

Evaluation of sulfonamides interaction with ovalbumin by molecular fluorescence simulating *in nature* conditions

Ana Carolina F. Lyra (PG), Isis M. Figueiredo (PQ) e Josué Carinhonha (PQ)*

e-mail: ana.lyra@iqb.ufal.br

Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas.

Palavras Chave: sulfonamidas, ovalbumina, química supramolecular, segurança alimentar, fluorescência molecular.

Abstract

Interaction process of sulfaquinoxaline and sulfadimethoxine with ovalbumin *in natura* conditions by molecular fluorescence.

Introdução

A ovalbumina (OVA) constitui a proteína majoritária da clara do ovo sendo utilizada na suplementação nutricional e composição alimentar.¹ As sulfonamidas (SFs) representam uma classe de antibióticos amplamente utilizados como medicamento veterinário para animais produtores de alimentos, como galinhas de granja. O uso indiscriminado pode resultar na presença de resíduos destes medicamentos nos alimentos, como os ovos.² Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a interação da OVA com a sulfaquinoxalina (SQ) e sulfadimetoxina (SD) (Fig. 1) simulando as condições *in natura* do alimento e empregando fluorescência molecular.

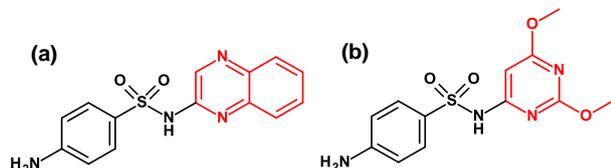


Fig. 1. Estrutura das sulfonamidas avaliadas, (a) SQ e (b) SD.

Resultados e Discussão

Nesse estudo foram empregadas a SQ e SD para a avaliação da interação com a OVA. Para isso, explorou-se a fluorescência intrínseca da proteína com $\lambda_{exc} = 280$ nm e $\lambda_{em} = 336$ nm na ausência e presença dos ligantes (SQ e SD). As titulações espectrofluorimétricas foram realizadas em pH 7,4 (tampão Tris 50 mM) na presença de NaCl (100 mM) empregando-se 2 μ M de OVA e concentrações das SFs na faixa de 2-200 μ M. Na avaliação da interação notou-se diminuição na fluorescência intrínseca da proteína à medida que os excessos das SFs foram adicionados, o que confirma o mecanismo de interação por transferência de energia (*quenching*) da OVA para as SFs. Os parâmetros de ligação e termodinâmicos associados a este processo são apresentados na Tabela 1. De acordo com a literatura, os valores das constantes de ligação (K_b) indicam que as interações apresentam força de caráter intermediário.³ Sendo que a SQ apresentou maiores valores de constante quando comparada a SD. Para ambas as SFs quanto maior a temperatura,

menores os valores de K_b , indicando que o mecanismo de *quenching* preferencial é estático, com formação de complexos supramoleculares não-fluorescentes.

Tabela 1: Parâmetros associados ao processo de interação.

SF	T (°C)	Parâmetros de ligação		Parâmetros termodinâmicos		
		K_{sv} (10^4L mol^{-1})	K_b (10^5L mol^{-1})	ΔG (kJ mol^{-1})	ΔH (kJ mol^{-1})	ΔS (J mol^{-1})
SQ	23	$1,30 \pm 0,04$	$5,76 \pm 0,18$	-32,92	-48,80	-53,66
	30	$1,24 \pm 0,04$	$5,12 \pm 0,19$	-32,54		
	37	$1,19 \pm 0,12$	$2,34 \pm 0,21$	-32,17		
SD	23	$1,06 \pm 0,08$	$4,35 \pm 0,17$	-32,41	-69,30	-125,99
	30	$0,99 \pm 0,06$	$3,98 \pm 0,22$	-31,53		
	37	$0,86 \pm 0,08$	$1,20 \pm 0,32$	-30,64		

Em relação aos parâmetros termodinâmicos, obteve-se valores negativos para ΔG , indicando processo de interação termodinamicamente espontâneo. Além disso, ΔH e ΔS também foram negativos sugerindo que as forças predominantes na interação são ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals. Por meio de fluorescência sincronizada foi possível inferir que a interação com a OVA expõe os resíduos de triptofano e tirosina aumentando a polaridade do microambiente destes aminoácidos. Através dos estudos por fluorescência 3D observou-se que houve redução na intensidade de fluorescência dos picos relativos a emissão dos resíduos de tirosina e triptofano, assim como, em relação a emissão associada a estrutura secundária da proteína, na presença das SFs. Este resultado indica que houve mudanças estruturais na estrutura nativa da proteína. Por fim, através de estudos baseados em FRET (*Föster resonance energy transfer*), foi possível calcular a distância intermolecular entre as SFs (aceptoras) e a OVA (doadora), as quais foram inferiores a 8 nm.

Conclusões

Os resultados obtidos indicam que houve interação entre as SFs e a OVA, sendo possível calcular os principais parâmetros associados a este processo, indicando que ocorreu alteração da estrutura nativa da proteína. Logo, a presença das SFs em alimentos apresenta-se com um risco a segurança alimentar.

Agradecimentos

Anita J. Marsaioli (IQ-UNICAMP), IQB-UFAL, FAPEAL, CAPES e CNPq.

¹Lu, Yan, et al. *Journal of luminescence*. 2009, 129, 1048. ²Silva, E., Souza, J. R., Caldas, E. *Química Nova*. 2013, 37, 111. ³Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Princípios de bioquímica*. 2014, 6ª ed. Artmed.