

Avaliação da interação da tetraciclina com ovalbumina *in natura* empregando técnicas espectroscópicas e eletroforese.

M^a Dayanne de Araújo Dantas (PG)^{1,*}, Humberto de A. Tenório (PG)¹, Hugo J.V. Pereira (PQ)¹, Anita J. Marsaioli (PQ)², Isis M. Figueiredo (PQ)¹ e Josué C.C. Santos (PQ)¹. E-mail: *dayanneqmc@gmail.com

¹IQB – Universidade Federal de Alagoas, Maceió – AL, ²IQ–UNICAMP, Campinas – SP.

Palavras Chave: tetraciclina, ovalbumina, fluorescência, RMN ¹H, eletroforese.

Introdução

A ovalbumina (OVA) é a proteína majoritária da clara do ovo, sendo amplamente utilizada na alimentação, principalmente na suplementação nutricional e composição de diferentes alimentos.¹ As tetraciclinas são uma classe de antibióticos de amplo espectro empregado na criação de animais e produção de aves. No entanto, o seu uso abundante e indiscriminado pode resultar na presença de resíduos no ovo, causando efeitos tóxicos, além da possibilidade de reações alérgicas.² Assim, o objetivo do presente trabalho foi estudar a interação da OVA com tetraciclina simulando condições *in natura*, empregando fluorescência molecular, RMN de ¹H e eletroforese (SDS–PAGE).

Resultados e Discussão

Os estudos de interação entre a tetraciclina e OVA foram realizados nos seguintes valores de pH: 1,5 (simulando as condições do estômago); 4,7 (ponto isoeletrônico da OVA) e 7,4 (simulando as condições da clara do ovo). Para os estudos empregando titulação por fluorescência molecular a concentração da OVA foi fixada em 0,5 μmol L⁻¹, enquanto variou-se o excesso de tetraciclina até 20 vezes em relação à concentração inicial de OVA. A partir dos dados obtidos foram calculadas as constantes de Stern–Volmer (processo de *quenching*), ligação e aparente (considerando os grupos fluorescentes efetivos da proteína), e por fim, o número de sítios de ligação (*n*) entre a tetraciclina e OVA em diferentes condições de pH. A Tabela 1 apresenta os valores para as constantes calculadas. De acordo com os dados obtidos a OVA apresentou maior interação simulando as condições estomacais, enquanto que para o ponto isoeletrônico e pH do alimento os valores foram similares. O número de sítios de ligação em todas as condições foi próximo à unidade.

Tabela 1. Dados calculados para as constantes de Stern–Volmer (*K_{SV}*), ligação (*K_b*) e aparente (*K_A*).

pH	Constantes (x10 ⁴ M ⁻¹)			<i>n</i>
	<i>K_{SV}</i>	<i>K_b</i>	<i>K_A</i>	
1,5	2,51 ± 0,08	9,33 ± 0,44	9,23 ± 0,08	1,30 ± 0,08
4,7	3,60 ± 0,10	6,61 ± 0,32	1,45 ± 0,11	1,06 ± 0,05
7,4	3,40 ± 0,11	1,35 ± 0,18	1,13 ± 0,03	0,95 ± 0,03

O estudo empregando RMN de ¹H evidenciou a interação da OVA com a tetraciclina, possibilitando inferir sobre a região da molécula que interage com a proteína. Foi observado alargamento dos sinais na presença da proteína. Contudo, somente os sinais dos grupos ligados aos carbonos 4 e 4a apresentaram deslocamento químico comprando os espectros (empregando TPSA como referência), apresentados na Fig.1 (para pH = 7,4).

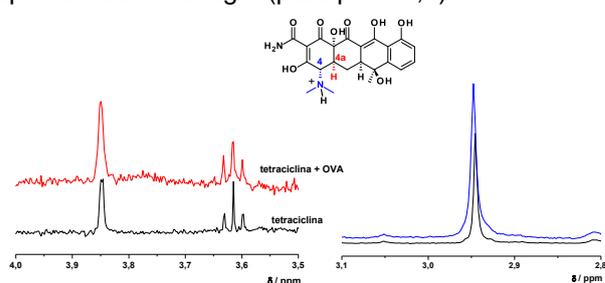


Figura 1. Espectro de RMN ¹H (400 MHz) da tetraciclina na presença e ausência de OVA. Espectro em vermelho relativo ao próton em C4a e em azul aos grupos metila ligados ao nitrogênio.

Pelo espectro de RMN ¹H da Fig. 1 foi observado deslocamento em 2,94 (Δδ = 0,02 ppm –N(CH₃)₂) e 3,84 ppm (Δδ = 0,01 ppm –H em 4a). Desta forma, esta parte da molécula que provavelmente apresenta maior interação com a OVA. Isto pode ser atribuído a interação eletrostática do grupo amino protonado (pK_a = 9,88) na molécula de tetraciclina com os resíduos de ácido aspártico e glutâmico dissociados em pH = 7,4 presentes na OVA. Adicionalmente, foram efetuados estudos empregando eletroforese (SDS–PAGE) com a proteína na forma nativa e reduzida na presença de excesso de tetraciclina. Foi observado para proteína nativa em pH 7,4 um deslocamento na banda proteica (indicando aumento de massa). Para as outras condições de pH e para o gel redutor este deslocamento não foi observado.

Conclusões

Foi possível avaliar a interação da tetraciclina com a OVA empregando fluorescência molecular, RMN de ¹H e eletroforese em diferentes condições de pH.

Agradecimentos

IQB-UFAL, CAPES, CNPq, FAPAL.

¹ Yan Lu, et al. *Journal of luminescence*. 2009, 129, 1048.

² Shalaby, A.R. *Food Chemistry*. 2011, 124, 1660.