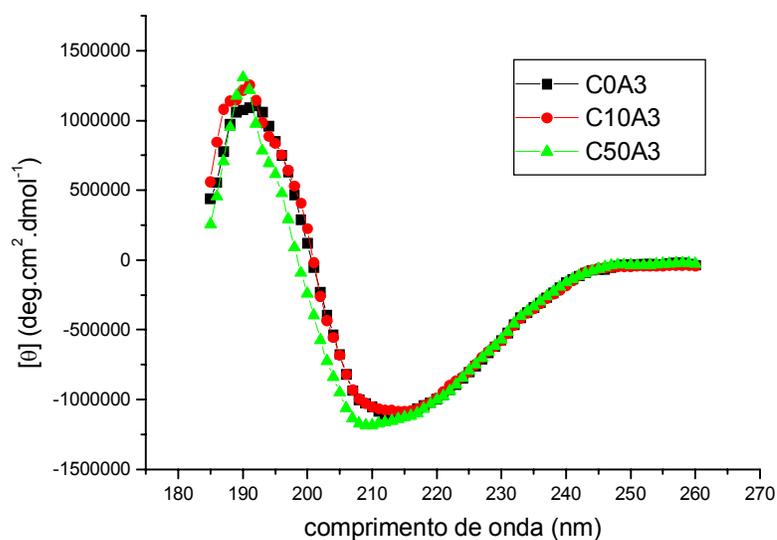
Este efeito batocrômico junto com o aumento na intensidade negativa do dicróismo no espectro caracterizaria a formação de estruturas desordenadas (MATSUURA; MANNING, 1994). No entanto, como o aumento de intensidade, somente observado para as amostras C50A2 e C50A3, foi muito pequeno, a formação de estruturas desordenadas não ocorreu nestas amostras, como avaliado pelo cálculo das estruturas secundárias ao utilizar o método de CDSSTR (Tabela 5).



**Figura 10.** Espectros de UV-longínquo da  $\beta$ -LG ( $a_w = 0,22$ ), não irradiada (C0A1), irradiada sólida com dose de 10 kGy (C10A1) e com 50 kGy (C50A1).



**Figura 11.** Espectros de UV-longínquo da  $\beta$ -LG ( $a_w = 0,53$ ), não irradiada (C0A2), irradiada sólida com 10kGy (C10A2) e com 50 kGy (C50A2).



**Figura 12.** Espectros de UV-longínquo da  $\beta$ -LG ( $a_w = 0,74$ ), não irradiada (C0A3), irradiada sólida com 10 kGy (C10A3) e com 50 kGy (C50A3).

**Tabela 5.** Conteúdo de estrutura secundária de amostras de  $\beta$ -LG irradiada sólida

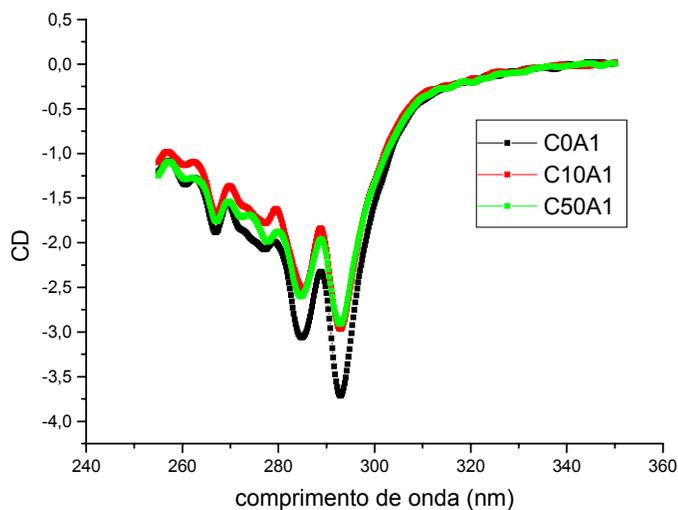
Amostra	hélices- $\alpha$	filamentos- $\beta$	turns	desordenadas	Total
C0A1	13	33	23	29	98
C10A1	13	32	23	31	99
C50A1	14	31	23	31	99
C0A2	13	34	23	30	100
C10A2	14	32	23	31	100
C50A2	13	33	23	30	99
C0A3	13	33	23	31	100
C10A3	13	32	23	30	99
C50A3	13	33	24	30	100

A deconvolução dos espectros de UV-longínquo indicou que não ocorreram alterações no conteúdo de hélices- $\alpha$  (~13%) ou filamentos- $\beta$  (~33%) nas amostras de  $\beta$ -LG irradiadas no estado sólido, independente da  $a_w$  ou das doses de irradiação.

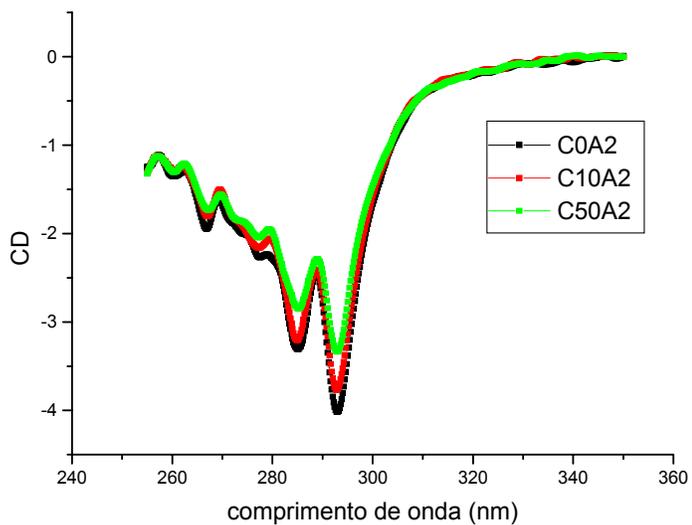
#### *Estrutura terciária. UV-próximo*

Os espectros de CD no UV-próximo das amostras irradiadas no estado sólido estão apresentados nas Figuras 13, 14 e 15. Independente da  $a_w$ , os espectros de CD foram similares aos espectros de CD no UV-próximo reportados na literatura para a  $\beta$ -LG na forma nativa, mostrando picos negativos em 260, 266, 275, 285, 292 nm, sinais associados com a rígida estrutura terciária da  $\beta$ -LG nativa. (KUWAYIMA; YAMAYA;

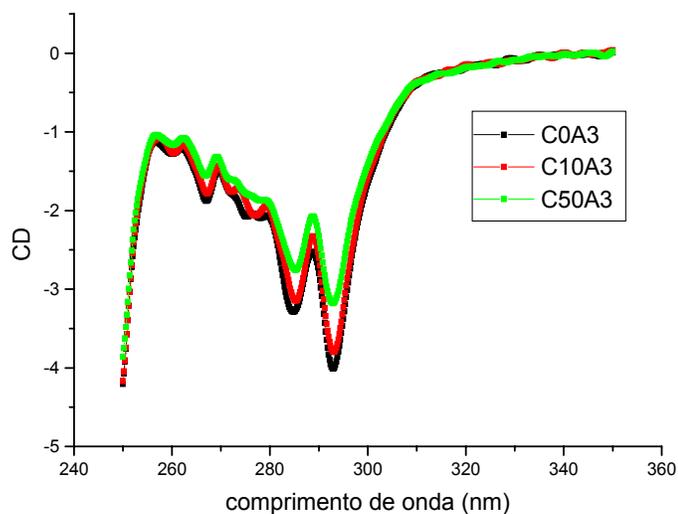
SUGAI, 1996; MANDERSON; CREAMER; HARDMAN, 1999b). Somente uma pequena diminuição na intensidade do dicroísmo foi observada ao ser aumentada a dose de radiação.



**Figura 13.** Espectro no UV-próximo da  $\beta$ -LG com  $a_w$  0,22, não irradiada (C0A1), irradiada com 10 kGy (C10A1) e com 50 kGy (C50A1).



**Figura 14.** Espectro no UV-próximo da  $\beta$ -LG  $a_w$  0,53, não irradiada (C0A2), irradiada com 10 kGy (C10A2) e com 50 kGy (C50A2).

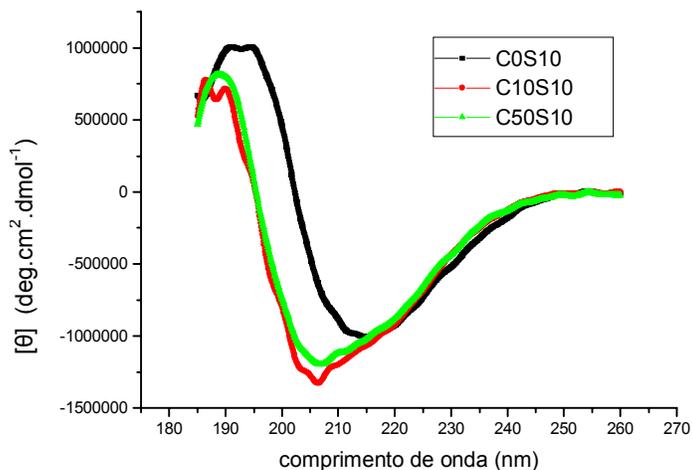


**Figura 15.** Espectro no UV-próximo da  $\beta$ -LG a<sub>w</sub> 0,74, não irradiada (C0A3), irradiada com 10 kGy (C10A3) e com 50 kGy (C50A3)

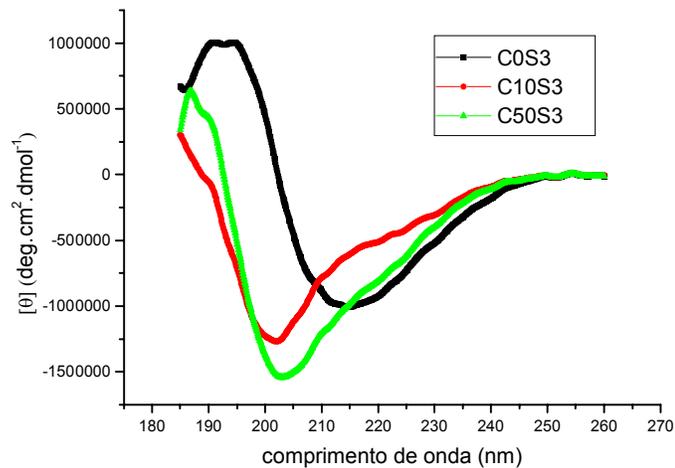
*Amostras irradiadas em solução*

*Estrutura secundária. UV-longínquo.*

As amostras irradiadas em solução em concentração de 10 mg/mL e 3 mg/mL apresentaram o dicroísmo no UV-longínquo mostrados nas Figuras 16 e 17.



**Figura 16.** Espectro no UV-longínquo da  $\beta$ -LG irradiada em solução em concentração de 10 mg/mL, não irradiada (C0S10) e irradiadas com 10 kGy (C10S10) e 50 kGy (C50S10).



**Figura 17.** Espectro no UV-longínquo da  $\beta$ -LG irradiada em solução em concentração de 3 mg/mL, não irradiada (C0S3) e irradiada com 10 kGy (C10S3) e 50 kGy (C50S3).

Os espectros de CD no UV-longínquo das amostras C10S10 e C50S10 foram similares ao espectro da amostra controle, não irradiada, mas exibiram aumento negativo da elipticidade e um deslocamento dos máximos negativos para comprimentos de onda mais curtos, de 219 para ~207 nm (Figura 16). Nas amostras C10S3 e C50S3 (Figura 17), estas mudanças foram mais drásticas, com alteração na forma e na intensidade relativa do CD e também deslocando a banda negativa para uma posição de comprimento de onda mais baixo, 202-205 nm. Isto sugere que tanto a dose de irradiação como a concentração de proteína das amostras irradiadas foram as responsáveis pelas alterações estruturais que originaram a diferença entre os espectros de UV-longínquo. Para uma mesma dose de irradiação, a concentração menor gerou alterações mais significativas.

Apesar destas alterações, as amostras apresentam apenas pequenas diferenças no conteúdo de folhas- $\beta$  e hélices- $\alpha$  que a proteína não irradiada (Tabela 6).

**Tabela 6.** Conteúdo de estrutura secundária da  $\beta$ -LG irradiada em solução (3mg/mL e 10mg/mL).

Amostra	hélices- $\alpha$	filamentos- $\beta$	turns	desordenadas	Total
C0S3	12	34	23	30	99
C10S3	9	31	25	34	99
C50S3	13	30	24	33	100
C0S10	12	34	23	30	99
C10S10	12	32	24	31	99
C50S10	12	32	24	32	100

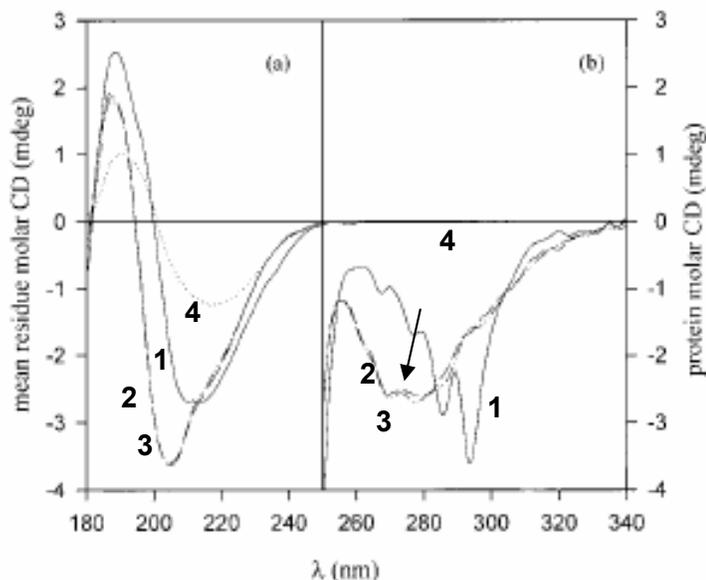
Os espectros de CD no UV-longínquo das amostras irradiadas em solução mostraram as mesmas características espectrais da  $\beta$ -LG submetida a tratamento térmico ou a alta pressão hidrostática.

Nos estudos sobre alterações estruturais por CD da  $\beta$ -LG submetida a tratamento térmico, as principais características, aumento da intensidade negativa da banda que caracteriza uma estrutura  $\beta$ , e o seu desvio para comprimentos de onda mais baixos, são geralmente mantidas, ainda que sejam utilizadas diferentes condições de pH, concentração de proteína ou tempo de aquecimento (GRIFFIN et al., 1993; MATSUURA; MANNING, 1994; QI et al., 1997; MANDERSON; CREAMER; HARDMAN, 1999b; CARROTA et al., 2001; CHEN et al., 2005). O mesmo é observado para tratamentos com alta pressão (YANG et al., 2001). Diferenças nos resultados entre estes estudos devem-se, principalmente, às diferenças na metodologia analítica (diferente faixa de comprimento de onda analisada), na interpretação ou no cálculo do conteúdo das diversas estruturas secundárias a partir dos espectros.

Um estudo interessante de Carrota et al. (2001), mostra que os espectros de CD no UV-longínquo do dímero da  $\beta$ -LG nativa (Figura 18(a) espectro 1) é diferente do dímero não nativo e dos oligômeros da  $\beta$ -LG formados no primeiro estágio do tratamento térmico (Figura 18 (a) espectros 2 e 3). O espectro correspondente ao dímero não nativo e aos oligômeros é praticamente o mesmo e similar aos obtidos para as soluções de  $\beta$ -LG irradiadas (Figuras 16 e 17).

Com base no estudo de Carrota et al. (2001) e nos resultados obtidos no presente trabalho conclui-se que: (1) a mudança estrutural de dímero nativo para não nativo pode ser capaz de causar a mudança no espectro de CD comum para todos os tratamentos por aquecimento, no primeiro estágio (<65°C), onde ocorre a formação de oligômeros; (2) as propriedades dos dímeros não nativos que originam tais características espectrais podem ser atribuídas também a outros oligômeros como trímeros ou tetrâmeros produzidos por

aquecimento da  $\beta$ -LG (Carrota et al., 2003) já que apresentam o mesmo tipo de espectro, e (3) que os oligômeros formados por irradiação devem apresentar alguma propriedade similar aos oligômeros produzidos por aquecimento já que também apresentam espectro de CD no UV-longínquo muito parecidos.



**Figura 18.** Espectro do dicroísmo circular no UV-longínquo (a) e UV-próximo (b) de  $\beta$ -LG. (1)  $\beta$ -LG dímero na sua forma nativa, antes do aquecimento; e (2), (3) e (4), produtos formados após aquecimento até 85°C e isolados por filtração em gel (2) dímero metaestável; (3) oligômeros; (4) agregados. (Ref: CARROTA et al., 2001).

O dímero não nativo e estável da  $\beta$ -LG caracterizado por Carrota et al. (2001) por dicroísmo circular parece corresponder ao mesmo dímero caracterizado por Croguenec et al. (2003, 2004) e conhecido como estado de *molten globule*, dímero estável gerado pelo aquecimento da  $\beta$ -LG. Por esta razão poder-se-ia concluir que as propriedades estruturais da forma *molten globule* poderiam ser as responsáveis pela geração do espectro característico de CD no UV-longínquo. No *molten globule* a estrutura secundária permanece praticamente inalterada, mas a estrutura terciária diferente da nativa apresenta maior mobilidade ou flexibilidade das cadeias laterais, mas ainda mantendo certo grau de compactação (PTITSYN, 1995).

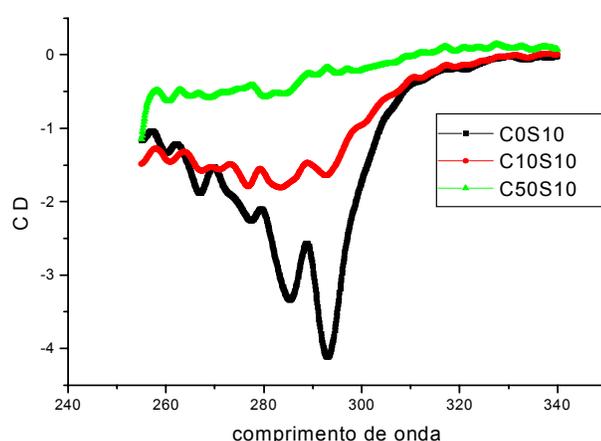
Nas amostras C10S10, C50S10, C10S3 e C50S3, a mudança para  $\lambda$  menor bem como o aumento da intensidade do máximo negativo do dicroísmo no espectro de UV-longínquo foram significativas o que caracterizaria a formação de estruturas desordenadas (MATSUURA; MANNING, 1994). No entanto, o cálculo da estrutura secundária não mostrou aumento destas estruturas (Tabela 6) o que parece indicar que a

avaliação apenas destes dois parâmetros não é suficiente para caracterizar a formação de estruturas desordenadas.

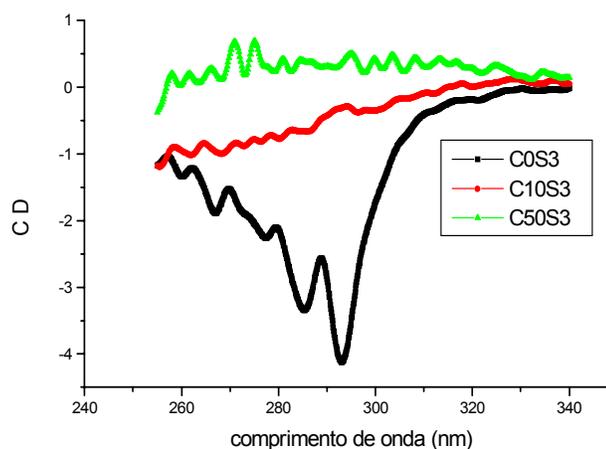
#### *Amostras irradiadas em solução*

##### *Estrutura terciária. UV-próximo*

As amostras irradiadas em solução (Figuras 19 e 20) apresentaram grande diminuição na magnitude dos picos, maior nas doses mais altas de radiação e concentração de proteína mais baixa, indicando perda do dicroísmo aromático. Esta perda de dicroísmo pode representar perda de estrutura terciária da proteína (PTITSYN; 1995; DOLGIKH et al., 1981; MATSUURA; MANNING, 1994).



**Figura 19.** Espectro de CD no UV-próximo da  $\beta$ -LG irradiada em solução em concentração de 10 mg/mL, não irradiada (C0S10) e irradiada com 10 kGy (C10S10) e 50 kGy (C50S10).



**Figura 20.** Espectro de CD no UV-próximo da  $\beta$ -LG irradiada em solução em concentração de 3mg/mL, não irradiada (C0S3) e irradiada com 10 kGy (C10S3) e 50 kGy (C50S3).

Redução substancial da intensidade dos picos foi observada na amostra de  $\beta$ -LG C10S10 (10 mg/mL, irradiada com 10 kGy), sendo maior a diminuição no pico em  $\sim$ 292nm correspondente ao Trp, enquanto o completo desaparecimento dos picos foi observado na amostra C50S10 (Figura 19). Amostras, com menor concentração de proteína (3 mg/mL) apresentaram redução quase total do sinal de dicroísmo já em dose de 10 kGy (C10S3) (Figura 20).

As medidas de fluorescência das amostras de  $\beta$ -LG irradiadas em solução sugerem que não somente pode ter ocorrido a mudança no ambiente do Trp mas, também, perda deste aminoácido. Este fato indicaria que nas análises de CD no UV-próximo os sinais diminuídos do dicroísmo podem ter sido causados em parte pela perda do Trp. No entanto, não se descarta a possibilidade de ter havido modificação no ambiente do Trp, originado por alguma modificação estrutural que permitiu uma maior mobilidade dos grupos laterais, sem prejuízo da perda estrutural do cálice hidrofóbico e estruturas  $\beta$  e  $\alpha$ .

Os resultados de CD no UV-longínquo sinalizaram a manutenção da estrutura secundária dos produtos gerados (oligômeros) na solução irradiada, e que estes produtos, tendo as mesmas características de CD no UV-longínquo que os produzidos por aquecimento, poderiam ter igualmente uma estrutura terciária semelhante à de molten globule. No entanto, se compararmos os espectros de CD no UV-próximo (Figuras 19 e 20) com os obtidos em estudo de tratamento da  $\beta$ -LG com aquecimento (Figura 18), pode-se observar que no tratamento com radiação os espectros não mostraram as bandas típicas atribuídas a ligações dissulfeto intermoleculares, (sinalizadas por uma seta no gráfico (b) da Figura 18, espectros 2 e 3) na faixa de comprimento de onda 260-290 nm (CARROTA et al, 2001; MANDERSON; CREAMER; HARDMAN, 1999b; KUWAJIMA; YAMAYA; SUGAI, 1996). Isto indica que a  $\beta$ -LG irradiada em solução não apresenta exatamente as características que configuram o estado de *molten globule* dos oligômeros produzidos nos primeiros estágios do aquecimento da proteína.

#### ➤ **Grupos sulfidril livres**

A  $\beta$ -LG apresenta duas pontes dissulfeto e uma cisteína livre, teoricamente um grupo SH, por monômero de  $\beta$ -LG. Este grupo SH livre se encontra protegido na superfície interdimérica (BROWNLOW et al., 1997; BRITTAN et al., 1997).

Os grupos sulfidril livres, determinados com reagente Ellman, estão reportados na Tabela 7. Nas amostras irradiadas no estado sólido, os grupos sulfidril livres diminuíram

significativamente em algumas amostras, à medida que a dose de irradiação foi aumentando, até um máximo de ~11% de perda na dose de 50 kGy.

**Tabela 7.** Teor de grupos sulfidril (–SH) livre em amostras de  $\beta$ -LG não irradiada, irradiada sólida ( $a_w$  0,22; 0,53 e 0,74) e irradiada em solução (3 e 10 mg/mL). Dose de irradiação em kGy. Resultados expressos como : moles-SH / mol de  $\beta$ -LG.

$\beta$ -LG	Moles SH / mol de $\beta$ -LG						
	0,0 kGy	1,0 kGy	2,5 kGy	5,0 kGy	10,0 kGy	25,0 kGy	50,0 kGy
$a_w$ 0,22	0,90±0,01 <sup>ab,1</sup>	0,90±0,01 <sup>a,1</sup>	0,88±0,01 <sup>abc,1</sup>	0,86±0,00 <sup>abc,1</sup>	0,85±0,01 <sup>bcd,1</sup>	0,83±0,04 <sup>cd,1</sup>	0,80±0,01 <sup>d,1</sup>
$a_w$ 0,53	0,90±0,02 <sup>a,1</sup>	0,90±0,01 <sup>a,1</sup>	0,89±0,01 <sup>ab,1</sup>	0,89±0,02 <sup>a,1</sup>	0,87±0,02 <sup>ab,1</sup>	0,85±0,03 <sup>ab,1</sup>	0,81±0,03 <sup>b,1</sup>
$a_w$ 0,74	0,90±0,03 <sup>a,1</sup>	0,88±0,01 <sup>ab,1</sup>	0,86±0,01 <sup>ab,1</sup>	0,86±0,02 <sup>ab,1</sup>	0,87±0,02 <sup>ab,1</sup>	0,84±0,01 <sup>b,1</sup>	0,84±0,03 <sup>b,1</sup>
3 mg/mL	0,90±0,01 <sup>a,1</sup>	0,59±0,02 <sup>b,3</sup>	0,51±0,02 <sup>c,3</sup>	0,43±0,01 <sup>d,3</sup>	0,25±0,01 <sup>ef,3</sup>	0,28±0,00 <sup>e,3</sup>	0,22±0,02 <sup>f,2</sup>
10 mg/mL	0,92±0,01 <sup>a,1</sup>	0,73±0,02 <sup>b,2</sup>	0,69±0,02 <sup>bc,2</sup>	0,64±0,02 <sup>c,2</sup>	0,51±0,03 <sup>d,2</sup>	0,38±0,00 <sup>e,2</sup>	0,26±0,01 <sup>f,2</sup>

Media de três determinações  $\pm$  desvio padrão

Medias, seguidas da mesma letra em cada linha e do mesmo número em cada coluna não diferem significativamente entre si ao nível de 5% (teste de Tukey).

Nas amostras irradiadas em solução, no entanto, a perda de sulfidril livre foi muito maior. A proteína em concentração de 3mg/mL teve uma perda de ~75% quando irradiada com 10kGy, enquanto as amostras em concentração de 10 mg/mL somente tiveram esse índice de perda com 50 kGy. A maior sensibilidade do grupo tiol em amostras com baixa concentração de proteína sugere que a degradação deste grupo esta relacionada com a maior interação com espécies ativas resultantes da radiólisis da água, que seriam produzidas em maior quantidade nas amostras mais diluídas, configurando a ocorrência do efeito indireto da radiação.

Quando a proteína é desnaturada por tratamento térmico ou por alta pressão hidrostática, o grupo SH livre fica mais exposto e se torna mais reativo, promovendo reações de intercâmbio tiol-dissulfeto que conduzem à formação de agregados ligados por pontes dissulfeto intermoleculares verificando-se, então, diminuição na quantidade de grupos SH livres (BAUER; HANSEN; OGENDAL, 1998; SHIMADA; CHEFTEL, 1989; IAMETTI et al., 1996; HOFFMANN; MIL, 1997). No presente estudo, embora tenha sido

verificada diminuição dos grupos SH, a formação de agregados da proteína e a contribuição dos grupos SH na formação de ligações dissulfeto intermoleculares precisou ser estudada e os resultados serão apresentados posteriormente. Destaca-se, no entanto, que, como as amostras irradiadas apresentaram cheiro característico de produtos sulfurados, mais evidente nas amostras irradiadas em solução e com doses maiores, é possível que tenha ocorrido algum grau de decomposição dos resíduos de aminoácidos que contém sulfidrilas, como a cisteína. Sabe-se que a cisteína é um dos aminoácidos mais sensíveis à irradiação, podendo sofrer oxidação por ação de radicais livres (GARRISON, 1987)

### **5.2.2. Agregação**

Agregação da  $\beta$ -LG devido à irradiação foi avaliada mediante análises de turbidez; eletroforese em gel PAGE; SE-HPLC e SAXS.

#### **➤ Turbidez**

As amostras irradiadas na forma sólida e em solução apresentaram-se límpidas e translúcidas após a radiação com todas as doses (1-50 kGy) e a turbidez, medida por transmitância a 550nm, praticamente não foi alterada (Tabela 8), indicando não haver formação de agregados visíveis como mostrado pelos valores de transmitância mantidos na ordem de 90%. A leitura da transmitância da amostra irradiada em concentração de 3 mg/mL foi feita nesta mesma concentração e apresentou valores de transmitância comparativamente maiores que os das amostras lidas na concentração de 10 mg/mL. Estes resultados parecem indicar que prevaleceu o efeito de diluição frente a qualquer outro esperado pelo tratamento por irradiação.

**Tabela 8.** Transmitância (%) medida a  $\lambda=550$  nm da  $\beta$ -LG não irradiada e irradiada sólida ( $a_w$ s 0,22; 0,53 e 0,74) lida em solução (10 mg/mL) em tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7,0) e  $\beta$ -LG irradiada em solução de tampão fosfato (10 mM, pH 7,0) a 3 e 10(mg/mL), lida nestas mesmas concentrações.

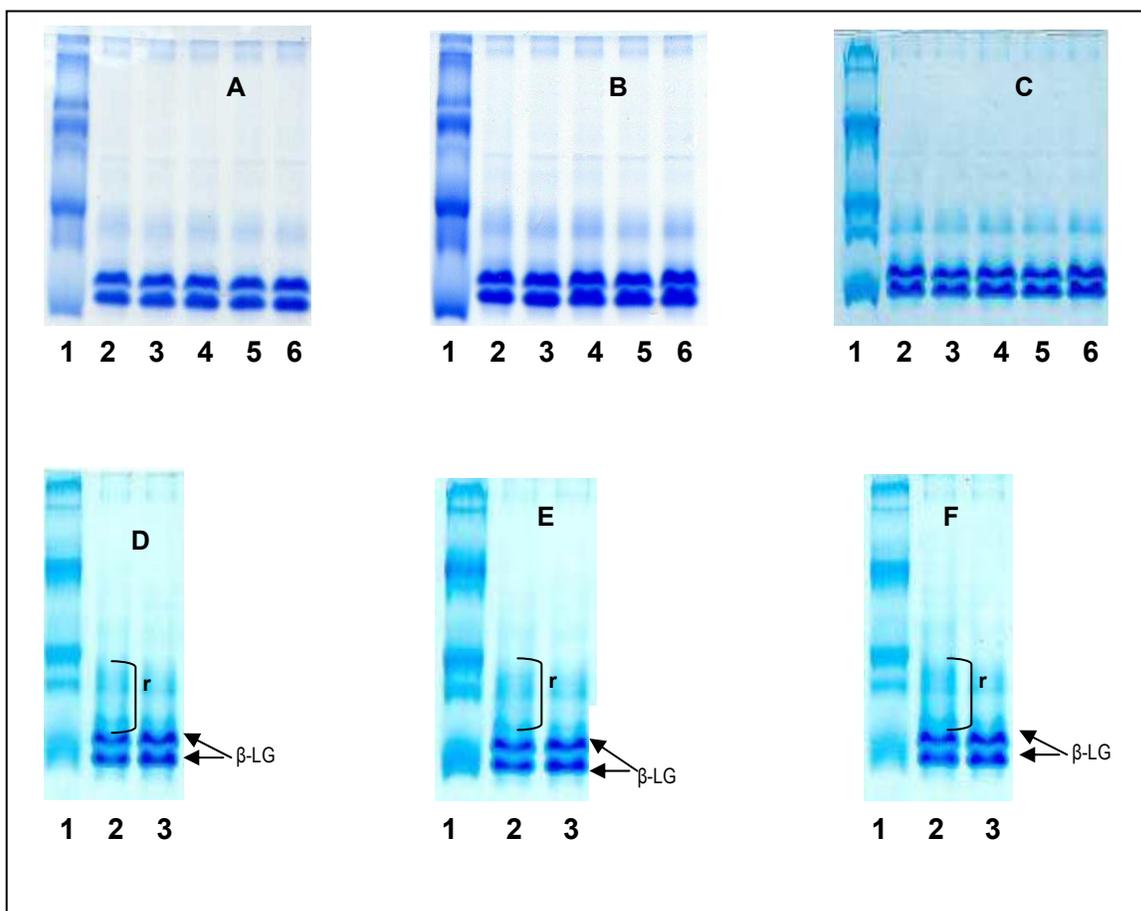
		Transmitância %						
$\beta$ -LG	0,0 kGy	1,0 kGy	2,5 kGy	5,0 kGy	10,0 kGy	25,0 kGy	50,0 kGy	
$a_w$ 0,22	90,95±0,87 <sup>a.3</sup>	91,62±0,15 <sup>a.2</sup>	89,73±0,14 <sup>a.3</sup>	89,80±0,85 <sup>a.3</sup>	90,68±1,48 <sup>a.2</sup>	92,84±0,49 <sup>a.2</sup>	91,22±1,24 <sup>a.3,4</sup>	
$a_w$ 0,53	88,75±1,75 <sup>c.4</sup>	92,26±0,92 <sup>a.2</sup>	91,97±0,42 <sup>ab.2</sup>	92,30±0,74 <sup>a.2</sup>	93,18±0,06 <sup>a.2</sup>	91,60±0,20 <sup>ab.2</sup>	90,45±1,51 <sup>bc.4</sup>	
$a_w$ 0,74	92,58±1,36 <sup>a.2,3</sup>	93,30±1,71 <sup>a.2</sup>	91,94±0,76 <sup>ab.2</sup>	89,58±1,36 <sup>b.3</sup>	93,33±0,78 <sup>a.2</sup>	91,61±2,84 <sup>ab.2</sup>	92,76±0,21 <sup>a.2,3</sup>	
3 mg/mL	97,37±0,19 <sup>a.1</sup>	96,99±0,27 <sup>a.1</sup>	96,69±0,39 <sup>a.1</sup>	96,56±0,37 <sup>a.1</sup>	96,46±0,53 <sup>a.1</sup>	97,23±0,20 <sup>a.1</sup>	96,59±0,34 <sup>a.1</sup>	
10 mg/mL	93,44±0,38 <sup>a.2</sup>	93,24±0,69 <sup>a.2</sup>	93,08±0,84 <sup>a.2</sup>	93,13±0,65 <sup>a.2</sup>	93,20±0,64 <sup>a.2</sup>	94,15±0,10 <sup>a.2</sup>	93,37±0,13 <sup>a.2</sup>	

Media de três determinações  $\pm$  desvio padrão.

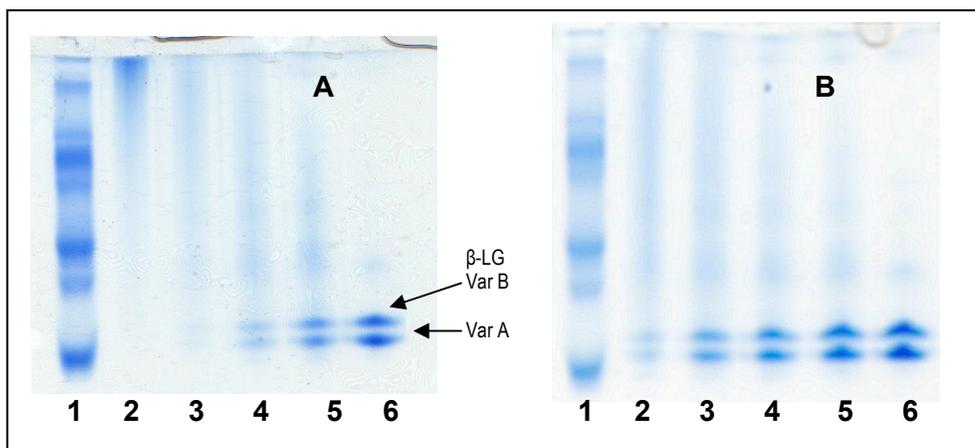
Medias, seguidas da mesma letra em cada linha e do mesmo número em cada coluna não diferem significativamente entre si ao nível de 5% (teste de Tukey).

#### ➤ Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).

As amostras irradiadas sólidas com até 10 kGy, independente da  $a_w$ , não mostraram diferenças na eletroforese não desnaturante (PAGE), apresentando o mesmo perfil que a amostra correspondente não irradiada (linha 6 nos géis A, B e C, Figura 21). As amostras com  $a_w$  0,53 (Figura 21D) e 0,74 (Figura 21E) irradiadas com dose de 50 kGy apresentaram pequeno aumento da densidade corada na região do gel (marcada como r, acima das 2 bandas correspondentes a  $\beta$ -LG (variantes A e B), indicando a presença de produtos de carga e massa diferentes da nativa.



**Figura 21.** Eletroforese em gel, PAGE, da  $\beta$ -LG irradiada na forma de pó. (A) e (D):  $\beta$ -LG  $a_w$  0,22. (B) e (E):  $\beta$ -LG  $a_w$  0,53. (C) e (F):  $\beta$ -LG  $a_w$  0,74. Em (A), (B), (C), (D), (E) e (F) a linha 1 corresponde ao padrão de massa molar de proteínas da Pharmacia (14,4-94 kDa). Em (A), (B) e (C) as linhas 2, 3, 4, 5 e 6 correspondem às amostras de  $\beta$ -LG irradiadas com dose de: 10; 5; 2,5; 1 e 0 kGy respectivamente. Em (D), (E) e (F), a linha 2 corresponde à dose de radiação de 50 kGy e a linha 3 a 25 kGy.



**Figura 22.** Perfil eletroforético nativo PAGE das amostras de  $\beta$ -LG irradiadas em solução. (A):  $\beta$ -LG irradiada em solução 3mg/mL; (B):  $\beta$ -LG irradiada em solução 10mg/mL. Em (A) e (B) a linha 1 corresponde ao padrão de massa molar de proteínas da Pharmacia (14,4-94 kDa); a linha 2, 3, 4, 5 e 6 à  $\beta$ -LG irradiada com doses de: 10; 5; 2,5; 1 e 0 kGy.

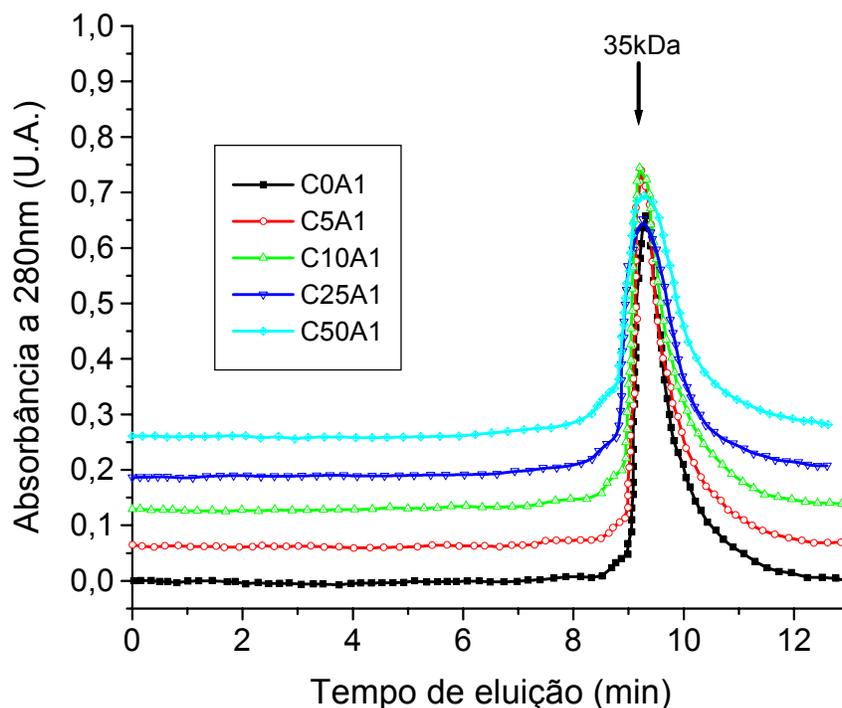
Nas amostras irradiadas em solução, o perfil eletroforético obtido em condições não desnaturantes (PAGE) (Figura 22A e B) mostrou diminuição das bandas correspondentes à  $\beta$ -LG (variantes A e B) e aumento da densidade corada nas regiões acima destas bandas com o aumento da dose de radiação. Isto sugere a formação de produtos com carga diferente da nativa e/ou com maior massa molar. O efeito é mais acentuado nas amostras de  $\beta$ -LG irradiada em concentração menor (3 mg/mL) (Figura 22A), melhor evidenciado na linha 2, onde se observa que a proteína concentra-se quase que integralmente na parte superior do gel de separação, e não em toda a faixa da linha 2 como na Figura 22B indicando que houve maior agregação da proteína na amostra mais diluída (3 mg/mL).

#### ➤ **Cromatografia de Exclusão Molecular**

Os perfis cromatográficos de SE-HPLC da amostra de  $\beta$ -LG irradiada com doses de 0, 5, 10, 25 e 50 kGy no estado sólido ( $a_w = 0,22$ ) e em solução nas concentrações 3 e 10 mg/mL, são mostradas nas Figuras 23, 24 e 25.

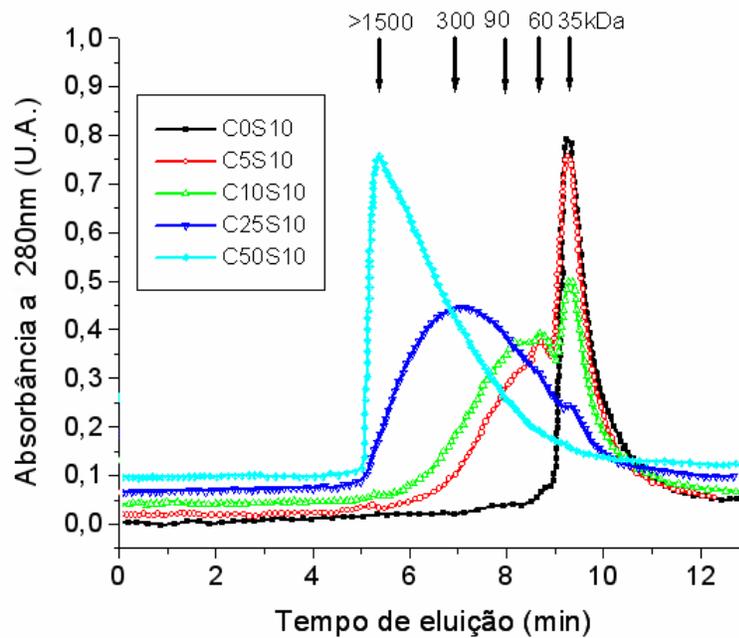
$\beta$ -LG irradiada sólida com doses de 5, 10, 25 e 50 kGy (C5A1, C10A1, C25A1 e C50A1) (Figura 23) exibe perfil cromatográfico similar ao obtido para a amostra não irradiada (C0A1) (Figura 23). Para todas as amostras a eluição se deu em ~9,3 minutos,

sob forma de um pico único, com um máximo que corresponde à massa molar média aparente (MM) de 35 kDa, calculada a partir de uma curva padrão de massa molar, previamente construída. Esta é uma indicação de que, sob estas condições, a  $\beta$ -LG existe como dímero e não foi modificada pela radiação gama em doses de até 50 kGy.



**Figura 23.** Perfil de SE-HPLC da  $\beta$ -LG ( $a_w=0,22$ ) irradiada sólida com doses de 0; 5; 10; 25 e 50 kGy.

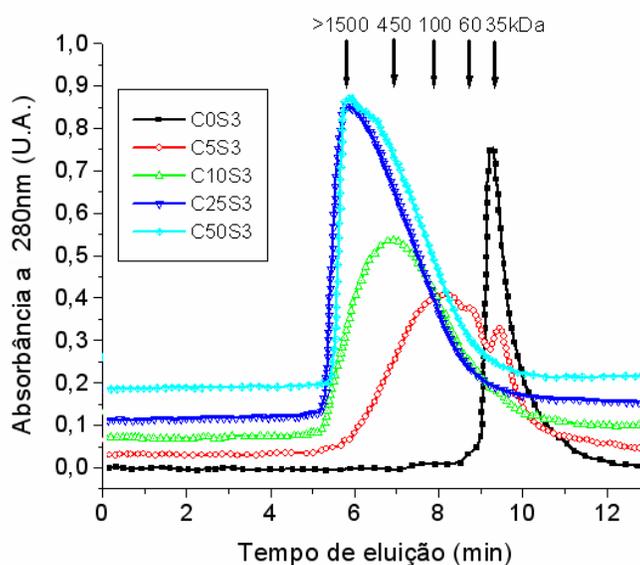
O perfil do SE-HPLC da  $\beta$ -LG irradiada em solução (10 mg/mL) (Figura 24) mostrou que o pico correspondente ao dímero, observado na amostra controle (C0S10), diminuiu quando a dose de irradiação aumentou e novos picos, correspondentes a produtos de maior massa molar que 35 kDa, eluíram em tempos menores, entre 4,5 a 9 minutos. À medida que se aumentou a dose de radiação, houve aumento da massa molar dos produtos para ~60kDa, MM ~90 kDa e MM~300 kDa, e outros de massa maior eluíram no volume morto.



**Figura 24.** Perfil SE-HPLC da  $\beta$ -LG (10mg/mL), amostra não irradiada (C0S10) e irradiadas com 5 kGy (C5S10), 10 kGy (C10S10), 25 kGy (C25S10) e 50 kGy (C50S10).

Os perfis das amostras irradiadas em concentração menor da proteína (3 mg/mL) (Figura 25) mostraram que houve formação de agregados por efeito da radiação, como foi no caso da amostra irradiada na concentração de 10 mg/mL (Figura 24). Em geral, para uma mesma dose de radiação, os produtos resultantes da irradiação da amostra de concentração 3 mg/mL são de maior massa molar que os formados a partir da amostra de concentração 10 mg/mL. A exceção seria a amostra C50S3, cujo perfil mostra que, contrário ao observado na amostra C50S10, mostra produtos de massa menor que a amostra C25S3.

Em nenhum caso, nas amostras irradiadas sólidas ou em solução, houve indícios de ter ocorrido monomerização da  $\beta$ -LG, já que não foi observado nos cromatogramas, nenhum pico ou máximo no tempo de eluição em ~10 minutos.



**Figura 25.** Perfil SE-HPLC da  $\beta$ -LG (3mg/mL), amostra não irradiada (C0S3) e irradiadas com 5 kGy (C5S3), 10 kGy (C10S3), 25 kGy (C25S3) e 50 kGy (C50S3).

### ➤ SAXS

Os resultados mostrados a seguir foram agrupados por dose de radiação e pelo estado da amostra quando foi irradiada (sólida ou em solução). As amostras não irradiadas foram consideradas controle. As amostras irradiadas sólidas foram estudadas nas doses 0, 5, 10 25 e 50 kGy e as amostras irradiadas em solução, nas doses 0, 5 e 10 kGy.

A partir das medidas de SAXS, foram obtidos: a curva de intensidade de espalhamento SAXS; a função  $(pr)$ , obtida da transformada de Fourier da intensidade de espalhamento; o gráfico de Kratky e a curva da intensidade de espalhamento com base na estrutura cristalográfica, sendo apresentadas dentro de cada figura com as letras A, B, C e D, respectivamente.

#### *Amostras irradiadas na forma sólida*

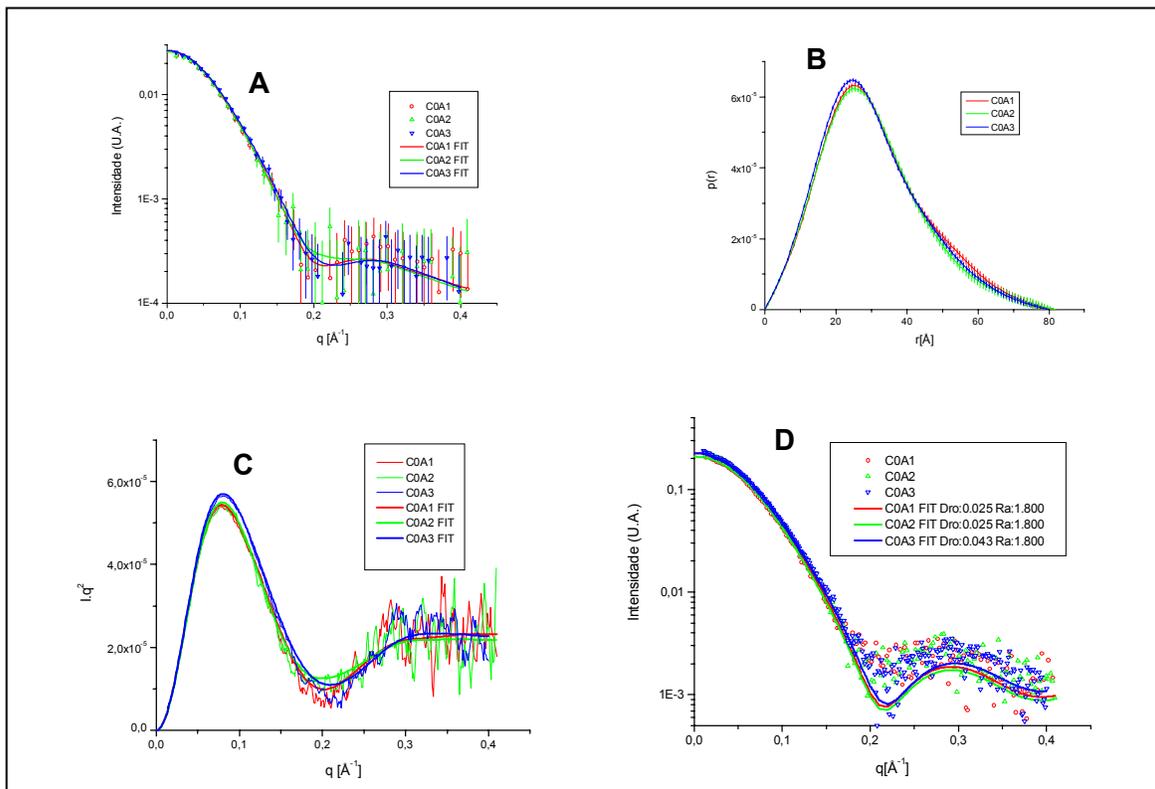
As intensidades de espalhamento e ajuste teórico realizado com o programa GNOM (SEMENYUK; SVERGUN, 1991) para a proteína não irradiada com  $a_w$  0,22; 0,53 e 0,74 são mostradas na Figura 26A. Para as três amostras, os dados foram muito similares, com boa relação sinal/ruído, apresentando modulação nas curvas de espalhamento típica de partículas globulares.

A transformada de Fourier da intensidade de espalhamento fornece a curva de distribuição de pares de distâncias  $p(r)$  (GUINIER; FOURNET, 1955), a qual provê indicações sobre a forma da partícula. Na Figura 26B estão apresentadas as curvas da função  $p(r)$  calculadas a partir do ajuste dos dados experimentais com o programa GNOM.

A forma das curvas de intensidade (Figura 26A) e da função de distribuição de distâncias  $p(r)$  (Figura 26B) indicam que as amostras não irradiadas, independente da atividade de água, apresentaram a mesma conformação. Pela forma da função  $p(r)$  (Figura 26B) verifica-se que a partícula possui uma conformação ligeiramente prolata (GUINIER; FOURNET, 1955; GLATTER; KRATKY, 1982).

Das medidas de SAXS obtiveram-se os valores para o raio de giro ( $R_g$ ) por ajuste teórico da intensidade, utilizando o programa GNOM (SEMENYUK; SVERGUN, 1991). Deste ajuste, verificou-se que as proteínas não irradiadas, C0A1, C0A2 e C0A3, possuem raios de giro com valores de  $24,0 \pm 0,3$ ;  $23,5 \pm 0,4$ ; e  $25,4 \pm 0,8$  Å, respectivamente. Os valores estão um pouco acima dos encontrados para a proteína dimérica nativa que pode ser calculada da estrutura cristalina (21,5 Å) (SVERGUN BARBERATO; KOCH, 1995), e dos valores encontrados em experimentos com  $\beta$ -LG nativa em solução (PANICK; MALESSA; WINTER, 1999; WITZ; TIMASHEFF; LUZZATI, 1964; GREEN et al., 1979). Valores similares aos obtidos em nosso estudo foram encontrados por Carrota et al. (2003) ( $25,4 \pm 0,4$  Å) e no estudo por espalhamento de nêutrons a baixo-ângulo (SANS), realizado por Verheul et al. (1999) ( $23,6 \pm 0,2$  Å).

Do ajuste teórico tem-se, também, a extrapolação dos dados para  $q=0$ . Com a intensidade na origem ( $I(0)$ ), é possível determinar a massa molar da proteína. Os valores da massa molar para as diferentes amostras não irradiadas junto com as máximas dimensões obtidas das curvas  $p(r)$  encontram-se na Tabela 9.



**Figura 26.** Caracterização por SAXS das amostras de  $\beta$ -LG não irradiadas (amostras controle) (A): curva de intensidade de espalhamento, (B): função de distribuição de distancias, (C): gráfico de Kratky e (D): curva teórica calculada a partir dos dados cristalográficos. As amostras de  $\beta$ -LG analisadas foram : C0A1; C0A2 e C0A3.

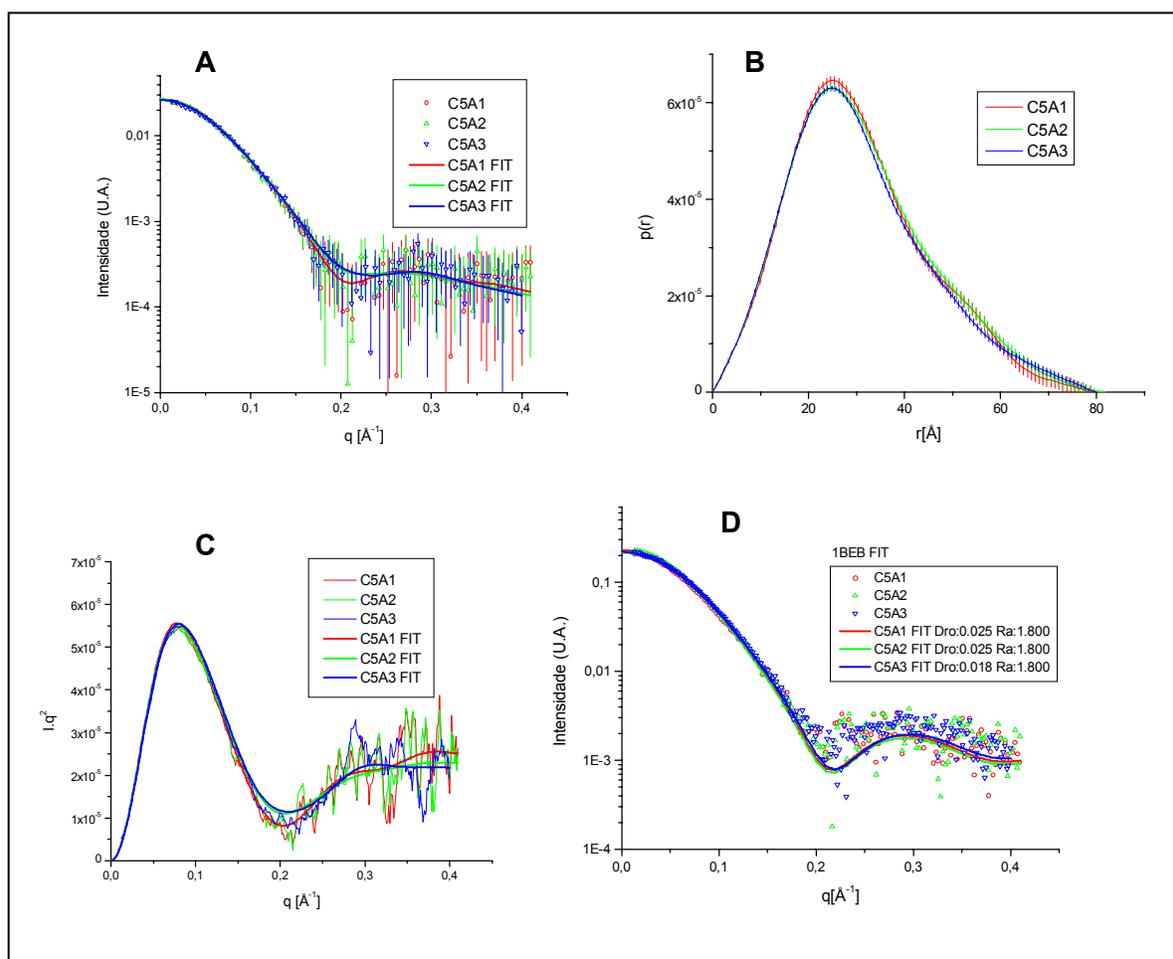
A informação, sobre o grau de compactação das proteínas pode ser obtido através da análise dos gráficos de Kratky ( $I \cdot q^2$  vs  $q$ ) (GLATTER; KRATKY, 1982). Na Figura 26C estão apresentados os gráficos de Kratky para as amostras não irradiadas. Observa-se que todas elas apresentam conformação globular compacta indicada pela forma de sino (GLATTER; KRATKY, 1982).

A conformação da proteína se mostrou idêntica à da proteína cristalizada, como é visto do ajuste na Figura 26D. Neste cálculo, utiliza-se a estrutura cristalográfica da proteína  $\beta$ -lactoglobulina (1BEB.PDB) a partir da qual o cálculo teórico da intensidade de espalhamento é feito e os dados experimentais são ajustados, tendo-se como parâmetros de ajuste a largura da camada de água no entorno da proteína e o contraste de densidade eletrônica desta camada de água. Observa-se que em todos os casos houve bom ajuste dos dados experimentais. A análise conjunta mostrou que as amostras sólidas estudadas

nas três diferentes  $a_w$ , antes de serem irradiadas (C0A1, C0A2 e C0A3) estavam monodispersas e com a proteína na mesma conformação.

As amostras que foram irradiadas na forma sólida com diferentes  $a_w$  e dose de 5 kGy não mostraram diferenças entre elas (Figura 27A) nem com as não irradiadas. A conformação geral da proteína foi a mesma, conforme indica a forma da função  $p(r)$  (Figura 27B). A irradiação também não alterou a compactação da proteína, indicada pela forma do gráfico de Kratky (Figura 27C). A manutenção da forma estrutural é confirmada pelo ótimo ajuste pela estrutura cristalográfica (Figura 27D).

Os raios de giro  $R_g$  para as amostras C5A1, C5A2 e C5A3 foram  $23,5 \pm 0,4$ ;  $24,0 \pm 0,3$  e  $23,8 \pm 0,3$  Å, respectivamente. Os valores com as máximas dimensões derivadas da curva  $p(r)$ , bem como as massas molares calculadas do ajuste teórico da intensidade para  $q=0$  encontram-se na Tabela 9.



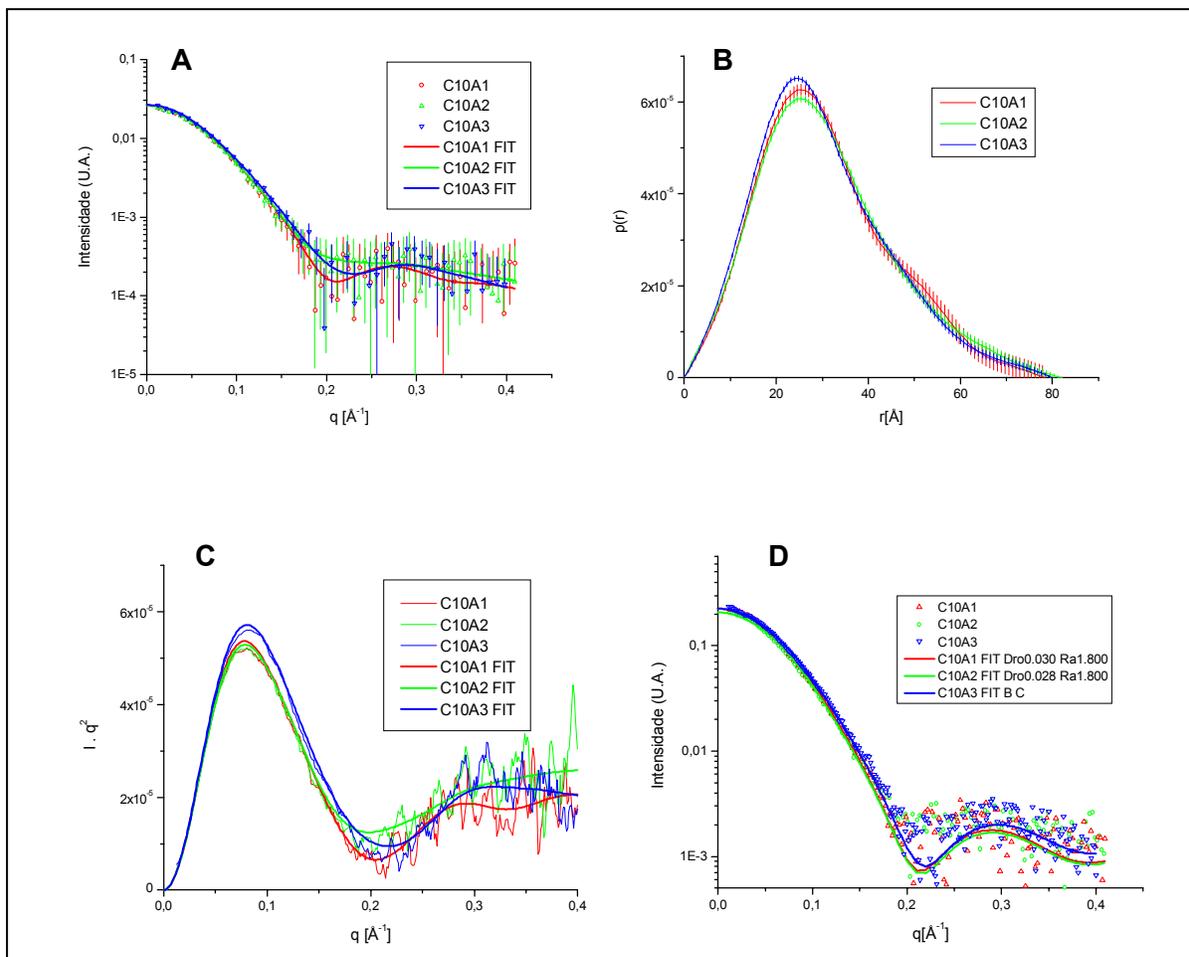
**Figura 27.** Descrição de gráficos A, B, C e D e de amostras de  $\beta$ -LG como em Figura 26, somente que as amostras foram submetidas a 5,0 kGy de dose de radiação gama.

**Tabela 9.** Parâmetros estruturais obtidos pelas medidas experimentais de espalhamento da  $\beta$ -LG submetida a diversas doses de radiação gama (0, 5, 10, 25 e 50 kGy), na forma sólida com diferentes  $a_w$  (A1:0,22; A2:0,53, e A3:0,74).

<i>Amostra</i>	<i>Dose (kGy)</i>	<i>R<sub>g</sub> (Å)</i>	<i>MM (kDa)</i>	<i>D<sub>max</sub> (Å)</i>	<i>Oligômeros</i>
C0A1	0	24,0±0.3	36±2	82	Dímero
C0A2	0	23,5±0.4	33±2	82	Dímero
C0A3	0	25,4±0.8	34±2	82	Dímero
C5A1	5	23,5±0.4	36±2	82	Dímero
C5A2	5	24,0±0.3	35±2	82	Dímero
C5A3	5	23,8±0,3	35±2	82	Dímero
C10A1	10	23,8±0,5	36±2	82	Dímero
C10A2	10	24,2±0,4	33±2	82	Dímero
C10A3	10	23,5±0,2	35±4	82	Dímero
C25A1	25	23,4±0,2	33±3	82	Dímero
C25A2	25	23,7±0,2	34±2	82	Dímero
C25A3	25	23,7±0,2	34±2	82	Dímero
C50A1	50	23,7±0,2	34±3	82	Dímero
C50A2	50	23,9±0,2	33±3	82	Dímero
C50A3	50	24,2±0,3	34±3	82	Dímero

As curvas de espalhamento para a proteína irradiada com 10 kGy mostradas na Figura 28A são semelhantes às apresentadas pelas amostras não irradiadas (Figura 26A), não apresentando diferenças entre as amostras com diferentes  $a_w$ .

As amostras irradiadas com 10 kGy no estado sólido não apresentaram mudanças conformacionais decorrentes da dose de radiação, como também foi observado para as amostras irradiadas com dose de 5 kGy. A forma da função  $p(r)$  é bastante parecida em todos os casos (Figura 28B), assim como o grau de compacidade é o mesmo, indicado pelo gráfico de Kratky (Figura 28C). O ótimo ajuste dos dados usando a estrutura cristalográfica (Figura 28D) indica que a proteína manteve a forma nativa. Os valores das dimensões máximas continuaram a ser de 82 Å para todas elas. O  $R_g$  deu os valores de 23,8±0,5; 24,2±0,4 e 23,5±0,2 Å para as amostras C10A1, C10A2 e C10A3, respectivamente.

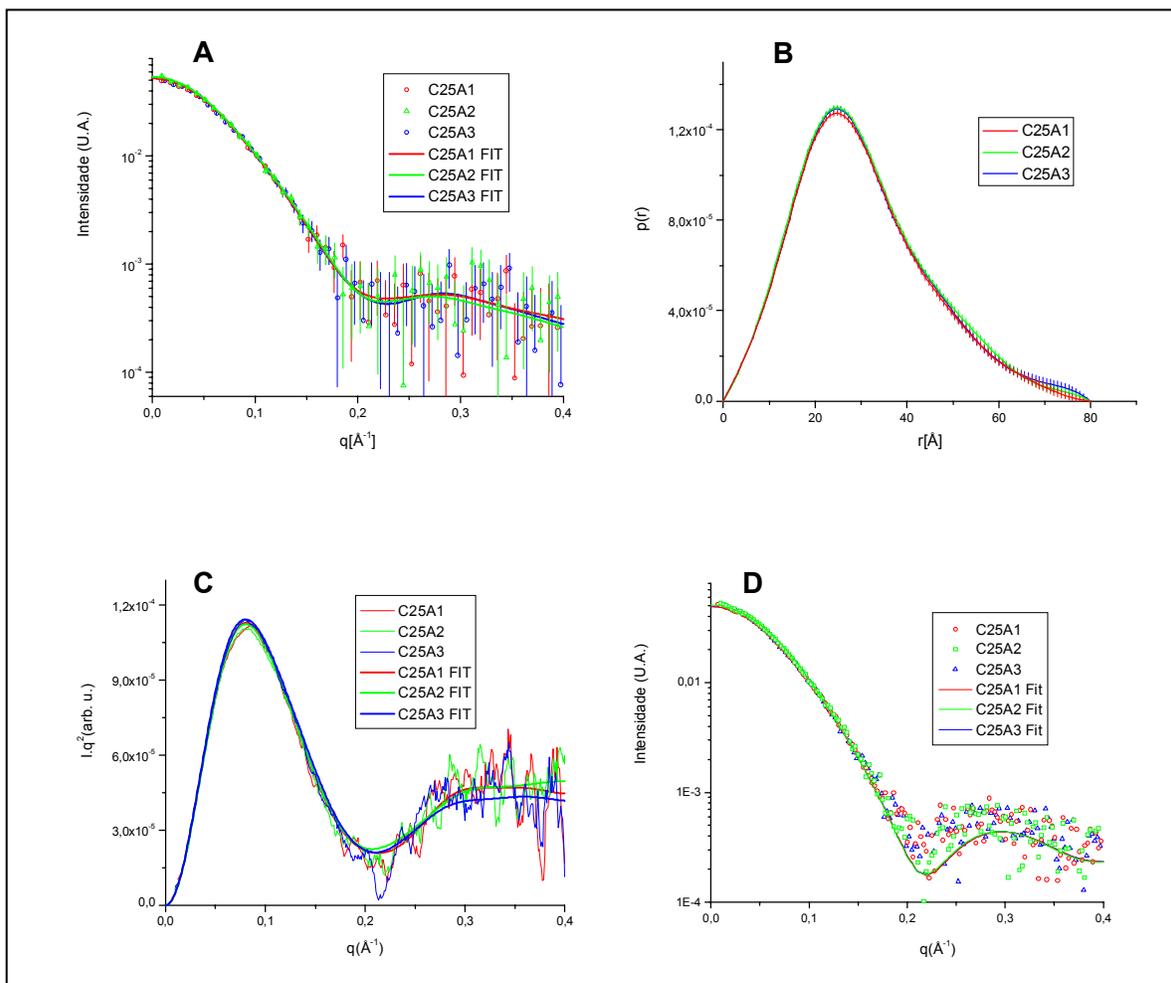


**Figura 28.** Descrição de gráficos A, B, C e D e de amostras de  $\beta$ -LG como na Figura 26, somente que as amostras foram submetidas a 10,0 kGy de dose de radiação.

Na Figura 29A a 29D observa-se que mesmo com a dose de radiação de 25 kGy a proteína manteve sua conformação nativa. Para a amostra com  $a_w$  0,74, observou-se aumento na região final da função  $p(r)$  (Figura 29B), o que pode indicar a presença de uma pequena fração de agregados. No entanto, o ótimo ajuste com a estrutura cristalográfica (Figura 29D) indica que não ocorreram mudanças conformacionais na proteína.

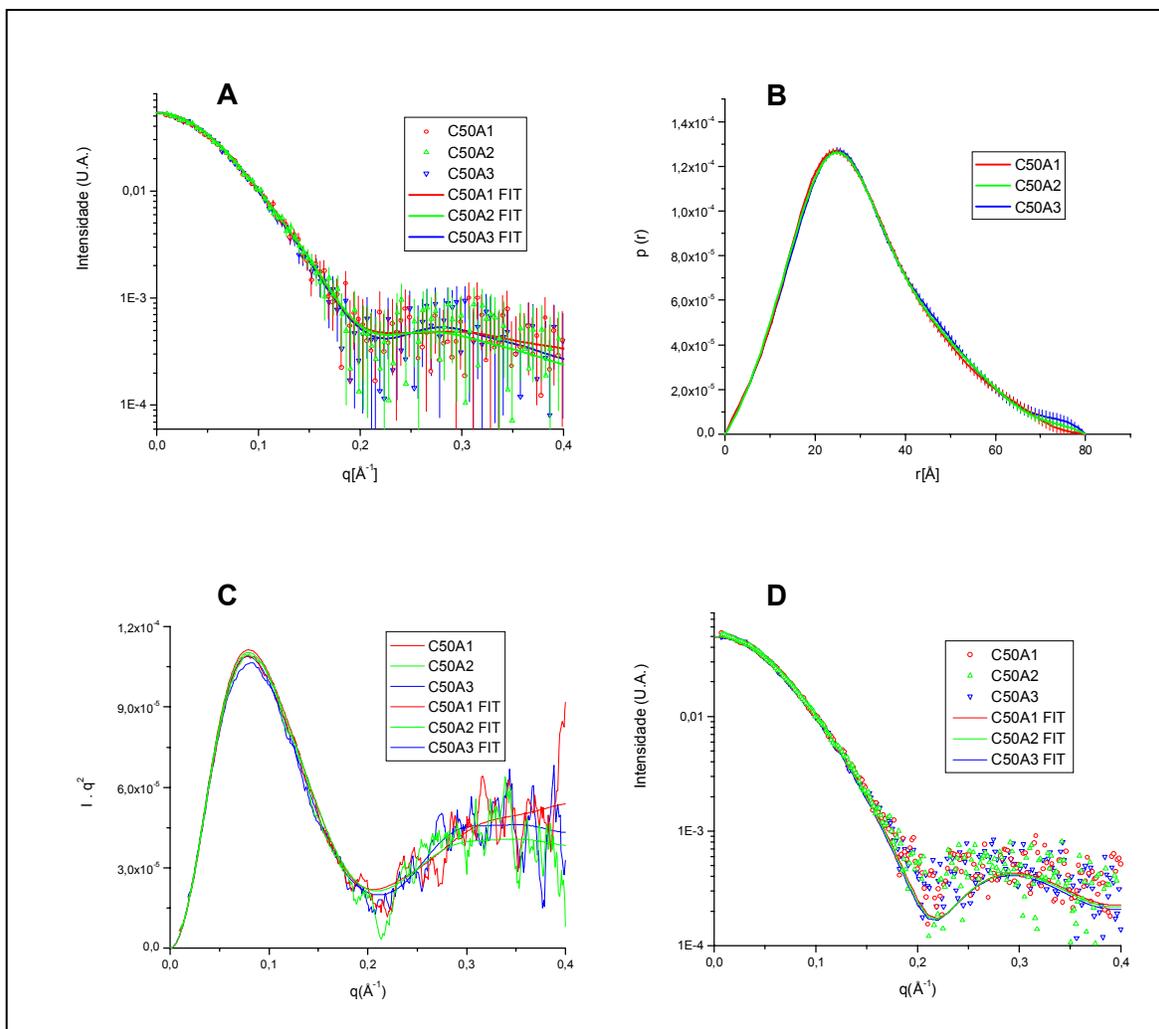
Os raios de giro  $R_g$  para as amostras C25A1, C25A2 e C25A3 foram  $23,4 \pm 0,2$ ;  $23,7 \pm 0,2$  e  $23,7 \pm 0,2$   $\text{\AA}$ , respectivamente. Os valores com as máximas dimensões

derivadas da curva  $p(r)$ , bem como, as massas molares calculadas do ajuste teórico da intensidade para  $q=0$  se encontram na Tabela 9.



**Figura 29.** Descrição de gráficos A, B, C e D e de amostras de  $\beta$ -LG como em Figura 26, somente que as amostras foram submetidas a 25,0 kGy.

Similarmente ao obtido para as amostras irradiadas com 25 kGy, observa-se que a dose de radiação de 50 kGy favoreceu o aparecimento de agregados no sistema, indicados pelo aumento da  $p(r)$  a valores máximos de  $r$ , para a  $\beta$ -LG com  $a_w$  0,74 (Figura 30B). Isto é uma indicação de que o nível de hidratação da amostra exposta à radiação pode influenciar na formação de agregados. Verifica-se que em todos os casos houve bons ajustes com os dados experimentais.



**Figura 30.** Descrição de gráficos A, B, C e D e de amostras de  $\beta$ -LG como em Figura. 26. As amostras foram submetidas a 50,0 kGy de radiação gama.

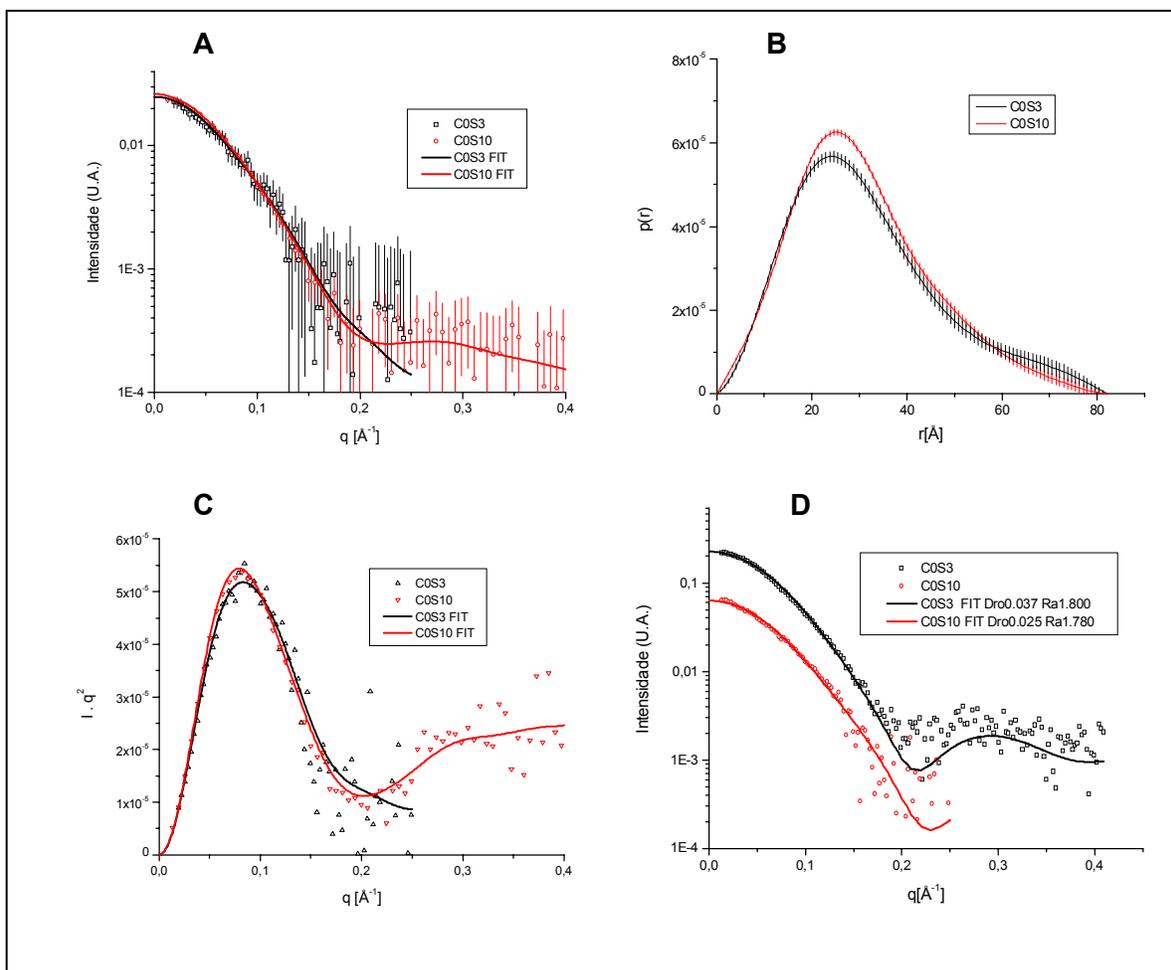
Os raios de giro  $R_g$  para as amostras C50A1, C50A2 e C50A3, foram  $23,7 \pm 0,2$ ;  $23,9 \pm 0,2$  e  $24,2 \pm 0,3$  Å, respectivamente. Os valores com as dimensões máximas derivadas da curva  $p(r)$ , bem como as massas molares calculadas do ajuste teórico da intensidade para  $q=0$  se encontram na Tabela 9. Estes resultados, em conjunto, indicam que as amostras irradiadas sólidas com dose de 50 kGy estavam monodispersas e com a proteína na mesma conformação.

Pelos resultados de SAXS, as amostras irradiadas na forma sólida não tiveram mudança estrutural quando comparadas à amostra não irradiada. Nas condições de pH estudadas (pH 7,0), esta estrutura mostrou ser como a nativa, na faixa de dose de radiação 0-50 kGy.

### Amostras irradiadas em solução.

Amostras de  $\beta$ -LG foram irradiadas em solução em duas concentrações, 3mg/mL e 10 mg/mL. Nestas mesmas concentrações, foram analisadas por SAXS.

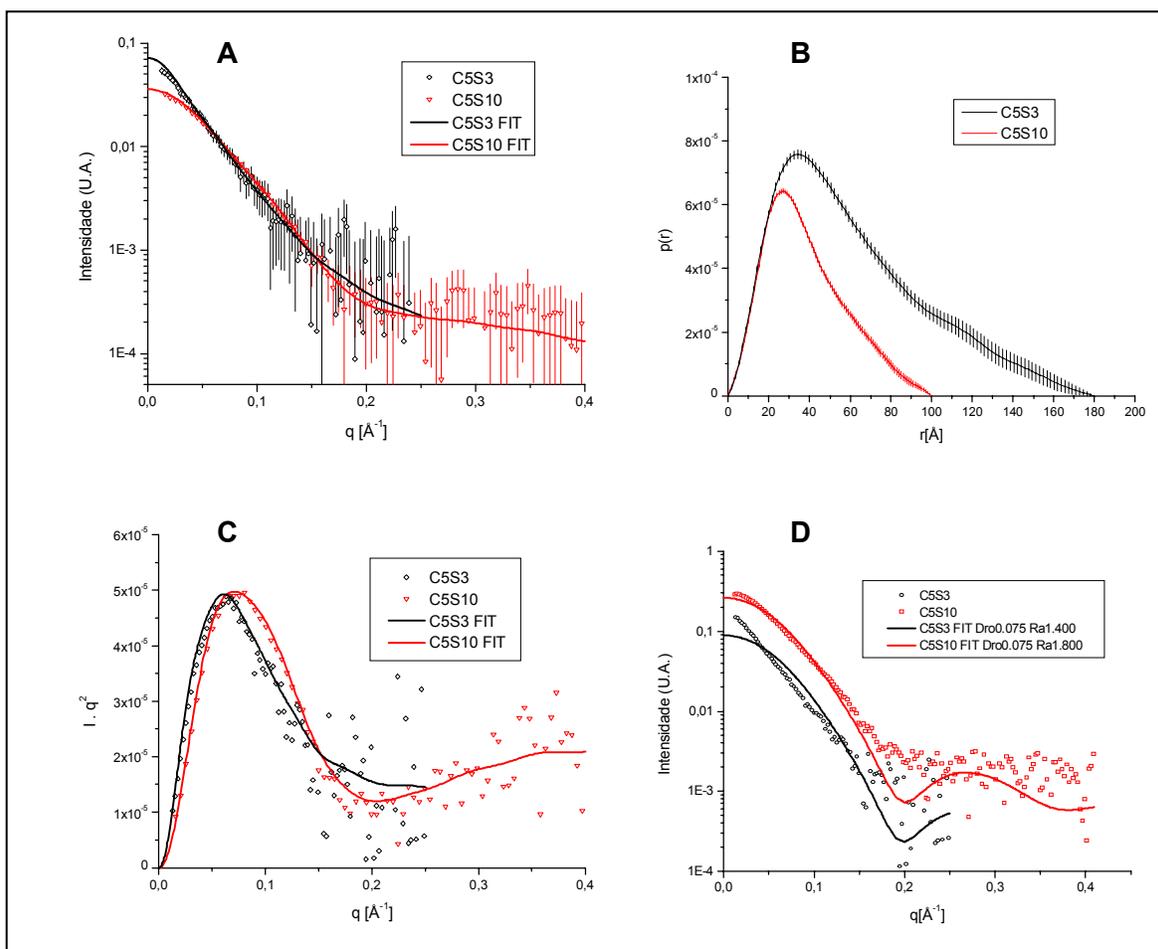
Embora as amostras não irradiadas tenham sido analisadas em diferentes concentrações, ambas apresentaram curvas semelhantes, com bom ajuste com a estrutura cristalográfica (Figura 31D), indicando que não há diferenças estruturais entre elas e a proteína nativa.



**Figura 31.** **A:** curva de intensidade de espalhamento, **B:** função de distribuição de distancias, **C:** gráfico de Kratky e **D:** curva teórica calculada a partir dos dados cristalográficos. Amostras de  $\beta$ -LG em solução de tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7,0) em concentração de proteína de 3 mg/mL e 10 mg/mL, não irradiadas.

Os raios de giro  $R_g$  das amostras C0S3 e C0S10 (não irradiadas) foram  $24,8 \pm 0,7$  e  $24,0 \pm 0,4$  Å, respectivamente. Os valores das dimensões máximas derivadas da curva  $p(r)$  e as massas molares calculadas do ajuste teórico da intensidade para  $q=0$  encontram-se na Tabela 10.

Diferentemente das amostras irradiadas na forma sólida, as amostras que foram irradiadas em solução com dose de 5 kGy apresentaram variações de tamanho. Isto é observado pelo aumento do valor da máxima dimensão ( $D_{max}$ ) na curva  $p(r)$  (Figura 32B) e também pela mudança de sua forma. Do gráfico de Kratky (Figura 32C), observa-se que os agregados formados também possuem conformação compacta, como indicado pela forma da curva. Também no ajuste com a estrutura cristalográfica (Figura 32D), observa-se que a intensidade espalhada pelas amostras irradiadas em solução não é bem ajustada pela curva de espalhamento calculada a partir dos dados da estrutura cristalográfica da proteína.

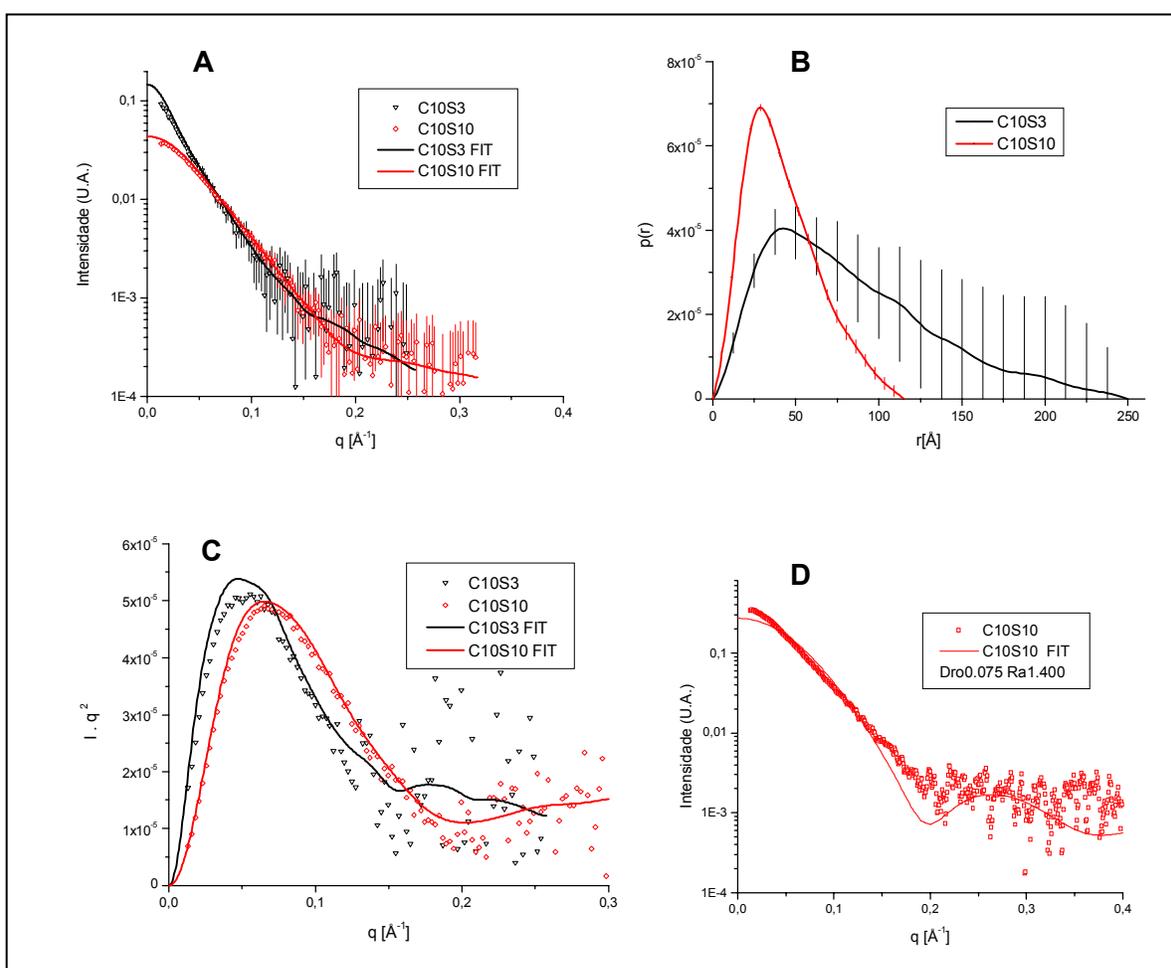


**Figura 32.** Descrição de gráficos **A**, **B**, **C** e **D** como em Figura 31. Amostras de  $\beta$ -LG irradiadas em solução em tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7,0) em concentração de 3mg/mL e 10 mg/mL, irradiadas com dose de 5 kGy.

O raio de giro  $R_g$  das amostras C5S3 e C5S10, (irradiadas com 5 kGy), foi  $50 \pm 0,2$  e  $30,3 \pm 0,4$   $\text{\AA}$ , respectivamente. Os valores das dimensões máximas derivadas da curva

$p(r)$  e das massas molares calculadas do ajuste teórico da intensidade para  $q=0$  se encontram na Tabela 10

Semelhante aos resultados obtidos para a proteína irradiada com 5 kGy apresentados na Figura 32, as amostras irradiadas em solução com 10 kGy apresentaram formação de agregados indicados pelo aumento do valor da máxima dimensão ( $D_{max}$ ) da função  $p(r)$  (Figura 33B). A curva de espalhamento calculada a partir dos dados da estrutura cristalográfica da proteína também não consegue descrever corretamente a intensidade espalhada, mesmo para a amostra C10S10 onde houve leve agregação (Figura 33D).



**Figura 33.** Descrição de gráficos **A**, **B**, **C** e **D** como em Figura 31. Amostras de  $\beta$ -LG em solução em tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7,0) em concentração de 3 mg/mL e 10 mg/mL, irradiadas com dose de 10 kGy.

O raio de giro  $R_g$  para as amostras C10S3 e C10S10, (irradiadas com 10 kGy), foi  $69 \pm 5$  e  $33,8 \pm 0,6$   $\text{\AA}$ , respectivamente. Os valores das dimensões máximas derivadas da

curva  $p(r)$  e das massas molares calculadas do ajuste teórico da intensidade para  $q=0$  se encontram na Tabela 10.

**Tabela 10.** Parâmetros estruturais obtidos pelas medidas experimentais de espalhamento da  $\beta$ -LG em solução (3 e 10 mg/mL) submetida a diversas doses de irradiação gama (0, 5 e 10 kGy).

<i>Amostra</i>	<i>Dose (kGy)</i>	<i>R<sub>g</sub> (Å)</i>	<i>MM (kDa)</i>	<i>D<sub>máx</sub> (Å)</i>	<i>Oligômero</i>
C0S3	0	24,8±0.7	33±5	82	Dímero
C0S10	0	24,0±0.4	35±5	82	Dímero
C5S3	5	50±2	~100	180	Hexâmero
C5S10	5	30,3±0.4	~50	100	Tetrâmero?
C10S3	10	69±5	~350	250	Agregados??
C10S10	10	33,8±0.6	~60	115	Tetrâmero

As amostras de proteína irradiadas em solução apresentaram alteração dos parâmetros estruturais medidos por SAXS que sugerem mudança estrutural. Houve aumento do raio de giro da molécula e aumento do  $D_{máx}$ , que poderia estar indicando a formação de agregados. Os valores experimentais de intensidade de espalhamento não se ajustaram à curva de intensidade calculada teoricamente a partir dos dados cristalográficos indicam estrutura diferente da nativa.

Devido à  $\beta$ -LG ter a estrutura nativa bem definida por análise cristalográfica é possível estimar, aproximadamente, a forma das moléculas de proteína aqui analisadas, agregadas ou não, através de modelagem.

Utilizando as amostras puras como padrão, calculou-se a massa molar equivalente para as outras amostras. A  $\beta$ -lactoglobulina em condições nativas é um dímero de massa molar 35340 Da (BROWNLOW et al., 1997). Sendo assim, a massa molar equivalente obtida dos experimentos de SAXS fornecerá indicação do tamanho dos agregados formados. Do ajuste dos dados de SAXS obtiveram-se os parâmetros estruturais em cada caso.

Pelos dados mostrados na Tabela 9, observa-se que as amostras irradiadas no estado sólido, independente da atividade de água, não sofreram alteração da conformação, como evidenciado pelos valores de  $R_g$ , MM e  $D_{máx}$ , mantendo a conformação de dímero.

Diferentemente das amostras irradiadas sólidas, as amostras irradiadas em solução (Tabela 10) apresentaram alterações estruturais evidenciadas pelos valores de  $R_g$ ,  $MM$  e  $D_{máx}$ , indicando formação de oligômeros.

Da Tabela 10 tem-se a indicação da formação de vários tipos de agregados. Pela massa molar equivalente deduz-se que se pode tratar de tetrâmeros, hexâmeros ou agregados maiores.

Para obter mais informações sobre a oligomerização da proteína, fez-se a construção de modelos estruturais a partir dos dados experimentais utilizando como subunidade base a estrutura cristalográfica do dímero da  $\beta$ -LG (registro em PDB 1BEB.PDB). Ainda que a estrutura terciária da  $\beta$ -LG tenha sofrido alterações com a irradiação, a utilização da estrutura cristalográfica para a construção do oligômero pode ser vista como uma aproximação para modelar estes oligômeros.

Vários modelos foram construídos e combinações lineares foram testadas para determinar uma possível polidispersidade de tamanhos.

Para estimar a fração numérica de dímeros ( $x$ ) na mistura, faz-se um cálculo assumindo a presença de tetrâmeros e dímeros no sistema. A massa molar média (que é dada pelo SAXS) será uma composição linear de cada parcela:

$$(MM_{m\u00e9dia})^2 = x \cdot (MM_{d\u00edmero})^2 + (1-x) \cdot (MM_{tetr\u00e1mero})^2 \quad (10)$$

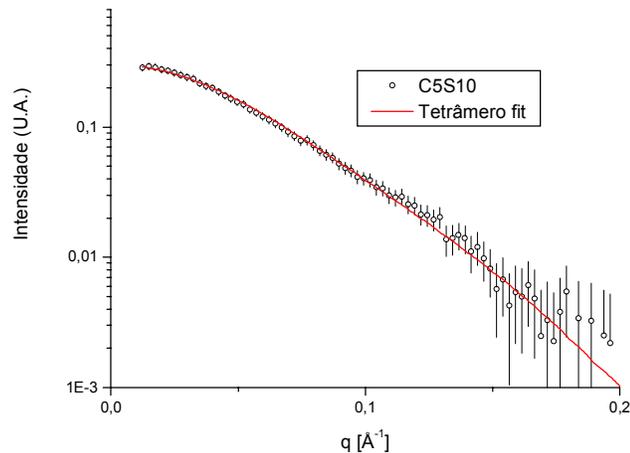
E assim a fração de dímeros e tetrâmeros será:

$$D\u00edmeros : x = \frac{(MM_{tetr\u00e1mero})^2 - (MM_{m\u00e9dia})^2}{(MM_{tetr\u00e1mero})^2 - (MM_{d\u00edmero})^2} \quad (11)$$

$$Tetr\u00e1meros : (1-x) \quad (12)$$

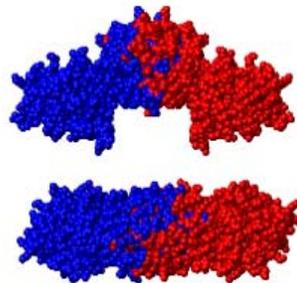
#### *Amostra $\beta$ LG em solução (10mg/mL) irradiada com dose de 5 kGy (C5S10)*

Para descrever o comportamento da intensidade espalhada através de oligômeros da proteína fez-se modelagem utilizando o programa MASSHA (KONAREV; PETOUKHOV; SVERGUN, 2001). Pelos parâmetros estruturais apresentados na Tabela 10 para a amostra C5S10, há indicação da presença de tetrâmeros no sistema. Realizando o ajuste para obter o tetrâmero que melhor ajusta os dados experimentais, tem-se como resultado, o mostrado na Figura 34.



**Figura 34.** Ensaio de modelagem da amostra  $\beta$ -LG (10 mg/mL) irradiada com dose de 5 kGy.

Neste caso, o modelo tetramérico consegue descrever quase corretamente os dados experimentais confirmando a presença destes na solução. Fazendo a estimativa aproximada da população de dímeros e tetrâmeros na mistura, obteve-se que 28 % devem ser tetrâmeros e ~72 % dímeros. Do ajuste tem-se o modelo mostrado na Figura 35.

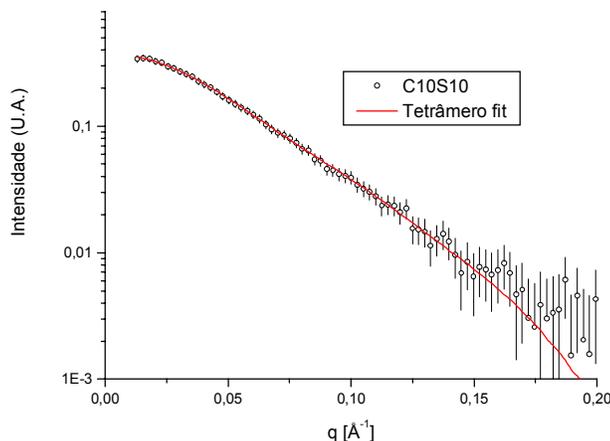


**Figura 35.** Modelo de oligômero para a amostra C5S10.

A contribuição dos dímeros é maior do que a dos tetrâmeros e, como este modelo simplificado apenas leva em conta os tetrâmeros da mistura, há forte influência da parcela dimérica gerando distorções no modelo tetramérico. No entanto, o importante aqui é que se pode constatar a presença de tetrâmeros na mistura. O raio de giro do modelo e sua máxima dimensão é 29 Å e 113 Å, respectivamente, que estão próximos dos valores obtidos experimentalmente ( $30,3 \pm 0,4$  Å e 100 Å), mas esta diferença dos valores deve-se à influência dos dímeros na solução.

*Amostra de  $\beta$ -LG em solução (10 mg/mL) irradiada com dose de 10 kGy*

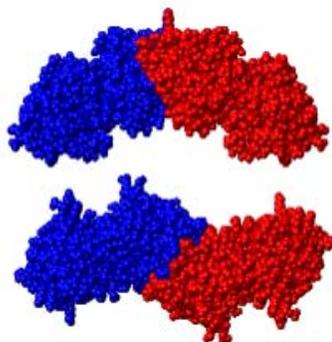
Apesar de os dados de SAXS e parâmetros estruturais determinados indicarem a presença de agregados na proteína irradiada em solução com 10 kGy, parece não ter ocorrido agregação desordenada. É possível que pequenos agregados tenham sido formados, mas, possivelmente, ainda existam proteínas no estado monodisperso. Pela massa molar média e dimensão máxima, supõe-se que os oligômeros sejam tetrâmeros.



**Figura 36.** Ensaio de modelagem da amostra C10S10.

O ajuste dos dados experimentais foi muito satisfatório para o modelo tetramérico, indicação de presença significativa de tetrâmeros no sistema.

Testando a polidispersidade, utilizaram-se as equações (10), (11), e (12). Para a amostra C10S10 os resultados indicaram que ~58 % das partículas componentes da mistura eram tetrâmeros e ~42 % ainda continuavam sendo dímeros. O tetrâmero que melhor ajustou aos dados experimentais é mostrado na Figura 37.

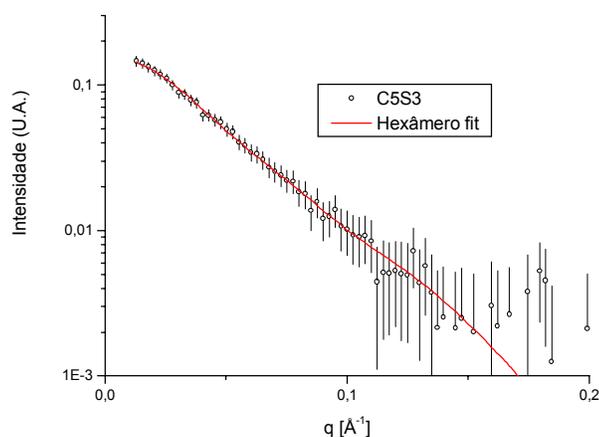


**Figura 37.** Modelo de oligômero para a amostra C10S10.

A conformação deste tetrâmero foi ligeiramente diferente da apresentada pela amostra irradiada com 5 kGy (Figura 34). Neste caso, a contribuição dos tetrâmeros é maior do que a dos dímeros, inverso ao que aconteceu com a amostra C5S10. Vale ressaltar que este é um cálculo aproximado. A intensidade de espalhamento possui componentes diméricos e tetraméricos e o programa ajustou os dados assumindo apenas tetrâmeros. No entanto, como a fração de tetrâmeros é maior do que a de dímeros, propõe-se que esta conformação deva estar bastante próxima da real, uma vez que a contribuição para a intensidade dos dímeros acabará sendo menor. O raio de giro do modelo e sua máxima dimensão são 33,17 Å e 119,3 Å, respectivamente, que estão em ótima concordância com os valores obtidos experimentalmente (33,8±0,6 Å e 115 Å).

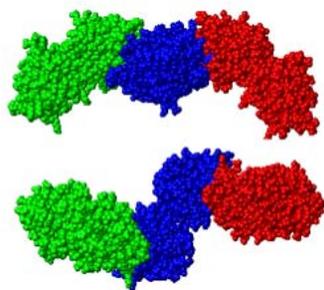
*Amostra de  $\beta$ -LG em solução (3 mg/mL) irradiada com dose de 5 kGy (C5S3)*

Pela massa molar obtida e também pela dimensão máxima, os agregados formados podem ser hexâmeros. Das várias formas de se construir um hexâmero de proteínas 1BEB, apenas o arranjo seqüencial (em linha) consegue fornecer um Dmax de ~180Å. O hexâmero foi a conformação escolhida e o ajuste é mostrado na Figura 38.



**Figura 38.** Ensaio de modelagem da amostra  $\beta$ -LG (3mg/mL) irradiada com dose de 5 kGy.

Dos cálculos com a massa molar obtida a partir dos dados de SAXS e com os valores esperados obteve-se uma população composta de 80% de hexâmeros e 20% de dímeros, não se descartando a possibilidade de haver tetrâmeros no sistema. No entanto, testes com apenas tetrâmeros e oligômeros maiores não fornecem resultados tão bons quanto para o caso de hexâmeros. O hexâmero mais provável de estar sendo formado é mostrado na Figura 39.



**Figura 39.** Modelo de oligômero para a amostra  $\beta$ -LG (3mg/mL) irradiada com 5 kGy.

O raio de giro do modelo e sua máxima dimensão são 43 Å e 150 Å, respectivamente, que estão próximos dos valores obtidos experimentalmente ( $50 \pm 2$  Å e 180 Å). Como o obtido pelos dados de SAXS ainda é ligeiramente maior, pode-se especular a presença de agregados maiores ainda na mistura mas, pelo ajuste, a maioria deve ser de hexâmeros e dímeros.

#### *Amostra $\beta$ -LG em solução (3 mg/mL) irradiada com dose de 10 kGy*

Nesta amostra houve formação de agregados grandes e polidispersos de modo que não foi possível obter maiores informações. Dos dados de SAXS, tem-se apenas uma informação geral do tamanho destes agregados, máxima dimensão de  $\sim 250$  Å e massa molar média de 350 kDa.

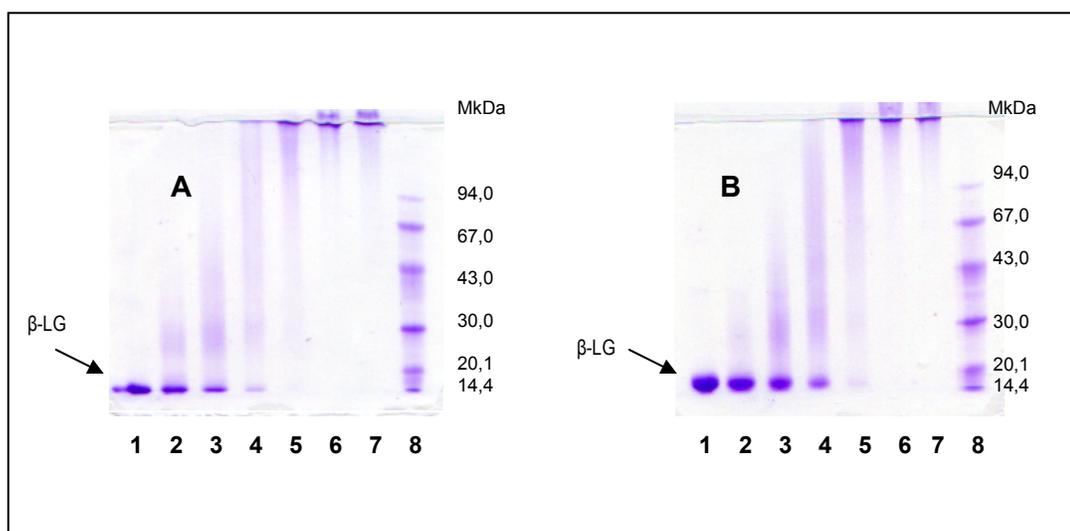
Nas amostras irradiadas em solução, observa-se em geral que há uma tendência à agregação com o aumento da dose de radiação e a diminuição da concentração de proteína.

#### **5.2.3. Mecanismo de agregação**

Nas análises apresentadas no item 5.2.2., comprovou-se que houve agregação da proteína devido à irradiação, principalmente nas amostras irradiadas em solução. Para tentar elucidar o provável mecanismo envolvido na agregação, foram realizadas análises de eletroforese em gel SDS-PAGE em condições redutoras e não redutoras e detecção de ligações cruzadas bitirosil.

➤ **Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)**

Na Figura 40 observa-se que as amostras irradiadas em solução (3 mg/mL) apresentaram perfis semelhantes tanto em condições não redutoras (Figura 40A) como redutoras (Figura 40B). Em ambas as condições verificou-se a presença de produtos de maior massa molar que a  $\beta$ -LG monômero devido à irradiação, evidenciado pelas regiões coradas localizadas acima da banda monomérica. Para as amostras que receberam doses de radiação maiores, 10, 25 e 50 kGy (linhas 5, 6 e 7) e em ambas as condições de eletroforese, observou-se alguns produtos de maior massa que não conseguiram entrar no gel de separação. No gel em condições redutoras (Figura 40B), observa-se leve aumento na intensidade e área na banda monomérica da  $\beta$ -LG em amostras irradiadas até 5 kGy (linha 4) concomitante à diminuição nas respectivas linhas de produtos de maior massa, possivelmente produto da redução de algumas pontes dissulfeto entre moléculas de  $\beta$ -LG agregadas. No entanto, o meio redutor não resultou na desagregação da maior parte dos produtos de maior massa molar que ainda apresentam menor mobilidade que o monômero da  $\beta$ -LG na região central do gel, ou que ficam retidos no gel de empilhamento (Figura 40B, linhas 5, 6 e 7).



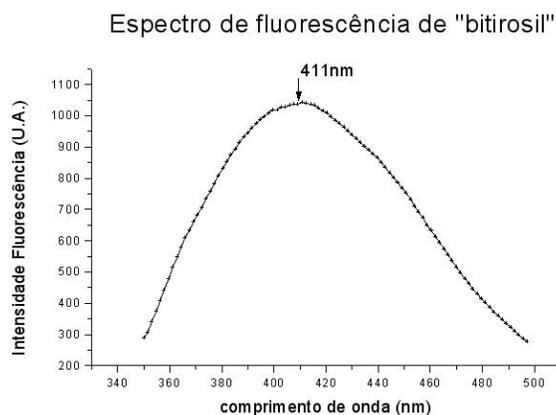
**Figura 40.** Caracterização da  $\beta$ -LG irradiada em solução (3 mg/mL) usando SDS-PAGE: (A), sem redutor e (B), com  $\beta$ -mercaptoetanol. Linhas 1, 2, 3, 4, 5, 6, e 7, doses de radiação de 0; 1; 2,5; 5, 10, 25 e 50 kGy. Linha 8, padrão de massa molar de proteínas (14,4-94,0 kDa).

Estes resultados indicam que a irradiação teve um efeito importante sobre a proteína em solução, dando origem à formação de agregados de massa molar variada. As ligações dissulfeto intermoleculares parecem não ser relevantes para a formação destes agregados, ao contrário do que tem sido relatado para tratamento térmico (SHIMADA; CHEFTEL, 1989; IAMETTI et al., 1996; HOFFMANN; MIL, 1997)

#### ➤ **Fluorescência de ligações cruzadas bitirosil**

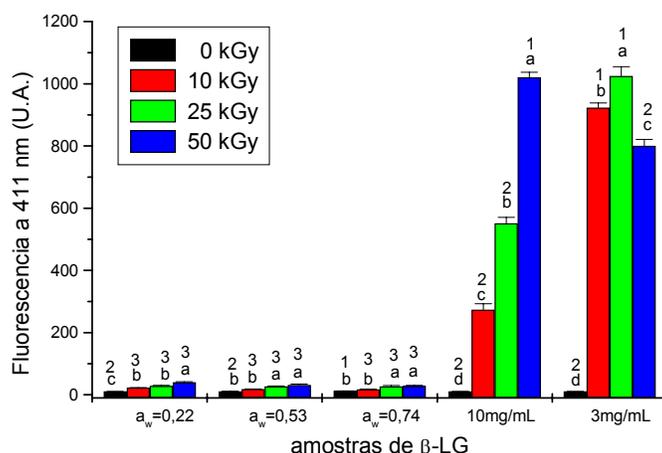
As análises de fluorescência foram realizadas para avaliar a possível participação de ligações entre radicais tirosil no processo de agregação da proteína devido à irradiação. Segundo Davies, Delsignore e Lin (1987), a fluorescência máxima das bitirosinas se dá entre 410 e 420 nm em amostras submetidas a  $\lambda_{exc} = 325$  nm.

Após realizar um teste de varredura na amostra C25S3, foi verificado que o espectro apresentava máximo em 411 nm (Figura 41). Este valor foi utilizado para avaliar o teor de bitirosinas nas amostras.



**Figura 41.** Espectro de fluorescência de "bitirosil" da amostra de  $\beta$ -LG irradiada em solução (C25S3).

Os valores da intensidade de fluorescência a 411 nm são mostrados na Figura 42. Aumento significativo da intensidade de fluorescência a 411 nm, característica de ligações de bitirosinas, foi observado nas amostras irradiadas em solução em relação à amostra não irradiada.



**Figura 42.** Intensidade de fluorescência de bitirosil (ligações cruzadas) em amostras de  $\beta$ -LG não irradiadas e em amostras irradiadas sólidas e em solução em concentração de 10 e 3 mg/mL ( $\lambda_{exc}$  325nm,  $\lambda_{emis}$  411nm). Dentro de cada grupo de amostras (mesma  $a_w$  ou mesma concentração em mg/mL), colunas com letras iguais não diferem significativamente entre si ao nível de 5%. Nas colunas com igual cor (correspondentes a uma mesma dose de irradiação) valores com o mesmo número não diferem significativamente entre si ao nível de 5% (teste de Tukey).

Nas amostras irradiadas sólidas, a  $a_w$  não foi fator determinante na formação de ligações cruzadas de bitirosil. Não houve diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ) entre as amostras de  $\beta$ -LG com diferentes  $a_w$  para uma mesma dose de irradiação, a não ser na amostra não irradiada com  $a_w$  0,74, sugerindo um possível erro experimental. Amostras com uma mesma  $a_w$ , irradiadas com doses diferentes apresentaram diferença estatística com a não irradiada, mas não entre elas.

Nas amostras irradiadas em solução, numa mesma concentração de proteína, houve tendência de aumento da fluorescência com o aumento da dose de irradiação, mostrando diferenças significativas entre elas ( $p < 0,05$ ). A exceção foi a amostra C50S3, que apresentou menor intensidade de fluorescência que a amostra C25S3 o que pode sugerir que na irradiação com doses maiores que 25 kGy, o processo de agregação sofreu alguma alteração, refletida na diminuição das ligações de bitirosil. Isto é corroborado pelas análises de SE-HPLC cujos resultados mostram, para esta amostra, agregados de massa molar menor que na amostra C25S3.

A menor quantidade de ligações bitirosil na amostra C50S3 sugere que, enquanto era atingida a dose de 50 kGy, pode ter havido a formação de agregados maiores que depois sofreram uma clivagem por efeito da radiação. Uma outra hipótese seria, a

destruição de alguns resíduos de tirosina por efeito da alta dose de radiação (50 kGy) diminuindo, assim, a quantidade de radicais de tirosil disponíveis ou ainda que radicais tirosil tenham sofrido uma re-redução pela ação de  $O_2^-$  (espécie resultante da radiólise da água) desta maneira impedindo que ligações cruzadas de bitirosil ocorressem a 50 kGy (PRUTZ; BUTLER; LAND, 1983).

A fluorescência de amostras irradiadas em solução em diferentes concentrações, mas com mesma dose foram estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). As amostras com menor concentração de proteína (3 mg/mL) apresentaram valores maiores, com exceção novamente da amostra C50S3 que apresentou menor fluorescência de bitirosil que a sua correspondente C50S10, indicando que a concentração da proteína irradiada é fator importante para a quantidade de agregados formados, independente da dose de radiação.

A presença de ligações cruzadas de bitirosinas é um indício de que outras ligações cruzadas, mais difíceis de serem identificadas, possam também estar ocorrendo nas amostras submetidas às condições do estudo (SHINAR; NAVOK; CHEVION, 1983).

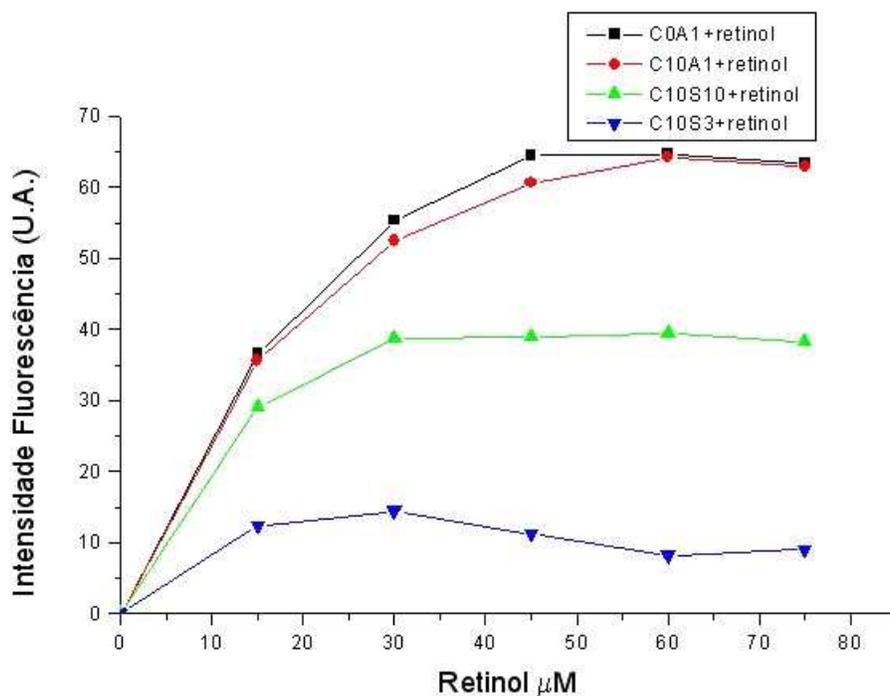
#### **5.2.4. Mudanças na funcionalidade (poder ligante de retinol e susceptibilidade às proteases)**

##### **➤ Poder ligante do retinol**

Assim como sua função biológica, as propriedades funcionais de uma proteína estão diretamente relacionadas à sua estrutura. No caso da  $\beta$ -LG, sua função biológica não é totalmente conhecida, mas sabe-se que tem características de uma proteína de transporte e é capaz de ligar-se a pequenas moléculas hidrofóbicas como retinol (FUGATE; SONG, 1980; JANG; SWAISGOOD, 1990). É conhecido que, *in vitro*, a  $\beta$ -LG nativa liga uma molécula de retinol por monômero e o sítio de ligação mais provável é no interior do cálice hidrofóbico (PAPIZ et al., 1986; CHO; BATT; SAWYER, 1994). Como o retinol fluoresce significativamente quando ligado à  $\beta$ -LG, a capacidade ligante da  $\beta$ -LG mostrará que é maior quanto maior for a quantidade de retinol adicionada, capaz de produzir aumento na fluorescência (SUBRAMANIAM; STEEL; GAFNI, 1996).

As curvas de titulação da  $\beta$ -LG com solução de retinol 3 mM são mostradas na Figura 43. A proteína irradiada sólida com 10 kGy, que mostrou manter a sua estrutura como nativa, como avaliado por medidas de fluorescência e dicroísmo circular e SAXS, não mostrou perda do poder ligante. Nas amostras irradiadas em solução, a capacidade

ligante da  $\beta$ -LG foi diminuída em ~40% para a amostra C10S10 e em ~80% para a C10S3, comparada com a amostra não irradiada, mostrando que a perda foi maior na que apresentou alterações mais significativas no dicróismo circular e fluorescência intrínseca.



**Figura 43.** Curvas de titulação de fluorescência do retinol ligado à  $\beta$ -LG;  $\lambda_{exc}$ =330 nm e  $\lambda_{emiss}$ = 470nm

A perda do poder ligante observado sugere por um lado perda de estrutura terciária que em algum grau tenha afetado o cálice hidrofóbico, não dando condições de ligação e acomodação da molécula de retinol, ou, por outro lado, que algum tipo de agregação molecular tenha dificultado a entrada da molécula ao sítio de ligação dentro do cálice hidrofóbico.

Entretanto, assim como com os resultados da fluorescência intrínseca e de dicróismo circular, não se descarta a hipótese de que a possível perda de Trp pela irradiação tenha contribuído para a perda do poder de ligação do retinol.

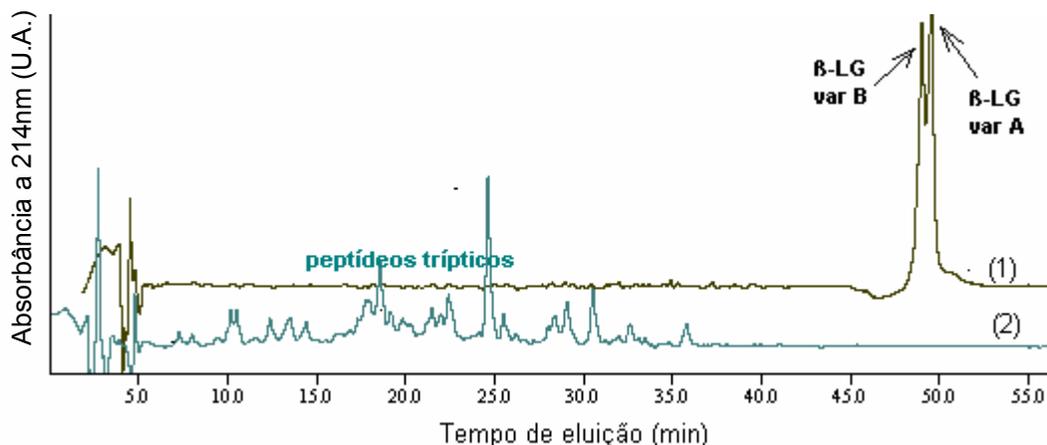
#### ➤ **Susceptibilidade às proteases**

O estudo da digestibilidade das proteínas pode ser útil para estimar a sua biodisponibilidade após terem sido aplicados tratamentos que possam afetar a sua

estrutura. Neste caso, o tratamento de irradiação com raios gama. Nesta etapa, foram estudadas somente as amostras irradiadas sólidas com doses de 0, 10, 25 e 50 kGy. Ainda que não tenham sido verificadas modificações estruturais na proteína irradiada sólida, poderia haver alteração na susceptibilidade às proteases devido à modificações oxidativas em aminoácidos causadas por  $\cdot\text{OH}$  ou  $\cdot\text{OH} + \text{O}_2^-$ , que podem afetar a carga da proteína provocando alterações que poderiam aumentar a susceptibilidade proteolítica da proteína (DAVIES; DELSIGNORE; LIN, 1987; DAVIES; LIN; PACIFICI, 1987).

➤ *Susceptibilidade da  $\beta$ -LG irradiada sólida à tripsina*

Os cromatogramas de fase reversa mostram o perfil da amostra C25A1 antes e após a hidrólise com tripsina (Figura 44). O cromatograma da amostra antes da hidrólise apresenta o pico correspondente à  $\beta$ -LG intacta (Figura 44(1)). O pico desaparece completamente após a hidrólise, como pode ser observado no cromatograma da Figura 44(2), com aparecimento de picos na região mais hidrofílica correspondentes aos peptídeos liberados na proteólise. Os cromatogramas das amostras com diferentes  $a_w$  e doses de irradiação hidrolisadas com tripsina mostraram perfis similares, sem variação no número e/ou intensidade relativa dos picos principais. Os resultados evidenciaram a hidrólise completa da  $\beta$ -LG pela ação da tripsina.

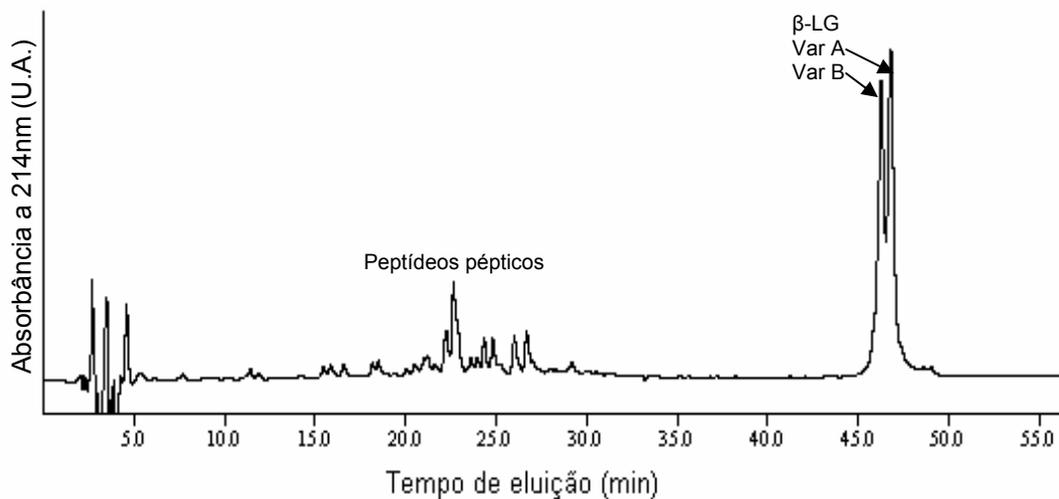


**Figura 44.** Cromatograma de fase reversa (RP-HPLC) do branco sem tripsina (1) e dos hidrolisados trípticos (2) da  $\beta$ -LG ( $a_w$  0,22) irradiada com 25 kGy (C25A1). Eluição feita a 1mg/mL com gradiente de acetonitrila/água e temperatura de coluna de 40°C.

➤ *Susceptibilidade da  $\beta$ -LG irradiada sólida à pepsina*

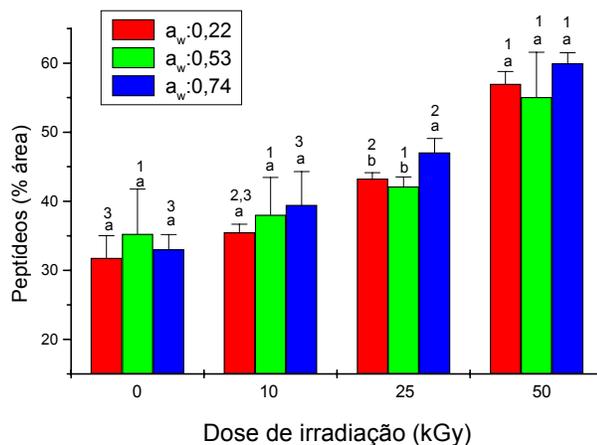
O perfil cromatográfico da amostra da  $\beta$ -LG ( $a_w$  0,22) irradiada com 25 kGy e hidrolisada com pepsina está apresentado na Figura 45. No cromatograma (Figura 45) observa-se que o pico correspondente à proteína intacta ainda está presente e, na região mais hidrofílica, observam-se os picos dos peptídeos liberados na proteólise. Isto indica que a pepsina hidrolisou apenas parcialmente a proteína.

As amostras com  $a_w$  0,22, 0,53 e 0,74, irradiadas com diferentes doses de radiação, mostraram o mesmo tipo de perfil no cromatograma. Parte da  $\beta$ -LG que não foi hidrolisada continua presente, ainda que, em proporção diferente, com respeito aos peptídeos liberados, para cada dose de radiação, como é mostrado mais adiante mediante cálculo relativo das áreas dos picos nos cromatogramas. Na região dos peptídeos pépticos, os principais picos e intensidade relativa entre eles foram mantidos (resultados não mostrados).



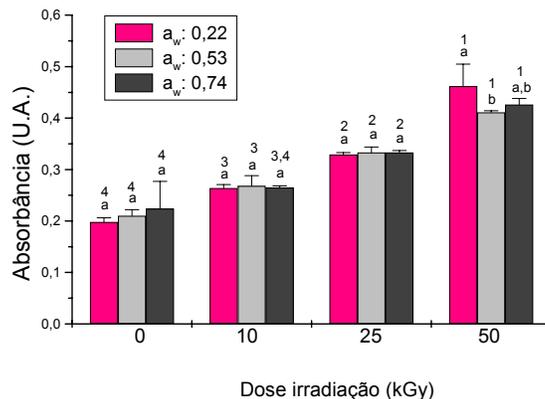
**Figura 45.** Cromatograma de fase reversa (RP-HPLC) do hidrolisado péptico da  $\beta$ -LG ( $a_w=0,22$ ) irradiada com 25 kGy (C25A1). Eluição feita a 1mg/mL com gradiente de acetonitrila/água e temperatura de coluna de 40°C.

Quanto maior a dose de radiação aplicada maior foi a degradação da  $\beta$ -LG pela enzima, originando maior quantidade relativa de peptídeos, como mostrado pelas áreas dos cromatogramas apresentados na Figura 46. A  $a_w$  das amostras não foi importante no aumento da digestibilidade.



**Figura 46.** Áreas nos cromatogramas correspondentes à peptídeos formados pela ação da pepsina na  $\beta$ -LG irradiada a diferentes doses (0; 10, 25, e 50 kGy). Para uma mesma dose de radiação, colunas com letras iguais não diferem significativamente ao nível de 5%. Nas colunas com cor igual (mesma  $a_w$ ) números iguais indicam que elas não diferem significativamente entre si ao nível de 5%(teste de Tukey).

Para melhor avaliação da ação da pepsina sobre a proteína irradiada, utilizou-se também o método espectrofotométrico descrito por Reddy; Kella e Kinsella (1988), no qual, após a hidrólise, separa-se a proteína do material hidrolisado por precipitação com TCA. O conteúdo protéico do hidrolisado no sobrenadante é medido por absorvância a 280 nm. Os resultados são mostrados na Figura 47.



**Figura 47** Absorbância a 280nm dos sobrenadantes das amostras de  $\beta$ -LG irradiadas e hidrolisadas com pepsina, após precipitação com TCA da proteína intacta. Para uma mesma dose de radiação, colunas com letras iguais não diferem significativamente ao nível de 5%. Nas colunas com cor igual (mesma  $a_w$ ) números iguais indicam que elas não diferem significativamente entre si ao nível de 5%(teste de Tukey).

As medidas espectrométricas realizadas para avaliar o conteúdo de peptídeos liberados na proteólise (Figura 47) mostraram semelhança com os resultados obtidos pelo método cromatográfico (Figura 46), seguindo a tendência de aumento da quantidade de peptídeos liberados quanto maior a dose de radiação aplicada.

A  $a_w$  das amostras quando irradiadas não foi determinante para as variações encontradas na susceptibilidade da  $\beta$ -LG irradiada sólida à pepsina. O aumento na digestibilidade pela pepsina foi mais relacionado à dose de radiação aplicada, como observado nas Figuras 46 e 47.

Pode-se concluir que a irradiação da  $\beta$ -LG na forma sólida não alterou a susceptibilidade da proteína à ação da tripsina na faixa de irradiação e  $a_w$  estudadas. No entanto, a proteína mostrou-se menos resistente a ação da pepsina quanto maior a dose de radiação.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As técnicas de fluorescência intrínseca de Trp e de dicroísmo circular são métodos geralmente utilizados para avaliar alterações de conformação das proteínas ao nível de estrutura terciária. As medidas que são obtidas por estas técnicas estão relacionadas com o ambiente do Trp na proteína (CALLIS et al., 1997). No caso da proteína ser desnaturada por efeito de tratamento térmico ou alta pressão hidrostática, alterações no comprimento de onda da máxima intensidade de fluorescência, assim como, perda de sinal de dicroísmo no UV próximo podem ser observadas. No presente estudo, os resultados de fluorescência intrínseca, embora tendo sugerido alterações na conformação da  $\beta$ -LG irradiada em solução, por ocorrência de deslocamento para o vermelho do comprimento de onda do máximo da fluorescência do Trp, não representam neste experimento o mesmo significado no grau de alterações estruturais que em outros tratamentos, como o térmico ou alta pressão hidrostática. O deslocamento para o vermelho não foi acompanhado do aumento da intensidade de fluorescência que normalmente ocorre no processo de desnaturação da  $\beta$ -LG (MANDERSON, G.; HARDMAN, M.; CREAMER, L., 1999a; YANG et al., 2001). Os resultados de dicroísmo circular no UV-próximo da proteína irradiada mostraram perda do sinal de dicroísmo, o que sugere uma maior exposição do Trp ao solvente, geralmente relacionada à perda da estrutura terciária da proteína (MANDERSON; HARDMAN; CREAMER, 1999b; KUWAJIMA; YAMAYA; SUGAI, 1999).

Como os resíduos de aminoácidos aromáticos como o Trp são sensíveis à radiação gama e podem sofrer degradação (GARRISON, 1987), a perda de resíduos de Trp resultaria em diminuição da intensidade de fluorescência intrínseca e do sinal de dicroísmo. Isto sugere que as técnicas de fluorescência intrínseca de Trp e de dicroísmo circular não conduziram a resultados conclusivos neste estudo pela possibilidade de ter ocorrido degradação do resíduo de Trp no processo de irradiação e, conseqüentemente, ter influenciado nos resultados, superestimando o grau de alteração conformacional.

A conformação estrutural ao nível de estrutura terciária e quaternária pode também ser avaliada por SAXS, eletroforese em gel e SE-HPLC. As análises das amostras irradiadas sólidas mostraram similaridade nos resultados com relação à amostra não irradiada (nativa) indicando nenhuma ou pequenas alterações estruturais devido à irradiação, independente do grau de hidratação das proteínas. Os resultados obtidos para as amostras irradiadas em solução foram diferentes dos obtidos para a proteína não

irradiada, evidenciando a formação de agregados, mesmo considerando-se que os resultados de dicroísmo circular no UV-longínquo tenham sugerido a preservação das estruturas secundárias da proteína irradiada em solução. Os espectros de CD no UV-longínquo dos oligômeros formados na  $\beta$ -LG irradiada em solução foram em geral muito semelhantes aos reportados na literatura para os dímeros e tetrâmeros originados no primeiro estágio do aquecimento térmico (CARROTA et al., 2001). A quantificação das estruturas secundárias das amostras irradiadas que apresentaram oligomerização não mostraram diferenças significativas nos conteúdos de hélices- $\alpha$ , estruturas  $\beta$  e desordenadas (Tabela 6) com respeito as amostras não irradiadas (não oligomerizadas). A maioria dos relatos na literatura sobre oligômeros produzidos por aquecimento mostram diminuição das hélices- $\alpha$  e das estruturas  $\beta$  em favor do aumento das estruturas desordenadas, quando comparadas as amostras de  $\beta$ -LG sem tratamento. Como pode ser observado, resultados conflitantes no conteúdo de estruturas secundárias foram obtidos a partir de espectros muito similares no UV-longínquo, o que sugere a necessidade de explorar convenientemente os comprimentos de onda  $<190$  nm que conhecidamente proporcionam dados mais confiáveis das diferentes estruturas (KELLY; PRICE, 1997). Medidas deste tipo são possíveis ao utilizar-se luz síncrotron, que permite a obtenção de espectros de alta qualidade até comprimentos de onda de 160 nm no ultravioleta no vácuo (WALLACE, 2000).

A monomerização da  $\beta$ -LG não foi observada em níveis que pude-se ser detectada por SE-HPLC, onde não foi observado o pico com massa menor que o dímero ( $\sim 35$  kDa) como mostrado nas Figuras 24 e 25. Pelas medidas de SAXS, o menor  $R_g$  das moléculas correspondeu ao estado de dímero com  $R_g \sim 24$  Å, similar aos encontrados na literatura (VERHEUL et al., 1999; CARROTA et al., 2003) não sendo detectada a conformação monomérica. Nos agregados, os dados de  $R_g$  e massa molar, também, não comportaram composição de trímeros ou pentâmeros, etc., sinal da ausência de monômeros no sistema. A ausência da  $\beta$ -LG dímero em estado desnaturado pode ser constatada pela observação da relação de ambos parâmetros,  $R_g$  e massa molecular, apresentados na Tabela 10.

Os oligômeros formados devido à irradiação mostraram alto grau de compacidade da sua estrutura, possivelmente, pela preservação da maior parte da estrutura terciária da proteína com a manutenção do núcleo hidrofóbico e pelas ligações cruzadas formadas entre as moléculas de  $\beta$ -LG. Os oligômeros formados e analisados por SAXS em amostras irradiadas em solução até 10 kGy parecem ajustar-se bem a modelos de

moléculas linearmente agregadas e bem estruturadas. Ligações cruzadas “bitirosil” entre moléculas de dímeros de  $\beta$ -LG parecem ser as principais responsáveis pela formação de polímeros de alta massa molar, múltiplos de dímero. O tipo de oligomerização induzido pela irradiação assemelha-se à produzida nos primeiros estágios do tratamento térmico, à temperaturas entre 65-70°C (BAUER; HANSEN; OGENDAL, 1998; CARROTA et al, 2001; CARROTA et al, 2003). Nesta faixa de temperatura, as moléculas de  $\beta$ -LG não apresentam desnaturação suficiente para expor um grande número de grupos hidrofóbicos que levem à uma agregação desordenada, característica de tratamento térmico mais severo (MANDERSON; HARDMAN; CREAMER, 1998; MANDERSON; CREAMER; HARDMAN, 1999b; CARROTA et al. 2001). A agregação ordenada permitiu que amostras irradiadas em solução até 50 kGy em concentrações de 3 e 10 mg/mL de proteína mostraram-se completamente límpidas e translúcidas, sem diferenças significativas nos valores de transmitância, medida à 550 nm, mostrando que os agregados formados foram solúveis nestas condições do estudo (tampão fosfato de sódio 10 mM e pH 7).

É conhecido que, a radiação com raios gama produz diversas alterações químicas como de oxidação e quebra de alguns grupos nos resíduos de aminoácidos ou até fragmentação da cadeia principal e formação de radicais livres (GARRISON, 1981). Embora nem todos estes efeitos tenham sido avaliados neste experimento, é possível que tenham sido responsáveis pelo início do processo de agregação ao causar alterações na distribuição de carga da proteína com a formação de radicais livres e, contribuído para uma maior flexibilidade da molécula. Os resultados das análises indicam que as alterações conformacionais ocorridas foram menores que as normalmente observadas em outros tratamentos como térmico ou de alta pressão hidrostática, onde a desnaturação da proteína é relevante e agregados insolúveis são formados.

Os resultados no presente trabalho mostram que não houve diminuição da digestibilidade e nem alterações estruturais que comprometessem a funcionalidade da proteína irradiada no estado sólido com doses de até 10 kGy. Estudo anterior (VOISINE; PARENT; SAVOIE, 1990) também mostra que não houve nenhuma alteração na composição aminoacídica e na digestibilidade *in vitro* da  $\beta$ -LG irradiada até 50 kGy submetida a proteólise sob ação da pepsina e pancreatina, avaliada pelo conteúdo de nitrogênio e conteúdo de aminoácidos no material hidrolisado. Como no processamento de alimentos geralmente são utilizadas doses de radiação até um máximo de 10 kGy, estes resultados sugerem que a irradiação da proteína até com dose de 10 kGy poderia

ser aplicada para melhorar a sua qualidade microbiológica e obter  $\beta$ -LG adequada para ser incluída em dietas protéicas em pacientes com baixa imunidade. No entanto, tratando-se de proteína proveniente de leite, cuidados devem ser tomados para que a dose de radiação a ser empregada não cause a formação de aromas desagradáveis que poderão surgir, principalmente, da degradação de resíduos de aminoácidos que possuem grupo tiol (CRAWFORD; RUFF, 1996).

Tendo em vista os resultados obtidos no presente trabalho, algumas alterações de funcionalidade da  $\beta$ -LG pela radiação reportados em estudos anteriores podem ser complementados ou melhor explicados. No estudo de Lee et al. (2001) foi relatado que a irradiação com raios gama reduziu a alergenicidade de proteínas do leite. Segundo os autores, a diminuição das propriedades alergênicas, avaliadas pelo método ELISA, era resultado de possíveis alterações estruturais dos epítomos e aglomeração das proteínas por efeito da radiação gama. Os resultados do presente trabalho sugerem que a diminuição da alergenicidade da  $\beta$ -LG irradiada reportada por Lee et al. (2001) pode ser decorrente do efeito de recobrimento de alguns sítios na superfície da proteína devido à oligomerização das moléculas, mascarando, assim, os epítomos da proteína alergênica, sem ter havido, no entanto, significativas alterações estruturais na proteína.

Le Tien et al. (2000) relataram que filmes obtidos de soluções, contendo proteínas do soro de leite (50 mg/mL) na sua formulação, irradiadas com radiação gama em doses de 32-64 kGy apresentaram boas propriedades mecânicas atribuídas, pelos autores, ao tipo de ligações cruzadas produzidas (bitirosinas), o que resultou em filmes com estrutura mais ordenada (estudo por difração de raios X) e mais estável que os obtidos por aquecimento. No presente estudo, como anteriormente mostrado (Figura 42) foi constatada a produção de ligações bitirosil na  $\beta$ -LG (principal componente das proteínas do soro de leite) irradiada em solução, confirmando analiticamente o relatado por Le Tien et al. (2000). Observamos também que a formação de ligações bitirosil é maior quanto mais diluída a proteína. Baseado nisso é possível supor que diminuindo a concentração de proteína nas soluções (<50 mg/mL), menores doses de radiação poderiam ser suficientes para obter resultados similares aos de Le Tien et al. (2000).



## **7. CONCLUSÕES**

## **7. CONCLUSÕES.**

Os resultados do presente trabalho confirmaram que os efeitos da radiação gama na proteína dependem das condições físico-químicas na qual a proteína é irradiada. Neste trabalho os efeitos da irradiação na  $\beta$ -LG sólida, mesmo com diferentes graus de hidratação, foram desprezíveis quando comparados ao observado na proteína irradiada em solução.

A radiação em doses de até 10 kGy não promoveu alterações estruturais que levassem a perda da funcionalidade ou da digestibilidade da  $\beta$ -LG irradiada no estado sólido, o que sugere que este tratamento poderia ser aplicado para melhorar a qualidade microbiológica da proteína e/ou obter  $\beta$ -LG adequada para ser incluída em dietas protéicas em pacientes com baixa imunidade.

Para a  $\beta$ -LG irradiada em solução, o estudo de SAXS mostrou alterações nos parâmetros de espalhamento que indicaram a formação de agregados de moléculas de  $\beta$ -LG, e com ajuda da construção de modelos, foi possível descrever estes agregados como sendo múltiplos de dímeros de  $\beta$ -LG linearmente ordenados (tetrâmeros, hexâmeros, etc.).

O mecanismo de agregação da  $\beta$ -LG, que inclui formação de ligações cruzadas de bitirosil, mostrou-se diferente do que tem sido reportado para outros tratamentos físicos como o térmico ou de alta pressão hidrostática, podendo gerar agregados com características e propriedades diferentes, o que poderia ampliar a sua aplicabilidade pela indústria de alimentos.

As técnicas de fluorescência intrínseca e dicroísmo circular no UV próximo não foram conclusivas na avaliação das alterações estruturais ao nível de estrutura terciária, devido à possível influência de perdas do cromóforo Trp decorrentes da irradiação. No entanto, as técnicas de SAXS, eletroforese em gel e SE-HPLC foram apropriadas para a elucidação das alterações estruturais e do processo de agregação da proteína.

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. Tradução Claudia Reali. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., 2005, 580p.

ANDRADE, M. A.; CHACÓN, P.; MERELO, J. J.; MORÁN, F. Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism using an unsupervised learning neural network. **Protein Engineering**, v. 6, p. 383-390, 1993.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução – RDC nº 21 de 26/01/2001**. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/21\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/21_01rdc.htm)>. Acesso em: 2 Agosto 2006.

ARAI, M.; IKURA, T.; SEMISOTNOV, G.; KIHARA, H.; AMEMIYA, Y.; KUWAJIMA, K. Kinetic refolding of  $\beta$ -lactoglobulin. Studies by synchrotron X-ray scattering, and circular dichroism, absorption and fluorescence spectroscopy. **Journal of Molecular Biology**, v. 275, p. 149-162, 1998.

ATVARS, T. D. Z.; MARTELLI, C. “**Espectroscopia eletrônica de emissão**” Disponível em: <http://www.chemkeys.com>. Acesso em: 8 Março 2006.

BALDINI, G.; BERETTA, S.; CHIRICO, G.; FRANZ, H.; MACCIONI, E.; MARIANI, P.; SPINOZZI, F. Salt-induced association of  $\beta$ -lactoglobulin by light and X-ray scattering. **Macromolecules**, v. 32, p. 6128-6138, 1999.

BAUER, R.; HANSEN, S.; OGENDAL, L. Detection of intermediate oligomers, important for the formation of heat aggregates of  $\beta$ -lactoglobulin. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 105-112, 1998.

BELLOQUE, J.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; SMITH, G. M. A  $^1\text{H}$ -NMR Study on the effect of high pressures on  $\beta$ -lactoglobulin. **Journal of American Chemical Society**, v. 48, p. 3906-3912, 2000.

BELLOQUE, J.; SMITH, G. M. Thermal denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin. A  $^1\text{H}$ -FT-NMR study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1805-1813, 1998.

BERTRAND-HARB, C.; BADAY, A.; DALGALARRONDO, M.; CHOBERT, J-M.; HAERTLÉ, T. Thermal modifications of structure and co-denaturation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin induce changes of solubility and susceptibility to proteases. **Nahrung Food**, v. 46, p. 283-289, 2002.

BOTELHO, M.; VALENTE-MESQUITA, V.; OLIVEIRA, K.; POLIKARPOV, I.; FERREIRA, S. Pressure denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 2235-2248, 2000.

BRAHMS, S.; BRAHMS, J. Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. **Journal of Molecular Biology**, v. 138, p. 149-178, 1980.

BRAULT, D.; D'APRANO, G.; LACROIX, M. Formation of free-standing sterilized edible films from irradiated caseinates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2964-2969, 1997.

BRENNAND, C. P. **Ten most commonly asked question about food irradiation.** Disponível em: <[www.physics.isu.edu/radinf/food.htm](http://www.physics.isu.edu/radinf/food.htm)>. Acesso em: 10 jan. 2006.

BRITTAN, H.; MUDFORD, J. C.; NORRIS, G. E.; KITSON, T. M.; HILL, J. P. Labelling the free sulphhydryl group in  $\beta$ -lactoglobulin A, B and C. In International Dairy Federation Special Issue 9702. Milk Protein Polimorfism. **International Dairy Federation**, p. 200-203, 1997.

BROWNLOW, S.; CABRAL, J.H.; COOPER, R.; FLOWER, D.; YEWDALL, S.; POLIKARPOV, I.; NORTH, A.; SAWYER, L. Bovine  $\beta$ -lactoglobulin at 1.8Å resolution-still an enigmatic lipocalin. **Structure**, v. 5, p. 481-495, 1997.

BUSINCO, L.; BRUNO, G.; GIAMPIETRO, P. G. Soy protein for the prevention and treatment of children with cow-milk allergy. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, suplement. p. 1447S-1452S, 1998.

BYCHKOVA, V.; BERNI, R.; ROSSI, G.; KUTYSHENKO, V.; PTITSYN, O. Retinol-binding protein is in the molten globule state at low pH. **Biochemistry**, v. 31, p. 7566-7571, 1992.

BYUN, M. W.; LEE, J. W.; YOON, H. S.; LEE, K. H.; KIM, K. P. The improvement of color and shelf life of ham by gamma irradiation. **Journal of Food Protection**, v. 62, p. 1162-1166, 1999.

CAESSENS, P.; VISSER, S.; GRUPPEN, H.; VORAGEN, A.  $\beta$ -lactoglobulin hydrolysis. 1. peptide composition and functional properties of hydrolysates obtained by the action of plasmin, trypsin, and *staphylococcus aureus* V8 protease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 2973-2979, 1999.

CALLIS, P. R.  $^1L_a$  and  $^1L_b$  Transitions of tryptophan: Applications of theory and experimental observations to fluorescence of proteins. **Methods in Enzymology**, v. 278, p. 113-150, 1997.

CARROTA, R.; BAUER, R.; WANINGE, R.; RISCHER, C. Conformational characterization of oligomeric intermediates and aggregates in  $\beta$ -lactoglobulin heat aggregation. **Protein Science**, v. 10, p. 1312-1318, 2001.

CARROTA, R.; ARLETH, L.; PEDERSEN, J.; BAUER, R. Small-angle X-ray scattering studies of metastable intermediates of  $\beta$ -lactoglobulin isolated after heat-induced aggregation. **Biopolymers**, v. 70, p. 377-390, 2003.

CASAL, H.L.; KÖHLER, U.; MANTSCH, H. H. Structural and conformational changes of  $\beta$ -lactoglobulin B: an infrared spectroscopic study of the effect of pH and temperature. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 957, p.11-20, 1988.

CAVALCANTI, L. P.; TORRIANI, I. L.; PLIVELIC, T. S.; OLIVEIRA, C. L. P.; KELLERMANN, G.; NEUENSCHWANDER, R. Two new sealed sample cells for small angle x-ray scattering from macromolecules in solution and complex fluids using synchrotron radiation. **Review of Scientific Instruments**, v. 75, p. 4541-4546, 2004.

CHANG, C. T.; WU, C-S. C.; YANG, J. T. Circular dichroic analysis of protein conformation: inclusion of the  $\beta$ -turns. **Analytical Biochemistry**, v. 91, p.13-31, 1978.

CHEN, Y.; BARKLEY, M. D. Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. **Biochemistry**, v. 37, p. 9976-9982, 1998.

CHEN, W. L.; HWANG, M. T.; LIAU, C. Y.; HO, J. C. HONG, K. C.; MAO, S. J. T.  $\beta$ -lactoglobulin is a thermal marker in processed milk as studied by electrophoresis and circular dichroic spectra. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 1618-1630, 2005.

CHO, Y.; BATT, C.; SAWYER, L. Probing the retinol-binding site of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 11102-11107, 1994.

CLEMENT, G.; BOQUET, D.; FROBERT, Y.; BERNARD, H.; NEGRONI, L.; CHATEL, J-M.; ADEL-PATIENT, K.; CREMINON, C.; WAL, J-M.; GRASSI, J. Epitopic characterization of native  $\beta$ -lactoglobulin. **Journal of Immunological Methods**, v. 266, p. 67-78, 2002.

COMPTON, L. A.; JOHNSON, W. C. Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. **Analytical Biochemistry**, v. 155, p.155-167, 1986.

CORRY, J. E. C.; JAMES, C.; JAMES, S. J.; HINTON, M. *Salmonella, Campylobacter and Escherichia coli* O157:H7 decontamination techniques for the future. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, p. 187-196, 1995.

CRAEMER, L. W. Effect of sodium dodecyl sulfate and palmitic acid on the equilibrium unfolding of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. **Biochemistry**, v. 34, p. 7170-7176, 1995.

CRAWFORD, L. M.; RUFF, E. H. A review of the safety of cold pasteurization through irradiation. **Food Control**, v. 7, p. 87-97, 1996.

CROGUENNEC, T.; BOUHALLAB, S.; MOLLÉ, D.; O'KENNEDY B. T.; MEHRA, R. Stable monomeric intermediate with exposed Cys-119 is formed during heat denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 301, p. 465-471, 2003.

CROGUENNEC, T.; MOLLÉ, D.; MEHRA, R.; BOUHALLAB, S. Spectroscopic characterization of heat-induced nonnative  $\beta$ -lactoglobulin monomers. **Protein Science**, v. 13, p. 1340-1346, 2004.

CURLEY, R. W.; SUNDARAM, A. K.; FOWBLE, J. W.; ABILDGAARD, F.; WESTLER, W. M.; MARKLEY, J. L. NMR studies of retinoid-protein interactions: the conformation of  $^{13}\text{C}$ - $\beta$ -ionones bound to  $\beta$ -lactoglobulin B. **Pharmaceutical Research**, v. 16, p. 651-659, 1999.

DAI-DONG, J. X.; NOVAK, G.; HARDY, J. Stabilization of vitamin C by  $\beta$ -lactoglobulin during heat treatment. **Science des Aliments**, v. 10, p. 393, 1990.

DAVIES, K.; DELSIGNORE, M.; LIN, S. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II Modification of amino acids. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 9902-9907, 1987.

DAVIES, K.; LIN, S.; PACIFICI, R. Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 9914-9920, 1987.

DE JONGH, H. H. J.; GRÖNEVELD, T.; DE GROOT, J. Mild isolation procedure discloses new protein structural properties of  $\beta$ -lactoglobulin. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 562-571, 2001.

DELINCÉE, H. Detection of food treated with ionizing radiation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, p. 73-82, 1998.

DE WIT, J. N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 597-608, 1998.

DIAS, N. F. G. P.; **Estudo comparativo de propriedades imunestimulatórias e antitumoral de concentrados protéicos de soro de leite bovino, da caseína, e de um isolado protéico de soja comercial**. 2003. 149p. Tese (Doutor em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

DIB, R.; CHOBERT, J. M.; DALGALARRONDO, M.; HAERTLÉ, T. Secondary structure changes and peptic hydrolysis of  $\beta$ -lactoglobulin induced by diols. **Biopolymers**, v. 39, p. 23-30, 1996.

DIEHL, J. F. **Safety of irradiated foods**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 1995, 454p.

DOLGIKH, D. A.; GILMANSHIN, R. I.; BRAZHNIKOV, E. V.; BYCHKOVA, V. E.; SEMISOTNOV, G. V.; VENYAMINOV, S. Y.; PTITSYN, O. B.  $\alpha$ -lactalbumin: compact state with fluctuating tertiary structure? **Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters**, v. 136, p.311-315, 1981.

DUFOUR, E.; BERTRAND-HARB, C.; HAERTLÉ, T. Reversible effects of medium dielectric constant on structural transformation of  $\beta$ -lactoglobulin and its retinol binding. **Biopolymers**, v. 33, p. 589-598, 1993.

DUFOUR, E.; HOA, G. H.; HARTLE, T. High pressure effects on  $\beta$ -lactoglobulin interactions with ligands studied by fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1206, p. 166-172, 1994.

DUFOUR, E.; HAERTLÉ, T. Binding of retinoids and  $\beta$ -carotene to  $\beta$ -lactoglobulin. Influence of protein modifications. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1079, p. 316-320, 1991.

DUFOUR, E.; MARDEN, M.; HAERTLÉ, T.  $\beta$ -lactoglobulin binds retinol and protoporphyrin IX at two different binding sites. **Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters**, v. 277, p. 223-226, 1990.

DUMOULIN, M.; OZAWA, S.; HAYASHI, R. Textural properties of pressure-induced gels of food proteins obtained under different temperatures including subzero. **Journal of Food Science**, v. 63, p. 92-95, 1998.

DYSON, H. J.; WRIGHT, P. E. Insights into protein folding from NMR. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 47, p. 369-395, 1996

EFTINK, M. R. Fluorescence techniques for studying protein structure. In: **Methods of Biochemical Analysis**. New York: John Wiley & Sons, Inc. v. 35, 1991. p. 127-205

EIGEL, W. N.; BUTLER, J. E.; ERNSTROM, C. A.; FARREL, H. M.; HARWALKER, V. R.; JENNES, R.; WHITNEY, R. M. Nomenclature of proteins of cow's milk. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p. 1599-1631, 1984.

ELGAR, D. F.; NORRIS, C. S.; AYERS, J. S.; PRITCHARD, M.; OTTER, D. E.; PALMANO, K. P. Simultaneous separation and quantitation of the major bovine whey proteins including proteose peptone and caseinomacropeptide by reversed-phase high-performance liquid chromatography on polystyrene-divinylbenzene. **Journal of Chromatography A**, v. 878, p. 183-196, 2000.

ELLMANN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, p. 70-77, 1959.

ELOFSSON, U.; DEJMEK, P.; PAULSSON, M. Heat-induced aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin studied by dynamic light scattering. **International Dairy Journal**, v. 6, p. 343-357, 1996.

FARKAS, J. Irradiation as a method for decontaminating food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, p. 189-204, 1998.

FARREL, H. M.; QI, P. X.; BROWN, E. M.; COOKE, P. H.; TUNICK, M. H.; WICKHAM, E. D.; UNRUH, J. J. Molten globule structures in milk proteins: implications for potential new structure-function relationships. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 459-471, 2002.

FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. 3. ed. New York: Marcel Dekker Inc., 1996. 1067p.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. London: Blackie Academic & Professional, 1998. 478p.

FUGATE, R.; SONG, P-S. Spectroscopic characterization of  $\beta$ -lactoglobulin – retinol complex. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 625, p. 28-42, 1980.

FUNTENBERGER, S.; DUMAY, E.; CHEFTEL, J. C. High pressure promotes  $\beta$ -lactoglobulin aggregation through SH/S-S interchange reactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 912-921, 1997.

FUTTERMAN, S.; HELLER, J. The enhancement of fluorescence and the decreased susceptibility to enzymatic oxidation of retinol complexed with bovine serum albumin,  $\beta$ -lactoglobulin, and the retinol-binding protein of human plasma. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, p. 5168-5172, 1972.

GARRISON, W. M. Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. **Chemical Review**, v. 87, p. 381-398, 1987.

GLATTER, O.; KRATKY, O. **Small-angle X-rays scattering**. New York: Academic Press, 1982.

GREEN, D. W.; ASCHAFFENBURG, R.; CAMERMAN, A.; COPPOLA, J. C.; DUNNILL, P.; SIMMONS, R. M.; KOMOROWSKI, E. S.; SAWYER, L.; TURNER, E. M. C.; WOODS, K. F. Structure of bovine  $\beta$ -lactoglobulin at 6 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 131, p. 357-397, 1979.

GRIFFIN, W. G.; GRIFFIN, M. C. A; MARTIN, S. R.; PRICE, J. Molecular basis of thermal aggregation of bovine  $\beta$ -lactoglobulin A. **Journal of Chemical Society Faraday Transactions**, v. 89, p. 3395-3406, 1993.

GROLICHOVÁ, M.; DVORÁK, P.; MUSILOVÁ. Employing ionizing radiation to enhance food safety- a review. **Acta Veterinaria Brunensis**, v. 73, p. 143-149, 2004.

GUICHARD, E.; LANGOURIEUX, S. Interactions between  $\beta$ -lactoglobulin and flavour compounds. **Food Chemistry**, v. 71, p. 301-308, 2000.

GUINIER, A.; FOURNET, G. **In: Small-angle Scattering of X-rays**. New York: Wiley, 1955, 268p.

HAGEMAN, M.; BAUER, J.; POSSERT, P.; DARRINGTON, R. Preformulation studies oriented toward sustained delivery of recombinant somatropins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 348-355, 1992.

HARDY, J.; SCHER, J.; BANON, S. Water activity and hydration of dairy powders. **Lait**, v. 82, p. 441-452, 2002.

HOFFMANN, M. A.; ROEFS, S.P.; VERHEUL, M.; VAN MIL, P. J.; DE KRUIF, K. G. Aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin studied by *in situ* light scattering. **Journal of Dairy Research**, v. 63, p. 423-440, 1996.

HOFFMANN, M. A.; VAN MIL, P. J. Heat- induced aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin: role of the free thiol group and disulfide bonds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2942-2948, 1997.

HUFFMAN, L. Processing whey protein for use as a food ingredient. **Food Technology**, v. 50, p. 49-52, 1996.

HUFFMAN, L. M.; HARPER, W. J. Maximizing the value of milk through separation technologies. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2238-2244, 1999.

IAMETTI, S.; DE GREGORI, B.; VECCHIO, G.; BONOMI, F. Modifications occur at different structural levels during the heat denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin. **European Journal of Biochemistry**, v. 237, p. 106-112, 1996.

IAMETTI, S.; TRANSIDICO, P.; BONOMI, F.; VECCHIO, G.; PITTIA, P.; ROVERE, P.; DALL'AGLIO, G. Molecular modifications of  $\beta$ -lactoglobulin upon exposure to high pressure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 23-29, 1997.

IBRAHIM, H. R.; KOBAYASHY, K.; KATO, A. Improvement of the surface functional properties of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin by heating in a dry state. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, p. 1549-1552, 1993.

ICGFI (International Consultative Group on Food Irradiation). **Facts about Food Irradiation**. FAO/IAEA/WHO, Viena Auatria, 1991.

IGLESIAS, O.; BUENO, J. L. Water agar-agar equilibrium: determination and correlation of sorption isotherms. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 34, p. 209-216, 1999.

IMAFIDON, G. I.; FARKYE, N. Y.; SPANIER, A. M. Isolation, purification, and alteration of some functional groups of major milk proteins: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, p. 663-689, 1997.

JAMESON, G.; ADAMS, J.; CREAMER, L. Flexibility, functionality and hydrophobicity of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 319-329, 2002.

JANG, H.D.; SWAISGOOD, H. E. Analysis of ligand binding and  $\beta$ -lactoglobulin denaturation by chromatography on immobilized trans-retinal. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 2067-2074, 1990.

KANNO, C.; MU, T-H.; HAGIWARA, T.; AMETANI, M.; AZUMA, N. Gel formation from industrial milk whey proteins under hydrostatic pressure: effect of hydrostatic pressure and protein concentration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 417-424, 1998.

KATAOKA, M.; HAGIHARA, Y.; MIHARA, K.; GOTO, Y. Moltem globule of cytochrome c studied by the small angle X-ray scattering. **Journal of Molecular Biology**, v. 229, p. 591-596, 1993.

KATAOKA, M.; NISHII, I.; FUJISAWA, T.; UEKI, T.; TOKUNAGA, F.; GOTO, Y. Structural characterization of the moltem globule and native states of apomyoglobin by solution X-ray scattering. **Journal of Molecular Biology**, v. 249, p. 215-228, 1995.

KAUFFMAN, E.; DARNTON, N. C.; AUSTIN, R. H.; BATT, C.; GERWERT, K. Lifetimes of intermediates in the  $\beta$ -sheet to  $\alpha$ -helix transition of  $\beta$ -lactoglobulin by using a difusional IR mixer. **Proceedings of the National Academy Science**, v. 98, p. 6646-6649, 2001.

KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1338, p. 161-185, 1997.

KINSELLA, J. E.; WHITEHEAD, D. M. Proteins in whey: chemical, physical, and functional properties. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 33, p. 343-378, 1989.

KONAREV, P.V.; PETOUKHOV, M. V.; SVERGUN, D. I. "MASSHA – a graphic system for rigid body modelling of macromolecular complexes against solution scattering data". **Journal of Applied Crystallography**, v. 34, p. 527-532, 2001.

KRATKY, O. Natural high polymers in the dissolved and solid state. In: Glatter, O., Kratky, O. **Small angle X-ray scattering**. New York: Academic Press, p. 361-386, 1982.

KRAULIS, P.J. MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 24, p. 946-950, 1991.

KUNTZ, I. D. Jr.; KAUZMANN, W. Hydration of proteins and polypeptides. **Advances in Protein Chemistry**, v. 28, p. 239-345, 1974.

KURISAKI, J.; NAKAMURA, S.; KAMINOGAWA, S.; YAMAUCHI, K. The antigenic properties of  $\beta$ -lactoglobulin examined with mouse IgE antibody. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, v. 46, p. 2069-2075, 1982.

KUWAJIMA, K.; YAMAYA, H.; SUGAI, S. The bursa-phase intermediate in the refolding of  $\beta$ -lactoglobulin studied by stopped-flow circular dichroism and absorption spectroscopy. **Journal of Molecular Biology**, v. 264, p. 806-822, 1996.

LABUZA, T. P.; KAAANANE, A.; CHEN, J. Y. Effect of temperature on the moisture sorption isotherms and water activity of two dehydrated foods. **Journal of Food Science**, v. 50, p. 385-391, 1985.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAI, M. C.; TOPP, E. M. Solid-state chemical stability of proteins and peptides. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, p. 489-500, 1999.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. New York: Plenum Press, 1983, 516p.

LANGE, D. C.; KOTHARI, R.; PATEL, R. C.; PATEL, S. C. Retinol and retinoic acid binding to a surface cleft in bovine  $\beta$ -lactoglobulin: a method of binding site determination using fluorescence resonance energy transfer. **Biophysical Chemistry**, v. 74, p. 45-51, 1998.

LANGTON, M.; HERMANSSON, A-M. Fine-stranded and particulate gels of  $\beta$ -lactoglobulin and whey protein at varying pH. **Food Hydrocolloids**, v. 7, p. 523-539, 1992.

LATTMAN, E.; FIEBIG, K. M.; DILL, K. A. Modeling compact denatured states of proteins. **Biochemistry**, v. 33, p. 6158-6166, 1994.

LEE, J-W.; KIM, J-H.; YOON, H-S.; KANG, K-O.; LEE, S-Y.; HWANG, H-J. Effects of gamma radiation on the allergenic and antigenic properties of milk proteins. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 272-276, 2001.

LE TIEN, C.; LETENDRE, M.; ISPAS-SZABO, P.; MATEESCU, M. A.; DELMAS-PATTERSON, G.; YU, H. L.; LACROIX, M. Development of biodegradable films from whey proteins by cross-linking and entrapment in cellulose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5566-5575, 2000.

LETENDRE, M.; D'ÁPRANO, G.; DELMAS-PATTERSON, G.; LACROIX, M. Isothermal calorimetry study of calcium caseinate and whey protein isolate edible films cross-linked by heating and  $\gamma$ -irradiation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6053-6057, 2002.

LIU, W.; LANGER, R.; KLIBANOV, A. Moisture-induced aggregation of lyophilized proteins in the solid state. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, p. 177-184, 1991.

LÓPEZ-DÍEZ, E. C.; BONE, S. An investigation of the water-binding properties of protein + sugar systems. **Physics in Medicine and Biology**, v. 45, p. 3577-3588, 2000.

LORENZI, C. C. B. **Estudo estrutural de mastoparanos isolados de vespas solitárias**. 2002. 115p. Dissertação (Mestre em Biofísica Molecular) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 2002.

MANAVALAN, P.; JOHNSON, W. C. Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. **Analytical Biochemistry**, v. 167, p. 76-85, 1987.

MANDERSON, G.; HARDMAN, M.; CREAMER, L. Effect of heat treatment on bovine  $\beta$ -lactoglobulin A, B, and C explored using thiol availability and fluorescence. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 3617-3627, 1999a.

MANDERSON, G.; CREAMER, L.; HARDMAN, M. Effect of Heat Treatment on the Circular Dichroism Spectra of Bovine  $\beta$ -Lactoglobulin A, B, and C. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4557-4567, 1999b.

MANDERSON, G.; HARDMAN, M.; CREAMER, L. Effect of heat treatment on the conformation and aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin A, B, and C. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 5052-5061, 1998.

MÄNTYJÄRVI, R.; RAUTIAINEN, J.; VIRTANEN. Lipocalins as allergens. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1482, p. 308-317, 2000.

MARSHALL, K. Therapeutic applications of whey protein. **Alternative Medicine Review**, v. 9, p. 136-156, 2004.

MARSHALL, K. R.; HARPER, R. J. Whey protein concentrates. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v. 233, p. 21-32, 1988.

MATSUURA, J.; MANNING, M. Heat-induced gel formation of  $\beta$ -lactoglobulin: A study on the secondary and tertiary structure as followed by circular dichroism spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1650-1656, 1994.

MAUBOIS, J. L.; PIERRE, A.; FAUQUANT, J.; PIOT, M. Industrial fractionation of main whey proteins. **International Dairy Federation Bulletin**, v. 212, p. 154-159, 1987.

McKENZIE, H. A.; SAWYER, W. H. Effect of pH on  $\beta$ -lactoglobulins. **Nature**, v. 214, p.1101-1104, 1967.

McINTOSH, G. H.; ROYLE, P. J.; LE LEU, R. K.; REGESTER, G. O.; JOHNSON, M. A.; GRINSTED, R. L.; KENWARD, R. S.; SMITHERS, G. W. Whey proteins as functional food ingredients? **International Dairy Journal**, v. 8, p. 425-434, 1998.

MESSENS, W.; VAN CAMP, J.; HUYGHEBAERT, A. The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, p. 107-112, 1997.

MOCZ, G. **The use of fluorescence in research into protein structure**. Disponível em: <<http://core.biotech.hawaii.edu/ppsidx.htm>>. Acesso em: 08 março 2006.

MOLLER, R.; STAPELFELDT, H.; SKIBSTED. Thiol reactivity in pressure-unfolded  $\beta$ -lactoglobulin. antioxidative properties and thermal refolding. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 425-430, 1998.

MONACO, H. L.; ZANOTTI, G.; SPADON, P.; BOLOGNESI, M.; SAWYER, L.; ELIOPOULOS, E. E. Crystal structure of the trigonal form of bovine  $\beta$ -lactoglobulin and its complex with retinol at 2.5 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 197, p. 695-706, 1987.

MORR, C. V.; FOEGEDING, E. A. Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates: A status report. **Food Technology**, v. 44, p.100-112, 1990.

MORR, C. V.; HA, Y. W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, p. 431-476, 1993.

MORGAN, F.; VÉNIEN, A.; BOUHALLAB, S.; MOLLÉ, D.; LÉONIL, J.; PELTRE, G.; LEVIEUX, D. Modification of Bovine  $\beta$ -Lactoglobulin by glycation in a powdered state or in an aqueous solution: immunochemical characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4543-4548, 1999.

MULLALLY, M. M.; MEISEL, H.; FITZGERALD, R. J. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 299-303, 1997.

MURESAN, S.; VAN DER BENT, A.; DE WOLF, F. A. Interaction of  $\beta$ -lactoglobulin with small hydrophobic ligands as monitored by fluorometry and equilibrium dialysis: Nonlinear quenching related to protein-protein association. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2609-2618, 2001.

NAGAOKA, S.; FUTAMURA, Y.; MIWA, K.; AWANO, T.; YAMAUCHI, K.; KANAMARU, Y.; TADASHI, K.; KUWATA, T. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived

from bovine milk  $\beta$ -lactoglobulin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 281, p. 11-17, 2001.

NEURATH, A. R.; JIANG, S.; STRICK, N.; LIN, K.; LI, Y-Y.; DEBNATH, A. K. Bovine  $\beta$ -lactoglobulin modified by 3-hydroxyphthalic anhydride blocks the CD4 cell receptor for HIV. **Nature Medicine**, v. 2, p. 230-234, 1996.

OLIVEIRA, C. L. P. TRAT1D – Computer program for SAXS data treatment. **LNLS Technical Manual MT01/2003**. 2003.

OLIVEIRA, K.; VALENTE-MESQUITA, V.; BOTELHO, M.; SAWYER, L.; FERREIRA, S.; POLIKARPOV, I. Crystal structures of bovine  $\beta$ -lactoglobulin in the orthorhombic space group C222<sub>1</sub>. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 477-483, 2001.

OTANI, H.; UCHIO, T.; TOKITA, F. Antigenic reactivities of chemically modified  $\beta$ -lactoglobulins with antiserum to bovine  $\beta$ -lactoglobulin. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, v. 49, p. 2531-2536, 1985.

OTTE, J.; ZAKORA, M.; QVIST, K.; OLSEN, C.; BARKHOLT, V. Hydrolysis of bovine  $\beta$ -lactoglobulin by various proteases and identification of selected peptides. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 835-848, 1997.

OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. J.; SKURNIK, M.; CONWAY, P. L. Inhibition of pathogen adhesion by  $\beta$ -lactoglobulin. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 685-692, 1997.

PALAZOLO, G.; RODRÍGUEZ, F.; FARRUGIA, B.; PICÓ, G.; DELORENZI, N. Heat treatment of  $\beta$ -lactoglobulin: structural changes studied by partitioning and fluorescence. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3817-3822, 2000.

PANICK, G.; MALESSA, R.; WINTER, R. Differences between the pressure- and temperature-induced denaturation and aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin A, B, and AB monitored by FT-IR spectroscopy and small- angle X-ray scattering. **Biochemistry**, v. 38, p. 6512-6519, 1999.

PAPIZ, M. Z.; SAWYER, L.; ELIOPOULOS, E. E.; NORTH A. C. T.; FINDLAY, J. B. C.; SIVAPRASADARAO, R.; JONES, T. A.; NEWCOMER, M. E.; KRAULIS, P. J. The structure of  $\beta$ -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. **Nature**, v. 324, p.383-385, 1986.

PAUL, P.; CHAWLA, S. P.; THOMAS, P.; KESAVAN, P. C. Effect of high hydrostatic pressure, gamma-irradiation and combination treatments on the microbiological quality of lamb meat during chilled storage. **Journal of Food Safety**, v. 16, p. 263-271, 1997.

PELLEGRINI, A.; DETTLING, C.; THOMAS, U.; HUNZIKER, P. Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine  $\beta$ -lactoglobulin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1526, p. 131-140, 2001.

PESSEN, H.; KUMOSINSKI, T. F.; TIMASHEFF, S. N. The use of small-angle X-ray scattering to determine protein conformation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 19, p. 698-702, 1971.

PHILLIPS, L. G.; HAWKS, S. E.; GERMAN, J. B. Structural characteristics and foaming properties of  $\beta$ -lactoglobulin: Effects of shear rate and temperature. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 613-619, 1995.

PHOTCHNACHAI, S.; KITABATAKE, N. Heating of  $\beta$ -lactoglobulin a solution in a closed system at high temperatures. **Journal of Food Science**, v. 66, p. 647-652, 2001.

PORTER, M. C.; MICHAELS, A. S. Applications of membrane ultrafiltration to food processing. **Proceedings of the Third International Congress of Food Science and Technology**, p. 462-473, 1970.

PRABAKARAN, S.; DAMODARAN, S. Thermal unfolding of  $\beta$ -lactoglobulin: characterization of initial unfolding events responsible for heat-induced aggregation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4303-4308, 1997.

PROVENCHER, S. W.; GLOCKNER, J. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. **Biochemistry**, v. 20, p. 33-37, 1981.

PRUTZ, W. A.; BUTLER, J.; LAND, E. J. Phenol coupling initiated by one-electron oxidation of tyrosine units in peptides and histone. **International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine**, v. 44, p. 183-196, 1983.

PTITSYN, O. B. Molten globule and protein folding. **Advances in Protein Chemistry**, v. 47, p. 83-229, 1995.

PUYOL, P.; PEREZ, M. D.; PEIRO, J. M.; CALVO, M. Effect of binding of retinol and palmitic acid to bovine  $\beta$ -lactoglobulin on its resistance to thermal denaturation. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 1494-1502, 1994.

PUYOL, P.; PEREZ, M. D.; SANCHEZ, L.; ENA, J. M.; CALVO, M. Uptake and passage of  $\beta$ -lactoglobulin, palmitic acid and retinol across the Caco-2 monolayer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1236, p. 149-154, 1995.

QI, X. L.; HOLT, C.; MCNULTY, D.; CLARKE, D. T.; BROWNLOW, S.; JONES, G. R. Effect of temperature on the secondary structure of  $\beta$ -lactoglobulin at pH 6.7, as determined by CD and IR spectroscopy: a test of the molten globule hypothesis. **Biochemical Journal**, v. 324, p. 341-346, 1997.

QIN, B. Y.; BEWLEY, M. C.; CREAMER, L. K.; BAKER, H. M.; BAKER, E. N.; JAMESON, G. B. Structural basis of the Tanford transition of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. **Biochemistry**, v. 37, p. 14014-14023, 1998.

QIN, B. Y.; BEWLEY, M. C.; CREAMER, L. K.; BAKER, H. M.; BAKER, E. N.; JAMESON, G. B. Functional implications of structural differences between variants A and B of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. **Protein Science**, v. 8, p. 75-83, 1999.

RAGONA, L.; FOGOLARI, F.; ZETTA, L.; PEREZ, D.; PUYOL, P.; de KRUIF, K.; LÖHR, F.; RÜTERJANS, H.; MOLINARI, H. Bovine  $\beta$ -lactoglobulin: Interaction studies with palmitic acid. **Protein Science**, v. 9, p. 1347-1356, 2000.

REDDY, I.; KELLA, N.; KINSELLA, J. Structural and conformational basis of the resistance of  $\beta$ -lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, p. 737-741, 1988.

REGESTER, G. O.; MCINTOSH, G. H.; LEE, V. W. K; SMITHERS, G. W. Whey proteins as nutritional and functional food ingredients. **Food Australia**, v. 48, p. 123-128, 1996.

ROUVINEN, J.; RAUTIAINEN, J.; VIRTANEN, T.; ZEILER, T.; KAUPPINEN, J.; TAIVAINEN, A.; MÄNTYJÄRVI, R. Probing the molecular basis of allergy. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 2337-2343, 1999.

RUPLEY J. A.; CARERI, G. Protein hydration and function In: **Advances in protein chemistry**. New York: Academic Press, Inc. v. 41, 1991, p. 37-170.

SABATO, S. F.; OUATTARA, B.; YU, H.; DÁPRANO, G.; LE TIEN, C.; MATEESCU, M. A.; LACROIX, M. Mechanical and barrier properties of cross-linked soy and whey protein based films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1397-1403, 2001.

SAWYER, L.; KONTOPIDIS, G. The core lipocalin- $\beta$ -lactoglobulin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1482, p. 136-148, 2000.

SÉLO, I.; CLÉMENT, G.; BERNARD, C.; CHATEL, J-M.; CRÉMINON, C.; PELTRE, G. Allergy to bovine  $\beta$ -lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 29, p. 1055-1063, 1999.

SEMENYUK, V.; SVERGUN, D. I. GNOM – A program package for small-angle scattering data-processing. **Journal of Applied Crystallography**, v. 24, p. 537-540, 1991.

SEVILLA, M. D.; BECKER, D.; YAN, M. The formation and structure of the sulfoxyl radicals  $RSO\cdot$ ,  $RSOO\cdot$ ,  $RSO_2OO\cdot$  from the reaction of cysteine, glutathione and penicillamine thiyl radicals with molecular oxygen. **International Journal of Radiation Biology**, v. 57, p. 65-81, 1990.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, p. 397-409, 2004.

SHIMADA, K.; CHEFTEL, J. C. Sulfhydryl group/disulfide bond interchange reactions during heat-induced gelation of whey protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, p.161-168, 1989.

SHIMIZU, M.; SAITO, M.; YAMAUCHI, K. Emulsifying and structural properties of  $\beta$ -lactoglobulin at different pHs. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 49, p. 189-194, 1985.

SHINAR, E.; NAVOK, T.; CHEVION, M. The analogous mechanisms of enzymatic inactivation induced by ascorbate and superoxide in the presence of copper. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 258, p. 14778-14783, 1983.

SPIES, J. Milk allergy. **Journal of Milk and Food Technology**. v. 36, p. 225-231, 1973.

SREERAMA, N.; VENYAMINOV, S. Y.; WOODY, R. W. Estimation of the number of helical and strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. **Protein Science**, v. 8, p. 370-380, 1999.

STADING, M.; LANGTON, M.; HERMANSSON, A-M. Microstructure and rheological behaviour of particulate  $\beta$ -lactoglobulin gels. **Food Hydrocolloids**, v. 7, p. 195-212, 1993.

STAPELFELDT, H.; PETERSEN, P. H.; KRISTIANSEN, K. R.; QVIST, K. B.; SKIBSTED, L. H. Effect of high hydrostatic pressure on the enzymic hydrolysis of  $\beta$ -lactoglobulin B by trypsin, thermolysin and pepsin. **Journal of Dairy Research**, v. 63, p. 111-118, 1996.

SUBRAMANIAM, V.; STEEL, D.; GAFNI, A. In vitro renaturation of bovine B-lactoglobulin A leads to a biologically active but incompletely refolded state. **Protein Science**, v. 5, p. 2089-2094, 1996.

SVERGUN, D. I.; BARBERATO, C.; KOCH, M. H. J. CRY SOL – a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. **Journal of Applied Crystallography**, v. 28, p. 768-773, 1995.

TAULIER, N.; CHALIKIAN, T. Characterization of pH-induced transitions of  $\beta$ -lactoglobulin: Ultrasonic, densimetric, and spectroscopic studies. **Journal of Molecular Biology**, v. 314, p. 873-889, 2001.

TIMASHEFF, S. N.; MESCANTI, L.; BASCH, J. J.; TOWNED, R. Conformational transitions of bovine  $\beta$ -lactoglobulins A, B and C. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 241, p. 2496-2501, 1966.

VALENTE-MESQUITA, V.; BOTELHO, M.; FERREIRA, S. Pressure-induced subunit dissociation and unfolding of dimeric  $\beta$ -lactoglobulin. **Biophysical Journal**, v. 75, p. 471-476, 1998.

VERHEUL, M.; PEDERSEN, J.; ROEFS, S.; de KRUIF, K. Association behavior of native  $\beta$ -lactoglobulin. **Biopolymers**, v. 49, p. 11-20, 1999.

VOISINE, R.; PARENT, G.; SAVOIE, L. Effect of gamma irradiation parameters on the In-vitro digestibility of  $\beta$ -lactoglobulin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 52, p. 221-230, 1990.

WALLACE, B. A. Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy as a tool for investigating protein structures. **Journal of Synchrotron Radiation**, v. 7, p. 285-295, 2000.

WANG, Q. W.; ALLEN, J. C.; SWAISGOOD, H. E. Binding of retinoids to  $\beta$ -lactoglobulin isolated by bioselective adsorption. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1047-1053, 1997.

WHITMORE, L.; WALLACE, B.A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 668-673, 2004.

WHO. High-dose irradiation: wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy. **WHO Technical Report Series 890**. Geneva Switzerland, 1999.

WITZ, J.; TIMASHEFF, S. N.; LUZZATI, V. Molecular interactions in  $\beta$ -lactoglobulin. VIII. Small-angle X-ray scattering investigation of the geometry of  $\beta$ -lactoglobulin. A tetramerization. **Journal of American Chemical Society**, v. 86, p. 168-173, 1964.

WONG, D.; CAMIRAND, W.; PAVLATH, A. Structures and functionalities of milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 36, p. 807-844, 1996.

WU, S. Y.; PÉREZ, M. D.; PUYOL, P.; SAWYER, L.  $\beta$ -lactoglobulin binds palmitate within its central cavity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 170-174, 1999.

YAMAMOTO, O. Effect of radiation on protein stability. In: **Stability of protein pharmaceuticals**, Part A: Chemical and physical pathways of protein degradation. New York: Plenum Press, 1992. Cap.12, p. 361-421.

YANG, J. T.; WU, C-S, C.; MARTINEZ, H. M. Calculation of protein conformation from circular dichroism. **Methods in Enzymology**, v. 130, p. 208-269, 1986.

YANG, J; DUNKER, K.; POWERS, J; CLARK, S.; SWANSON, G.  $\beta$ -lactoglobulin molten globule induced by high pressure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3236-3243, 2001.

YU, H.; COLUCCI, W. J.; McLAUGHLIN, M. L.; BARKLEY, M. D. Fluorescent quenching in indoles by excited state proton transfer. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, p. 8449-8454, 1992.

ZAKS, A. Protein–water interactions. In: **Stability of protein pharmaceuticals**. Part A: Chemical and physical pathways of protein degradation. New York: Plenum Press, 1992. Cap. 9, p. 249-271.

ZSILA, F. A new ligand for an old lipocalin: induced circular dichroism spectra reveal binding of bilirubin to bovine  $\beta$ -lactoglobulin. **Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters**. v., 539, p. 85-90, 2003.

ZSILA, F.; BIKÁDI, Z.; SIMONYI, M. Retinoic acid binding properties of the lipocalin member  $\beta$ -lactoglobulin studied by circular dichroism, electronic absorption spectroscopy and molecular modeling methods. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, p. 1651-1660, 2002.