

IMPACTO DO TRATAMENTO COM LUZ UV-C EM PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE EM MEIO DE SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO

Pedro Costa Ferreira

Keila Nascimento Cavalcante

Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso

Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo

pcf03@usp.br

Objetivos

O presente estudo tem como objetivo avaliar o impacto do processamento não térmico com irradiação UV-C na estrutura da β -Lactoglobulina (BLG) solubilizada em um solvente convencional, a solução tampão fosfato (PBS), versus um solvente eutético profundo (DES), visando a geração de peptídeos bioativos distintos. Ademais, há interesse em caracterizar as alterações nas estruturas secundária e terciária. Por fim, busca-se correlacionar tais modificações estruturais com a susceptibilidade da BLG à proteólise por tripsina e avaliar o perfil peptídico resultante nos diferentes meios.

Métodos e Procedimentos

Foram preparadas soluções da proteína BLG (Sigma-Aldrich) a $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ em dois meios distintos: PBS (0,01 M, pH 7,4) e em DES, composto por cloreto de colina e glicerina (1:2, m/m), preparado em solução aquosa com 40% de PBS (v/v). Para cada meio, foram separadas alíquotas e irradiadas com luz UV-C ($266 \pm 4 \text{ nm}$) por 2 horas a $25 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Desta forma, as análises foram feitas em quatro condições experimentais: a BLG em PBS não irradiada (PBS NI) e irradiada (PBS I), e em DES não irradiada (DES NI) e irradiada (DES I). O teor de tióis livres das soluções foi determinado por espectrofotometria de absorção UV-Visível (Multiskan GO), seguindo o método de

ELLMAN, 1959. As alterações conformacionais como estruturas secundárias foram analisadas com auxílio da espectroscopia de dicroísmo circular no UV próximo (CD, Jasco J-815) e a deconvolução dos dados foi realizada pelo software CDNN. A hidrofobicidade da superfície da proteína foi estudada por espectroscopia de fluorescência utilizando a sonda fluorescente 2-propionil-6-dimetil-amino-naftaleno (PRODAN), as análises foram realizadas em um espectrofluorímetro Hitachi F-4500 ($\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$) e o índice de hidrofobicidade foi determinando seguindo o método validado por CHORHIRANKUL et al., 2024. A susceptibilidade à proteólise foi avaliada por digestão *in vitro* com tripsina (1:20 enzima:proteína, m/m) a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e pH 7,8. Foram coletadas alíquotas em diferentes tempos (0, 30, 60, 90 e 120 min), com a reação interrompida por ácido fórmico 3% (v/v) e banho em nitrogênio líquido. O avanço da digestão e o perfil peptídico foram analisados por cromatografia líquida (LC-HRMS) acoplada a um espectrômetro de massas do tipo qTOF (Bruker Impact II) com coluna C18 (Aeris Peptide XB-C18, Phenomenex).

Resultados

A partir da deconvolução dos dados do CD foi possível obter as proporções de estruturas secundárias contida nas proteínas de cada solução.

Tabela 1: Estrutura secundária da BLG em CD UV próximo.

ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS	PBS NI (%)	PBS I (%)	DES NI (%)	DES I (%)
RANDÔMICAS	47,5	44,6	43,3	44,8
β-FOLHA	32,3	29,7	26,7	28,4
β-VOLTA	20,9	20,3	19,4	19,6
α-HÉLICE	16,7	18,6	21,2	19,7

Os resultados da Tabela 1 revelaram a preservação geral de suas estruturas, com ligeiras alterações após os tratamentos. Em termos de caracterização de estrutura terciária foi avaliado o índice de hidrofobicidade da superfície da proteína (S_0), pois indica o grau de exposição de aminoácidos que implica no nível de desdobramento proteico. A fim de entender a possível quebra de ponte de dissulfeto pela irradiação, foi determinado o teor de tióis livres da proteína.

Tabela 2: Índice de hidrofobicidade (S_0) e teor de tióis livres (SH).

SOLUÇÃO	S_0	TIÓIS LIVRES ($10^{-4} \text{ MOL} \cdot \text{L}^{-1}$)
PBS NI	3282 ± 178	3,94 ± 0,94
PBS I	2031 ± 224	9,8 ± 0,3
DES NI	746 ± 43	4,31 ± 0,12
DES I	359,1 ± 8,6	6,42 ± 0,21

Observa-se o aumento no teor de tióis livres, após a irradiação, para ambos os meios (PBS e DES), sugerindo a quebra das pontes dissulfeto que indica maior exposição dos triptofanos das proteínas irradiadas. A hidrofobicidade de superfície diminuiu em todas as condições tratadas, principalmente com a troca de solvente, indicando uma conformação mais compacta para o DES, como afirmado por SANCHEZ-FERNANDEZ; JACKSON, 2021. No ensaio de digestão por tripsina, a otimização do método foi eficiente para uma quantificação da BLG não digerida em todos os tempos de hidrólise e foram avaliadas as principais variantes: BLG-A e a BLG-B.

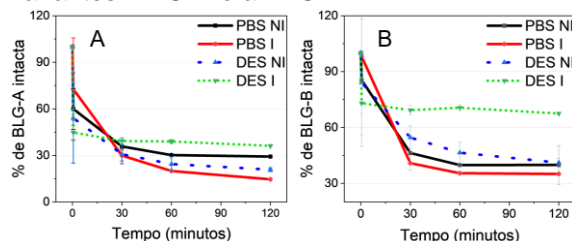


Figura 1: Cinética em escala relativa da proteólise das variantes A (A) e B (B) da β-lactoglobulina (BLG).

Para amostras em PBS, a irradiação UV-C acelerou a degradação proteolítica da BLG, um resultado consistente com uma estrutura conformacional mais disponível induzida por estresse físico, conforme observado por CAVALCANTE et al., 2023. Em contrapartida, foi observado um efeito mais inibidor para as amostras em DES, em que a irradiação retardou a proteólise, com destaque para a variante BLG-B na condição DES I, que se mostrou mais resistente à digestão enzimática ao longo de todo ensaio. Este comportamento inverso pode indicar um estado conformacional que protege os sítios de clivagem da ação da tripsina (arginina e lisina).

Conclusões

O DES promoveu uma conformação mais compacta que limitou o acesso da enzima aos sítios de clivagem, justificando a resistência à proteólise. A irradiação neste meio acentuou o efeito inibidor, corroborado pelo menor S_0 aferido na condição DES I. Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Agradecimentos

À bolsa de iniciação científica concedida pela CNPq nº 127633/2024-3.

Referências

- CAVALCANTE, Keila N. et al. Impact of UV-C pretreatment on β-lactoglobulin hydrolysis by trypsin: Production and bioavailability of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, v. 142, p. 105650, 1 jul. 2023.
- CHORHIRANKUL, Nattawan et al. Evaluating and Validating the Fluorescent Probe Methodology for Measuring the Effective Hydrophobicity of Protein, Protein Hydrolyzate, and Amino Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 72, p. 16, 11 dez. 2024.
- ELLMAN, George L. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 82, n. 1, p. 70–77, 1 maio 1959.
- SANCHEZ-FERNANDEZ, Adrian; JACKSON, Andrew J. Proteins in deep eutectic solvents: Structure, dynamics and interactions with the solvent. *Advances in Botanical Research*, v. 97, p. 69–94, 1 jan. 2021.