

# Thimerosal interaction evaluation with carrier protein simulating physiological conditions through spectroscopic techniques

João César N. Santos (PG)<sup>1</sup> e Josué Carinhanha C. Santos (PQ)<sup>1,\*</sup>

E-mail: [joacesarnascimento@hotmail.com](mailto:joacesarnascimento@hotmail.com)

<sup>1</sup>Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Campus A.C. Simões, Maceió, AL, Brasil.

Palavras Chave: thimerosal, interação, proteína carreadora, BSA, mercúrio, técnicas espectrométricas.

## Abstract

Interaction studies of thimerosal a mercury compound and bovine serum albumin (BSA) exploring spectrometric techniques.

## Introdução

A BSA (albumina do soro bovino) é amplamente empregada em estudos de interação simulando processos (bio)químicos devido a sua similaridade com a HSA. O thimerosal (TM) (Fig. 1a) é um composto organomercural, utilizado em vacinas como conservante.<sup>1</sup> Entretanto, existem indícios que o TM esteja diretamente ligado a transtornos neurológicos pela possível formação de produtos tóxicos, como o etilmercúrio. Estes, quando presentes no organismo, podem acarretar a danos funcionais em relação às respostas biológicas.<sup>2</sup> Desta forma, é pertinente a avaliação da interação do TM simulando condições fisiológicas com proteínas carreadoras, como a BSA.

## Resultados e Discussão

As avaliações no processo de interação foram realizadas empregando tampão Tris 50 mM com NaCl 50 mM e pH ajustado para 7,4. A concentração da BSA foi fixada em 2  $\mu$ M, sendo titulada com incrementos de TM (2,5-80  $\mu$ M), observando a variação da fluorescência intrínseca da BSA ( $\lambda_{exc} = 280$  nm /  $\lambda_{exc} = 341$  nm). A interação entre BSA e TM pôde ser observada através do decaimento do sinal de fluorescência na presença de incrementos do ligante (Fig. 1b) simulando condições fisiológicas.

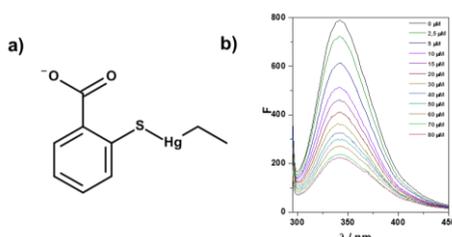


Fig. 1. a) Estrutura química do thimerosal. b) Perfil espectral do decaimento de fluorescência da BSA com adições de TM.

Estudos por UV-vis também evidenciaram a formação do complexo supramolecular BSA-TM em função do efeito hipercrômico. A influência da força iônica no sistema (0 a 150 mM em NaCl) foi avaliada, e os valores de constante de ligação ( $K_b$ ) entre BSA e TM não apresentaram diferença significativa (para 95% de confiança). Além disto, se verificou que não houve variações no sinal da 39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química: Criar e Empreender

proteína na presença de TM até 1 h de reação. Com base na Tabela 1 pôde-se inferir que a partir do valor de  $K_b$  o complexo BSA-TM apresenta uma interação fraca.<sup>3</sup> Os valores relativos as constantes de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) estão relacionados a supressão da fluorescência. Como os valores de  $K_{SV}$  e  $K_b$  foram inversamente proporcionais ao aumento da temperatura, o mecanismo preferencial de *quenching* foi estático com formação de complexo não fluorescente. Com base nos parâmetros calculados o processo foi espontâneo ( $\Delta G$  negativo), com interação preferencialmente eletrostática ( $\Delta H < 0$  e  $\Delta S > 0$ ). Este resultado corrobora com a espécie derivada da dissociação de TM ( $pK_a = 3,04$ ) em pH 7,4 (Fig. 1a).

Tabela 1. Parâmetros de ligação e termodinâmicos.

T (°C)	$K_{SV}$ ( $10^4$ L mol <sup>-1</sup> )	$K_b$ ( $10^3$ L mol <sup>-1</sup> )	r	$\Delta G$ (KJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H$ (KJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (J mol <sup>-1</sup> )
22	2,63 ± 0,01	3,60 ± 0,01	0,992	-9,56		
30	2,56 ± 0,01	2,82 ± 0,02	0,992	-9,82	-16,13	+32,36
38	2,52 ± 0,01	2,57 ± 0,02	0,993	-10,08		

Utilizando varfarina (marcador do sítio I) e ibuprofeno (marcador do sítio II) não foi possível inferir sobre o sítio preferencial de ligação do TM na BSA. Possivelmente, este resultado tem relação com interação do TM com o resíduo de cisteína livre (Cys34) no subdomínio IB. A partir dos estudos por FRET, verificou-se que a distância intermolecular entre o TM e BSA foi menor que 8 nm. Aplicando-se fluorescência sincronizada, o  $K_{SV}$  para o resíduo de triptofano ( $\Delta\lambda = 60$  nm) foi 4 vezes maior quando comparado a tirosina ( $\Delta\lambda = 15$  nm) indicando alteração da polaridade no microambiente deste aminoácido. Estes estudos foram concordantes com o de fluorescência 3D. Foram avaliadas 11 espécies competidoras no processo de interação BSA-TM. O Fe(II) (aumentou  $K_b$ ) e Cu(II) (diminui  $K_b$ ) foram os íons mais influentes. Por fim, por dicroísmo circular foi observado variação negativa na proporção do percentual de  $\alpha$ -hélice da BSA na presença de TM.

## Conclusões

A interação entre BSA-TM foi fraca e regida por forças eletrostáticas. Conduto, capaz de conduzir a alterações na estrutura da BSA. Os íons Fe(II) e Cu(II) foram os competidores mais efetivos.

## Agradecimentos

IQB-UFAL, CNPq e CAPES.

<sup>1</sup> Trumpler, S. et al. *Metallomics*, 2008, 1, 87-91 / <sup>2</sup> Geier, D. A., et. Al. *Clinica Chimica Acta*. 2015, 213, 212-220 / <sup>3</sup> Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Princípios de bioquímica*. 2014, 6ª ed. Artmed.