

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
E BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA OVALBUMINA, PRINCIPAL ALÉRGENO NATURAL
DA CLARA DO OVO, COM SULFONAMIDAS ATRAVÉS DE ESTUDOS
ESPECTROSCÓPICOS E DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

ANA CAROLINA FRADIQUE DE LYRA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões

Tabuleiro dos Martins

57072-970 - Maceió - AL

ANA CAROLINA FRADIQUE DE LYRA

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA OVALBUMINA, PRINCIPAL ALÉRGENO NATURAL
DA CLARA DO OVO, COM SULFONAMIDAS ATRAVÉS DE ESTUDOS
ESPECTROSCÓPICOS E DE ATIVIDADE BIOLÓGICA**

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de pós-graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos

Coorientador: Prof^a. Dra. Isis Martins Figueiredo

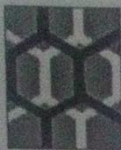
Maceió – AL
2017

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

- L768a Lyra, Ana Carolina Fradique de.
Avaliação da interação da ovalbumina, principal alérgeno natural da clara do ovo, com sulfonamidas através de estudos espectroscópicos e de atividade biológica / Ana Carolina Fradique de Lyra. – 2017.
83 f. : il.
- Orientador: Josué Carinhanha Caldas Santos.
Coorientador: Isis Martins Figueiredo.
Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia, Maceió, 2017.
- Bibliografia: f. 68-75.
Apêndices: f. 76-83.
1. Ovalbumina. 2. Sulfonamidas. 3. Atividade microbiana. 4. Espectroscopia. I. Título.

CDU: 543.645.6/.7



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA

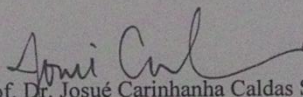


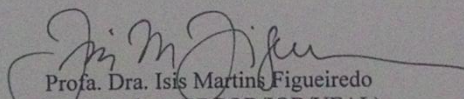
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone/Fax: (82) 3214-1144
email: ppgqb.ufal@gmail.com

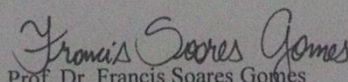
FOLHA DE APROVAÇÃO

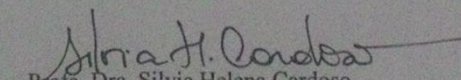
Membros da comissão julgadora da defesa de dissertação de mestrado de **Ana Carolina Fradique de Lyra**, intitulada: "AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA OVALBUMINA, PRINCIPAL ALÉRGENO NATURAL DA CLARA DO OVO, COM SULFONAMIDAS ATRAVÉS DE ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS E DE ATIVIDADE BIOLÓGICA", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 21 de julho de 2017, às 14h, na Sala de Aulas da Pós-Graduação do IQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA


Prof. Dr. Josué Carinhonha Caldas Santos
Orientador (PPGQB/IQB/UFAL)


Profa. Dra. Isis Martini Figueiredo
Coorientadora (PPGQB/IQB/UFAL)


Prof. Dr. Francis Soares Gomes
(PPGQB/IQB/UFAL)


Profa. Dra. Silvia Helena Cardoso
(Campus Arapiraca/UFAL)

Dedico este trabalho a minha irmã Arli Fradique e ao meu noivo Felipe Duarte por serem minha maior fonte de amor, carinho e compreensão durante esta trajetória árdua, porém gratificante, da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a Deus, minha fortaleza de ontem, hoje e sempre. Aquele no qual permitiu o início, meio e fim de mais um ciclo da minha vida acadêmica. Antes o que era sonho, tornou-se realidade e sem Ti eu nada seria.

Agradeço imensamente a minha mãe Rosemary, avó Arli, avô Edvaldo (in memoriam), tia Nadeje e tio Guilhermino por todo o apoio de sempre e por me tornarem quem sou hoje. Sou e sempre serei grata a vocês por fazerem o possível e até mesmo o impossível para contribuir na minha formação pessoal e profissional. Vocês são minha base, essência e espelho!

A minha irmã Arli Fradique e ao meu noivo Felipe Duarte por me amarem tanto! Por todo o carinho, cuidado, atenção, paciência, compreensão... amo vocês! Obrigada por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos desse mestrado, me incentivando a não desistir. Por contribuírem tanto, de diferentes formas, para que o meu sonho, que eu sei que também é de vocês, fosse realizado. A você Felipe e aos seus pais, a minha eterna gratidão por fortalecerem a minha fé e me aproximar mais de Deus.

Aos meus primos Wellington e Robson (irmãos de coração), por cuidarem de mim, torcerem e ficarem felizes junto comigo pelas minhas conquistas.

Ao meu orientador, Josué Carinhonha, agradeço infinitamente por todo o aprendizado a mim transmitido. Por despertar em mim o amor pela ciência e me mostrar quais caminhos devo seguir para que eu me torne uma docente que faça a diferença. És inspiração! Admiro-o!

Aos meus colegas do LINQA por toda a ajuda, em especial agradeço ao João César pela amizade, companheirismo e disponibilidade em me ajudar em todos os momentos que precisei dentro e fora do laboratório. Agradeço a Marina Magalhães, Isabella Miranda e Maria de Fátima pelas conversas e conselhos compartilhados, por me ajudarem quando precisei de cada uma de vocês. Agradeço também ao Guimarães pela tradução do resumo e por juntamente com Allysson, Elysson e Jaelson deixarem os meus dias no lab mais descontraídos com as vossas resenhas e “besteiras” kkkkkkk.

As minhas amigas-irmãs do PLI, Maria Célia e Larissa Cavalcante, pela força, companheirismo e entusiasmo para seguir sempre em frente; que o fortalecimento mútuo para vencer todos os obstáculos que apareceram e ainda vão aparecer no caminho de cada uma de nós prevaleça. Feliz pelo o que estamos nos tornando!

A prof^a Dr^a Isis Martins por realizar os ensaios de RMN ¹H, ajudar na interpretação dos resultados, pela experiência ímpar do estágio à docência e por estar sempre disponível para sanar quaisquer dúvidas.

A prof^a Dr^a Ana Maria Queijeiro e a Dr^a Amanda Lys por toda a paciência para ensinar-me a realizar os ensaios antimicrobianos, por me ajudar na interpretação dos resultados e pela contribuição científica. Não posso esquecer da Elane, Jéssica e Everton que me auxiliaram no laboratório sempre que eu precisei da ajuda deles.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas – FAPEAL, ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento – CNPq e à Coordenação de Aperfeiçoamen de Pessoal de Nível Superior- CAPES pelo apoio financeiro.

“Vinde a mim, todos os que estais cansados e oprimidos, e eu vos aliviarei. Tomai sobre vós o meu jugo, e aprendei de mim, que sou manso e humilde de coração; e encontrareis descanso para as vossas almas. Porque o meu jugo é suave e o meu fardo é leve.”

Mateus 11.28-30

RESUMO

A interação da ovalbumina (OVA) com quatro sulfonamidas, nomeadamente sulfatiazol (S1), sulfaquinoxalina (S2), sulfadimetoxina (S3) e sulfametazina (S4) foi investigada empregando técnicas espectroscópicas (fluorescência molecular, UV-vis e RMN ^1H) simulando as condições *in natura* do ovo. Para o estudo de interação, explorou-se a fluorescência intrínseca da proteína ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}} = 336 \text{ nm}$) na ausência e presença dos ligantes (SFs). As titulações espectrofluorimétricas da OVA (2 μM) com os diferentes ligantes (0-200 μM) foram realizadas em pH 7,4 (tampão Tris 50 mM, NaCl 100 mM). Na avaliação do processo de interação notou-se diminuição na intensidade da emissão da fluorescência da OVA à medida que os excessos das SFs foram adicionados, devido ao processo de transferência de energia (*quenching*). Por meio destes resultados foi possível calcular a constante de Stern Volmer (K_{sv}), constante de ligação (K_{b}) e proporção estequiométrica (n). Os valores de K_{b} variaram de 3,98 a $27,4 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ (30 °C) e a partir destes dados observou-se que a magnitude da interação seguiu a seguinte ordem: S1 > S2 > S4 > S3. O número de sítios de ligação em todas as condições foi próximo à unidade. Para todas as SFs avaliadas o aumento da temperatura levou a diminuição dos valores de K_{sv} e K_{b} , indicando que o mecanismo de *quenching* preferencial é estático, com formação de complexos supramoleculares não-fluorescentes. Este resultado foi confirmado pelos estudos de UV-vis com formação do complexo no estado fundamental. Quanto aos parâmetros termodinâmicos, obteve-se $\Delta G < 0$ para todas as SFs avaliadas, indicando que a interação é termodinamicamente espontânea. Para S2 e S3, as forças predominantes na interação são ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals, enquanto que para S1 e S4 as forças preferenciais foram eletrostáticas. Através dos estudos por fluorescência 3D observou-se a redução na intensidade de fluorescência dos picos 2 e 3, relativos à emissão dos resíduos de tirosina e triptofano e emissão associada a estrutura secundária da proteína na presença das SFs, respectivamente. Este resultado indica que houve mudanças na estrutura nativa da proteína. 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 de estudos baseados em FRET (*Fluorescence resonance energy transfer*), foi possível calcular a distância intermolecular entre as SFs (receptoras de energia) e a OVA (doadora de energia), as quais foram inferiores a 10 nm. Os estudos de competição com a sonda ANS que monitora regiões hidrofóbicas da proteína indicaram que S2 foi a única sulfa capaz de deslocar este marcador. Já com os íons metálicos, observa-se que Ca(II), Mg(II) e Fe (III) favorecem a interação das sulfonamidas (S1 e S2) com a OVA. A partir dos estudos por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) verificou-se deslocamento dos sinais para os hidrogênios aromáticos presentes em S2 e S3. Além disto, foi verificado que a ovalbumina *in natura* (obtida da clara do ovo) interage com as SFs em maior magnitude quando comparado com a OVA comercial. Por meio de estudos biológicos constatou-se que a *E. Coli* e *B. megaterium* são sensíveis as sulfonamidas testadas e que os valores de MIC destes antibióticos na ausência e presença da OVA não diferem. Dessa forma, os resultados obtidos indicam que houve interação entre as SFs e a macromolécula e, conseqüentemente, mudanças conformacionais na estrutura da proteína foram identificadas. Logo, a presença das SFs em alimentos pode apresentar um risco a segurança alimentar, pois uma vez que há mudança conformacional na cadeia polipeptídica da OVA, esta pode comportar-se como um corpo estranho no organismo e causar/potencializar reações alérgicas.

Palavras-chaves: ovalbumina, sulfonamidas, técnicas espectroscópicas, atividade microbiana.

ABSTRACT

The interaction between ovalbumin (OVA) and four sulphonamides named sulfathiazole (S1), sulfaquinoxaline (S2), sulfadimethoxine (S3) and sulfamethazine (S4) was investigated employing spectroscopic techniques (molecular fluorescence, UV-Vis and ^1H NMR) emulating *in natura* egg conditions. For the interaction study, the intrinsic fluorescence of the protein ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} = 336 \text{ nm}$) was explored in the ligand's presence and absence (SFs). The OVA spectrometric titrations ($2 \mu\text{M}$) with different ligands ($0\text{--}200 \mu\text{M}$) were performed in pH 7.4 (Tris-HCl buffer solution 50 mM , NaCl 100 mM). For the evaluation of the interaction process, it was noticed a decrease in the OVA fluorescent emission as SFs excess was added, due to an energy transfer process (quenching). By using these data, the Stern Volmer constant (K_{sv}), binding constant (K_{b}) and stoichiometric ratio (n) were calculated. The K_{b} values ranged from 3.98 to $27.4 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ ($30 \text{ }^\circ\text{C}$) and by applying these information, it was observed that the interaction magnitude followed the order: $\text{S3} < \text{S4} < \text{S2} < \text{S1}$. The number of binding sites in every condition applied was close to one. For all SFs evaluated the increase in temperature lead to a decrease in both K_{sv} and K_{b} values, indicating that the static quenching mechanism is preferable, with the formation of a non-fluorescent molecular complexes. This result was further confirmed by UV-Vis studies with formation of a fundamental state complex. According to thermodynamic parameters, $\Delta G < 0$ was obtained for all SFs evaluated, indicating that the interaction is thermodynamically spontaneous. For S2 and S3, the main forces acting in the interaction are hydrogen bonds and Van der Waals forces, whereas S1 and S4 have electrostatic forces, predominantly. Through 3D fluorescence studies, it was observed a decrease in the fluorescence intensity of peak 2 and 3, which is related to the tyrosine and tryptophan residue emissions associated with the protein secondary structure in the presence of SFs, respectively. This result indicates that there were conformational changes in the protein native structure. By using synchronized fluorescence, it was possible to deduce that the interaction with OVA exposes the tyrosine and tryptophan residues, increasing the polarity of the micro-environment of those amino acids. Through studies based on FRET (*Fluorescence resonance energy transfer*), it was possible to calculate the intermolecular distance between the SFs (energy acceptors) and OVA (energy donor), which were smaller than 10 nm . The competition assay with ANS probe, which control the protein hydrophobic regions, indicates that only S2 was capable to shift this marker. Metallic ions were also evaluated and it was observed that Ca(II), Mg(II) and Fe(III) can facilitate the interaction between sulphonamides (S1 and S2) and OVA. The ^1H NMR studies showed a signal shift for aromatic hydrogens present in S2 and S3. *In natura* ovalbumin (from egg white) interacts more effectively with SFs than commercial ovalbumin. Biological studies have shown that *E. coli* and *B. megaterium* are sensitive to the sulfonamides tested and the MIC values of these antibiotics in the absence and presence of OVA do not present significant difference. This way, the results indicate that there was interaction between SFs and macromolecule and, thus, conformational changes in the protein structure were identified. So, the presence of SFs in aliments shows a risk to food security, since the OVA has its polypeptide chain modified and can act/treat as a foreigner and cause allergic reactions.

Keywords: Ovalbumin, sulphonamides, spectroscopic techniques, microbial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Química molecular versus Química supramolecular.	19
Figura 2- Formação do complexo supramolecular proteína-ligante através das ligações não-covalentes.	20
Figura 3- Espectro de absorção a) de uma proteína, b) de aminoácidos aromáticos (Triptofano – Trp, Tirosina – Tyr e Fenilalanina – Phe).	21
Figura 4- a) Diagrama de Jablonski; b) Emissão de fluorescência dos resíduos de aminoácidos aromáticos (Triptofano - Trp, Tirosina - Tyr e Fenilalanina - Phe).	23
Figura 5- Estrutura tridimensional da ovalbumina, com destaque para os três resíduos de triptofano.	25
Figura 6- Mecanismo de alergia mediada por IgE.	26
Figura 7- Estrutura química das sulfonamidas avaliadas na interação com ovalbumina: sulfatiazol (S1), sulfaquinoxalina (S2), sulfadimetoxina (S3) e sulfametazina (S4).	27
Figura 8- a) Perfil espectral da titulação espectrofluorimétrica da OVA (2 μ M) com sulfatiazol (S1), b) Linearização da equação de Stern-Volmer (gráfico interno – expansão da faixa de concentração com tendência linear em destaque com o retângulo), c) Linearização para cálculo da constante de ligação (K_b) e número de sítios de ligação (n). Condições: tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4 e 30°C.	36
Figura 9- Gráfico de Van't Hoff para calcular os parâmetros termodinâmicos. Condições: tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4.	41
Figura 10- a) Gráficos de distribuição de espécies das sulfonamidas em função do pH, b) Equilíbrio de dissociação das sulfonamidas (SF).	43
Figura 11- Espectros de absorção por UV-vis para os sistemas contendo a) Sulfatiazol (S1), b) Sulfaquinoxalina (S2), c) Sulfadimetoxina (S3) e d) Sulfametazina (S4). Condições: OVA (3 μ M), sulfonamidas (6 μ M), tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4 e 30°C.	46
Figura 12- Espectros de fluorescência tridimensional (3D) para a) OVA, b) OVA + S1. Condições: OVA (2 μ M), S1 (40 μ M), tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4 e 30°C.	48
Figura 13- a) Espectro de emissão sincronizado para os resíduos de tirosina ($\Delta\lambda = 15$ nm) e triptofano ($\Delta\lambda = 60$ nm) da OVA livre. Titulação empregando fluorescência sincronizada para o resíduo de b) tirosina e o resíduo de c) triptofano com adição de S1.	

Condições: OVA (2 μ M), S1 (0 - 200 μ M), tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4 e 30°C.....	50
Figura 14- Sobreposição espectral da emissão de fluorescência da OVA com o espectro de absorção de a) S1, b) S2, c) S3 e d) S4. Condições: OVA (2 μ M), sulfonamidas (10 μ M), tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4 e 30°C.....	52
Figura 15- a) Estrutura química do ANS, b) Intensidade de fluorescência do ANS na ausência e na presença da OVA, c) Intensidade de fluorescência do sistema ANS-OVA na presença de diferentes concentrações das sulfonamidas avaliadas. Condições: OVA (2 μ M), ANS (4 μ M) sulfonamidas (0 - 200 μ M), tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4 e 30°C.....	54
Figura 16- Efeito da presença de íons metálicos no processo de interação entre a OVA e as sulfonamidas. Condições: Proteína e competidores (2 μ M), sulfonamidas (0 - 200 μ M), tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4 e 30°C.....	56
Figura 17- Comparação das constantes de ligação (K_b) do processo de interação das sulfonamidas com a OVA comercial e <i>in natura</i> . Condições: OVA comercial e <i>in natura</i> (2 μ M), sulfonamidas (0-200 μ M), tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4 e 30°C.....	57
Figura 18- Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz) da sulfaquinoxalina (S2) na ausência e na presença de diferentes concentrações da ovalbumina (OVA). Condições: S2:OVA (1:25, 1:50 e 1:100), S2 (1 mM) em 10% (v/v) de DMSO- d_6 em tampão fosfato 10 mM com D $_2$ O a pH 7,4.....	58
Figura 19- Aspecto de antibiograma contra <i>Escherichia coli</i> . a) Ofloxacino 5 μ g (disco 1), DMSO (disco 2, 40 μ L), sulfonamidas 1-4 (discos 3-6, 40 μ L= 100 ou 50 μ g), tampão (disco 7, 40 μ L); b) Ofloxacino 5 μ g (disco 1), DMSO (disco 2, 40 μ L), interação das sulfonamidas 1-4 com OVA (discos 3-6, 40 μ L= 50 ou 25 μ g), tampão (disco 7, 40 μ L), e OVA (disco 8, 40 μ L= 100 μ g).	63
Figura 20- Aspecto de antibiograma contra <i>Bacillus megaterium</i> . a) Ofloxacino 5 μ g (disco 1), DMSO (disco 2, 40 μ L), sulfonamidas 1-4 (discos 3-6, 40 μ L = 100 ou 50 μ g), tampão (disco 7, 40 μ L); b) Ofloxacino 5 μ g (disco 1), DMSO (disco 2, 40 μ L), interação das sulfonamidas 1-4 com OVA (discos 3-6, 40 μ L= 50 ou 25 μ g), tampão (disco 7, 40 μ L), e OVA (disco 8, 40 μ L = 100 μ g).	63
Figura 21- Aspecto de antibiograma contra <i>Escherichia coli</i> . Ofloxacina 5 μ g (disco 1), DMSO (disco 2), tampão (disco 3), OVA (disco 4), OVA-S1 (disco 5), S1 (disco 6),	

com dosagem de S1 iguais a: a) 50 µg; b) 25 µg; c) 2,5 µg; d) 1,0 µg; e) 0,5 µg; f) 0,25 µg e g) 0,125 µg. A numeração dos discos de todas as placas segue o padrão do item “a”.....	65
Figura 22- Aspecto de antibiograma contra <i>Bacillus megaterium</i> . Ofloxacino 5 µg (disco 1), DMSO (disco 2), tampão (disco 3), OVA (disco 4), OVA-S1 1 (disco 5), S1 (disco 6), com dosagem de S1 iguais a: a) 50 µg; b) 25 µg; c) 2,5 µg; d) 1,0 µg; e) 0,5 µg; f) 0,25 µg e g) 0,125 µg. A numeração dos discos de todas as placas segue o padrão do item “a”.....	66
Figura 23- Titulação espectrofluorimétrica da ovalbumina para os seguintes ligantes: a) Sulfaquinoxalina (S2), b) Sulfadimetoxina (S3) e c) Sulfametazina (S4). Condições: OVA (2 mM), sulfonamidas (0 - 200 µM), tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4 e 30°C.....	76
Figura 24- Espectros de fluorescência tridimensional para a) OVA, b) com adição de S2, c) com adição de S3, d) com adição de S4. Condições: OVA (2 µM), sulfonamidas (40 µM), tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4 e 30°C.....	77
Figura 25- Fluorescência sincronizada para o resíduo de tirosina ($\lambda = 15$ nm) com adição de incrementos de a) S2, b) S3 e c) S4 e para o resíduo de triptofano ($\lambda = 60$ nm) com adição de incrementos de d) S2, e) S3 e f) S4. Condições: OVA (2 µM), sulfonamidas (0 - 200 µM), tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4 e 30°C.	78
Figura 26- Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz) da sulfatiazol (S1) na ausência e na presença da ovalbumina (OVA). Condições: S1:OVA (1:25), S1 (1 mM) em 10% (v/v) de DMSO- d_6 em tampão fosfato 10 mM com D $_2$ O a pH 7,4.	79
Figura 27- Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz) da sulfadimetoxina (S3) na ausência e na presença da ovalbumina (OVA). Condições: S3:OVA (1:25), S3 (1 mM) em 10% (v/v) de DMSO- d_6 em tampão fosfato 10 mM com D $_2$ O a pH 7,4.	80
Figura 28- Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz) da sulfametazina (S4) na ausência e na presença da ovalbumina (OVA). Condições: S4:OVA (1:25), S4 (1 mM) em 10% (v/v) de DMSO- d_6 em tampão fosfato 10 mM com D $_2$ O a pH 7,4.	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Aminoácidos que constituem a cadeia polipeptídica da ovalbumina.....	24
Tabela 2- Parâmetros de ligação e termodinâmicos para a interação entre OVA e sulfonamidas em diferentes temperaturas. Condições: OVA (2 µM), sulfonamidas (0 - 200 µM), tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4.	38
Tabela 3- Comparação de valores de K_b de diferentes proteínas e sulfonamidas com o trabalho proposto.	39
Tabela 4- Comparação de valores de K_b de diferentes ligantes com a ovalbumina com o trabalho proposto.	39
Tabela 5- Valores de absorvância para as sulfonamidas avaliadas, OVA e complexos OVA-sulfonamidas. Condições: OVA (3 µM), sulfonamidas (6 µM), tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4 e 30°C.	45
Tabela 6- Parâmetros associados ao espectro de fluorescência tridimensional para a interação entre OVA e as sulfonamidas avaliadas. Condições: OVA (2 µM), S1 (40 µM), tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4 e 30°C.....	48
Tabela 7- Valores de K_{SV} relativos a titulação por fluorescência sincronizada entre OVA e as sulfonamidas avaliadas. Condições: OVA (2 µM), S1 (0 - 200 µM), tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4 e 30°C.....	50
Tabela 8- Parâmetros de FRET da interação entre as sulfonamidas e a OVA.	53
Tabela 9- Comparação de valores de r_0 obtidos em outros estudos com o trabalho proposto. Condições: OVA (2 µM), sulfonamidas (10 µM), tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4 e 30°C.....	53
Tabela 10- Deslocamento químico (δ) do RMN 1H (400 MHz) de S2 na ausência e presença de diferentes concentrações de OVA em tampão fosfato 10 mM em D_2O a pH 7,4.	59
Tabela 11- Média dos diâmetros dos halos de inibição (em mm) do crescimento das bactérias submetidas aos controles e às sulfonamidas e suas interações com OVA. Ofloxacino - OFX (5 µg); DMSO - dimetilsulfóxido; tampão - Tris-HCl (50 mM com NaCl 100 mM a pH 7,4); OVA em tampão (100 µg); S1, S2, S4 (100 µg); S3 (50 µg); interações OVA- S1, OVA-S2, OVA-S4 (50 µg) e OVA-S3 (25 µg).	62
Tabela 12- Média dos diâmetros dos halos de inibição (em mm) do crescimento de <i>E. coli</i> e <i>B. megaterium</i> submetidas aos controles e à sulfatiazol (S1) e suas interações com	

OVA. Ofloxacino - OFX (5 µg); DMSO; tampão (50 mM com NaCl 100 mM a pH 7,4); OVA em tampão (100 µg); sulfatiazol (S1) - 0,125-50 µg e interações OVA-S1.....	64
Tabela 13- Deslocamento químico (δ) do RMN ^1H (400 MHz) de S1 na ausência e presença da OVA em tampão fosfato 10 mM em D ₂ O a pH 7,4.....	79
Tabela 14- Deslocamento químico (δ) do RMN ^1H (400 MHz) de S3 na ausência e presença da OVA em tampão fosfato 10 mM em D ₂ O a pH 7,4.....	80
Tabela 15- Deslocamento químico (δ) do RMN ^1H (400 MHz) de S4 na ausência e presença da OVA em tampão fosfato 10 mM em D ₂ O a pH 7,4.....	81
Tabela 16- Média dos diâmetros dos halos de inibição (em mm) do crescimento de <i>E. coli</i> e <i>B. megaterium</i> submetidas aos controles e à sulfaquinoxalina (S2) e suas interações com OVA. Ofloxacino- OFX (5 µg); DMSO- dimetilsulfóxido; tampão - Tris-HCl (50 mM com NaCl 100 mM a pH 7,4); OVA- ovoalbumina em tampão (100 µg); sulfaquinoxalina (S2) -0,125-50 µg e interações OVA-S2.....	82
Tabela 17- Média dos diâmetros dos halos de inibição (em mm) do crescimento de <i>E. coli</i> e <i>B. megaterium</i> submetidas aos controles e à sulfadimetoxina (S3) e suas interações com OVA. Ofloxacino- OFX (5 µg); DMSO- dimetilsulfóxido; tampão - Tris-HCl (50 mM com NaCl 100 mM a pH 7,4); OVA- ovalbumina em tampão (100 µg); sulfadimetoxina (S3) -0,05-25 µg e interações OVA – S3.....	82
Tabela 18- Média dos diâmetros dos halos de inibição (em mm) do crescimento de <i>E. coli</i> e <i>B. megaterium</i> submetidas aos controles e à sulfametazina (S4) e suas interações com OVA. Ofloxacino- OFX (5 µg); DMSO- dimetilsulfóxido; tampão - Tris-HCl (50 mM com NaCl 100 mM a pH 7,4); OVA- ovoalbumina em tampão (100 µg); sulfametazina (S4) -0,125-50 µg e interações OVA – S4.	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – Absorvância

ANS – Ácido 8-anilino-1-naftaleno-sulfonato

BSA – Albumina do Soro Bovino

C_p – Concentração da proteína

CLSI – Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

D_2O – Água deuterada

F – Fluorescência

FRET – Transferência de energia por ressonância de fluorescência

F_0 – Fluorescência na ausência do ligante

HSA – Albumina do Soro Humano

IgE – Imunoglobulina E

K_b – Constante de ligação

K_{SV} – Constante de Stern-Volmer

KDa – Quilodalton

LMR – Limite Máximo de Referência

LogP – Coeficiente de partição

MHz – Megahertz

mM – Milimolar

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MIC – Concentração Inibitória Mínima

n – Número de sítios de ligação do complexo

nm – Nanometros

OVA – Ovalbumina

pH – Potencial hidrogeniônico

pI – Ponto isoeletrônico

pKa – Constante de dissociação

PABA – Ácido *p*-aminobenzóico

PNCRC – Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

[Q] – Concentração do ligante

R – Constante dos gases

RMN ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RNA – Ácido ribonucleico

SFs – Sulfonamidas

S1 – Sulfatiazol

S2 – Sulfaquinoxalina

S3 – Sulfadimetoxina

S4 – Sulfametazina

T – Temperatura

Tir – Tirosina

TMSP – Trimetilsililpropionato de sódio

Trp – Triptofano

UV – Ultravioleta

UV – vis – Ultravioleta no visível

ΔH – Entalpia

ΔS – Entropia

ΔG – Energia livre de Gibbs

μM – Micromolar

μL – Microlitros

3D – Tridimensional

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Química supramolecular e as interações proteína-ligante	19
1.2. Técnicas utilizadas para monitorar a formação do complexo supramolecular proteína-ligante	20
1.2.1. Espectroscopia de absorção por UV-vis	21
1.2.2. Fluorescência molecular	21
1.2.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H)	23
1.3. Ovalbumina – características gerais e potencial alergênico	23
1.4. Sulfonamidas – características gerais e potencial antimicrobiano	26
2. JUSTIFICATIVA	28
3. OBJETIVOS	29
3.1. Objetivo Geral	29
3.2. Objetivos Específicos	29
4. EXPERIMENTAL	30
4.1. Materiais e Soluções	30
4.2. Estudo por UV-vis	30
4.3. Estudos por fluorescência molecular	31
4.4. Estudo por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	32
4.5. Atividade biológica – Potencial antimicrobiano	32
4.5.1. Preparo e inoculação do meio de manutenção ágar nutriente (AN)	33
4.5.2. Ensaio antimicrobiano em meio Ágar Muller Hinton (AMH)	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1. Parâmetros de ligação e termodinâmicos	35
5.2. Estudos por espectroscopia de absorção molecular no UV-vis	44
5.3. Avaliação de mudanças conformacionais na ovalbumina	47
5.3.1. Fluorescência tridimensional (3D)	47
5.3.2. Fluorescência Sincronizada	49
5.4. Ensaio de transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET)	50
5.5. Estudo de competição: interação com a sonda ANS (ácido 8-anilino-1-naftaleno-sulfonato) e com íons metálicos	53
5.5.1. ANS	53
5.5.2. Competição com íons metálicos	55
5.6. Estudo de interação das sulfonamidas com a proteína comercial e <i>in natura</i>	56

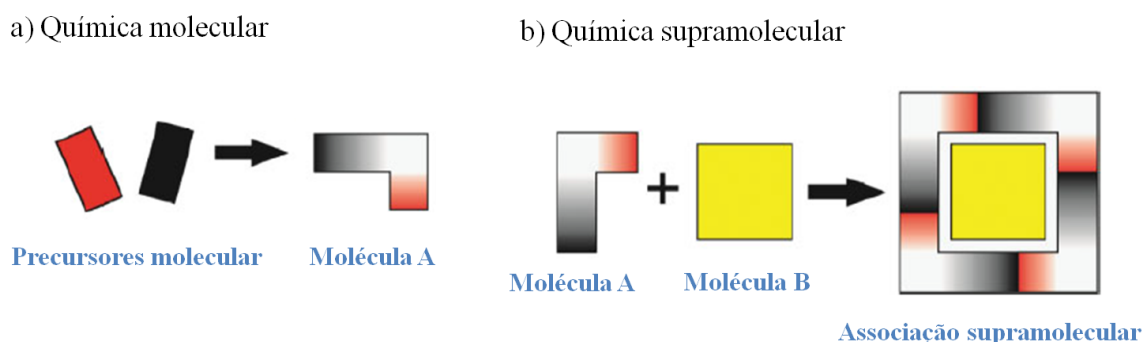
5.7.Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H).....	57
5.8.Atividade biológica – Potencial antimicrobiano	60
6. CONCLUSÃO.....	67
7. REFERÊNCIAS	68
APÊNDICE I.....	76
APÊNDICE II.....	77
APÊNDICE III	78
APÊNDICE IV	79
APÊNDICE V	80
APÊNDICE VI.....	81
APÊNDICE VII.....	82

1. INTRODUÇÃO

1.1. Química supramolecular e as interações proteína-ligante

Em oposição à química molecular que é baseada nas ligações covalentes, a química supramolecular, definida por Jean-Marie Lehn em 1969, é a química das interações intermoleculares de natureza não covalente e é responsável por constituir associações supramoleculares com diferentes graus de complexidade estabelecidas através de interações eletrostáticas, hidrofóbicas, forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio entre duas ou mais moléculas (Figura 1) (VARSHHEY et al., 2012).

Figura 1- Química molecular versus Química supramolecular.

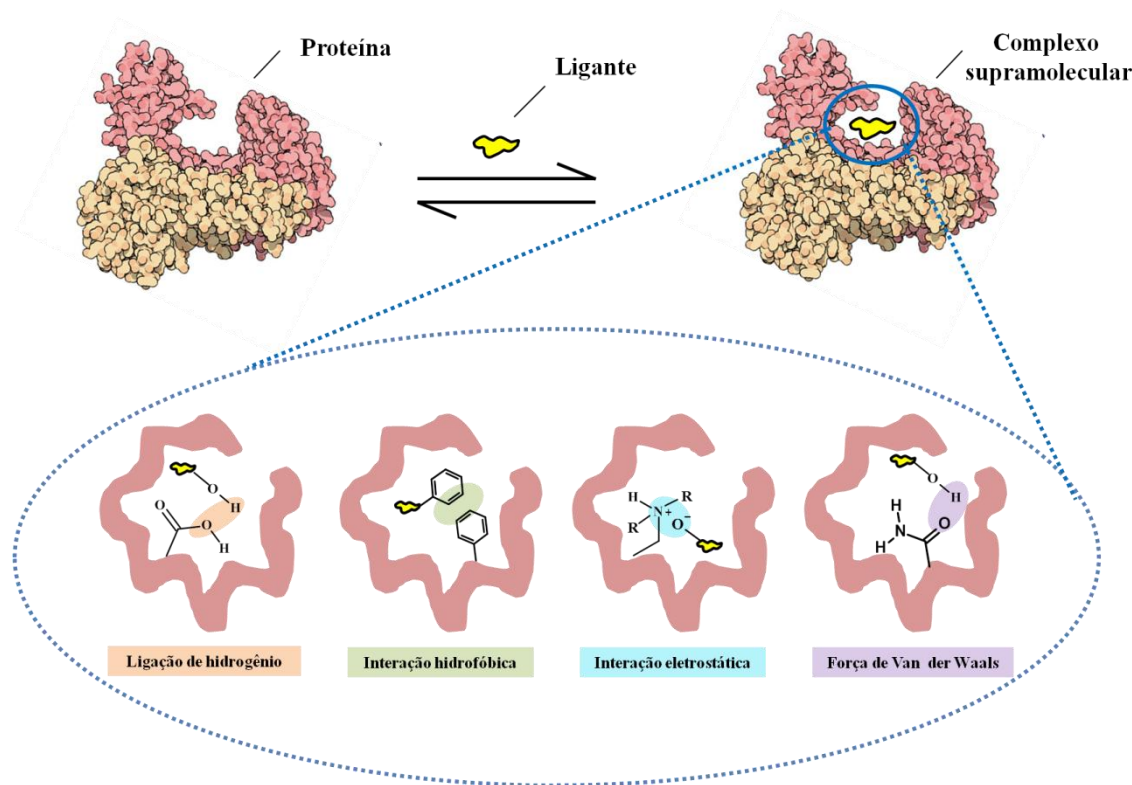


Por meio dos conceitos associados à química supramolecular é possível compreender vários processos biológicos, dentre eles o reconhecimento, mobilidade e auto-organização molecular, além das interações entre macromoléculas e ligantes de natureza variada, especificamente as interações proteína-ligante (LEHN, 1996), as quais são a base deste trabalho.

Sabe-se que as proteínas são macromoléculas que participam de muitos processos biológicos no organismo por apresentarem diferentes funções como, por exemplo, estrutural, reguladora, transportadora, de defesa, catálise, dentre outras. Entretanto, para que estas executem tais funções, precisam interagir com outro(s) componente(s), como outras proteínas, pequenas moléculas, íons ou ácidos nucleicos de forma que um complexo supramolecular proteína-ligante seja formado por meio de interações intermoleculares entre o ligante e uma região específica da proteína denominada de sítio de ligação (Figura 2) (WILLIAMS & DAVITER, 2013). Os complexos proteína-ligante formados durante os processos biológicos, de forma geral, são estáveis, pois possuem alto grau de afinidade e complementaridade e, sendo a resposta biológica, em alguns casos, está condicionada a alterações conformacionais da

cadeia polipeptídica da proteína após o processo de interação (HU & LI, 2014). Desse modo, é de suma importância estudos de interação proteína-ligante para compreender as mudanças funcionais e estruturais ocasionadas por estes processos.

Figura 2- Formação do complexo supramolecular proteína-ligante através das ligações não-covalentes.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

1.2. Técnicas utilizadas para monitorar a formação do complexo supramolecular proteína-ligante

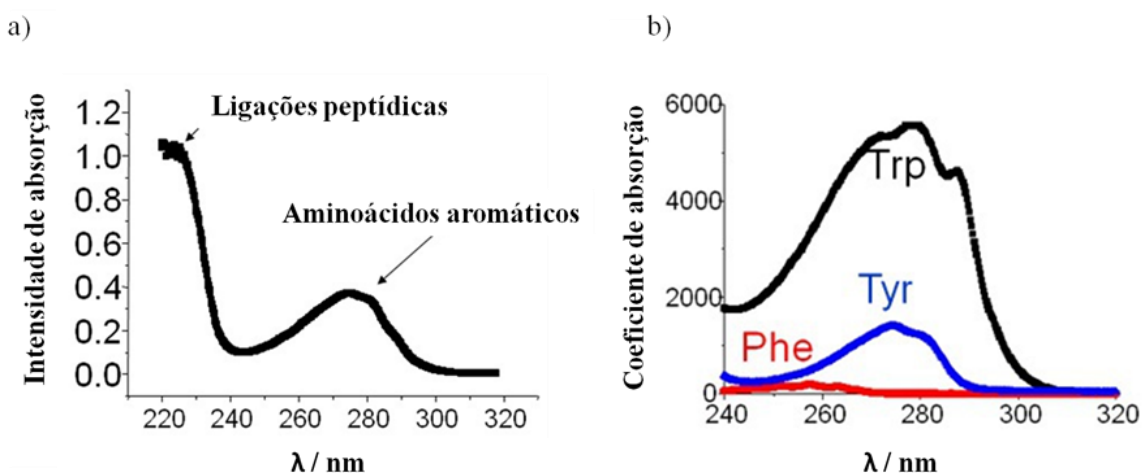
Por meio de diferentes técnicas é possível monitorar e investigar a formação de complexos supramoleculares proteína-ligante, tais como: dicroísmo circular (CD), ressonância magnética nuclear (RMN), fluorescência molecular, infravermelho (IR), espectroscopia de absorção por UV-vis, cromatografia líquida de alta performance (HPLC), eletroforese capilar, titulação calorimétrica isotérmica (ITC), microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (TEM), cristalografia, entre outras (WILLIAMS & DAVITER, 2013; CHENG et al., 2013).

Dentre elas, UV-vis, fluorescência molecular e RMN foram utilizadas neste trabalho para avaliar a interação entre a proteína ovalbumina (macromolécula) e diferentes sulfonamidas (ligantes) (DU et al., 2016).

1.2.1. Espectroscopia de absorção por UV-vis

Nos estudos de interações proteína-ligante a espectroscopia de absorção por UV-vis permite monitorar a formação do complexo supramolecular e alterações provenientes do processo de interação. Isto é possível porque as proteínas possuem duas bandas de absorção eletrônica características que podem sofrer alterações a depender do estado de oxidação, ligação e conformação de seus cromóforos, bem como devido as alterações conformacionais da sua cadeia polipeptídica. Tais bandas apresentam absorção aproximadamente em 220 nm, referente às ligações peptídicas entre os aminoácidos, e entre 230-300 nm, referentes às transições eletrônicas $\pi-\pi^*$ decorrentes dos aminoácidos aromáticos, como o triptofano que possui banda de absorção em 280 nm (Figura 3) (NIENHAUS & NIENHAUS, 2005). Dessa maneira, é possível identificar alterações estruturais da proteína na presença de ligantes por UV-vis a partir do aumento (efeito hiper-crômico) ou diminuição (efeito hipocrômico) da intensidade de absorção e/ou do deslocamento para o vermelho (efeito batocrômico) ou azul (hipsocrômico) das bandas de absorção (XING, 2013).

Figura 3- Espectro de absorção a) de uma proteína, b) de aminoácidos aromáticos (Triptofano – Trp, Tirosina – Tyr e Fenilalanina – Phe).



Fonte: adaptado de Hegyi et al., 2013.

1.2.2. Fluorescência molecular

A espectroscopia de fluorescência molecular é uma ferramenta universal para o estudo de interações proteína-ligante, pois possibilita estudos eficientes e confiáveis, além de possuir alta sensibilidade. Existe uma grande variedade de possibilidades para utilizar a fluorimetria na investigação de formação de complexos supramoleculares, fazendo uso de vários aspectos da fluorescência, como intensidade, espectros de

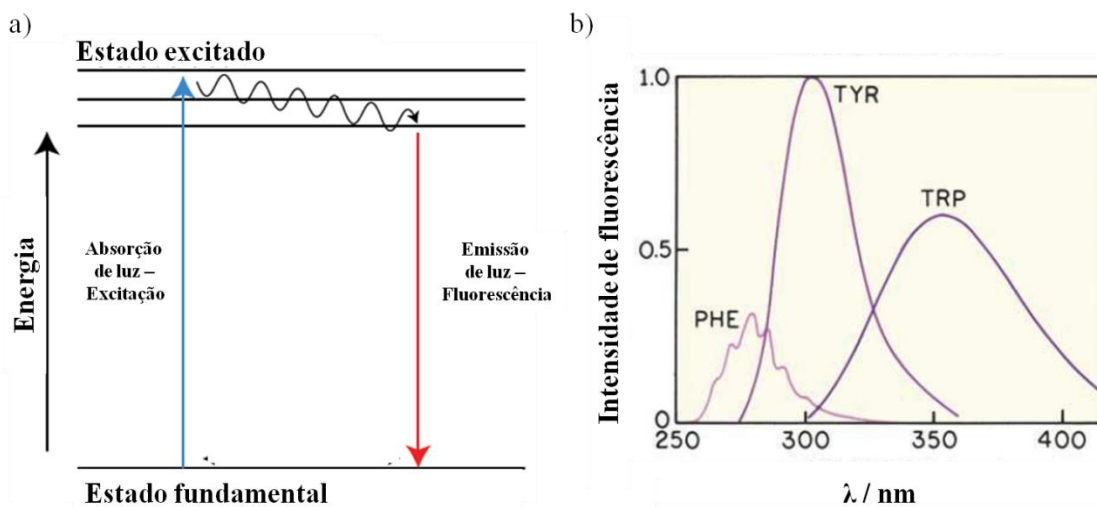
emissão e excitação, rendimento quântico, tempo de meia vida e transferência de energia (MOCZ & ROSS, 2013).

A fluorescência origina-se de transições eletrônicas em moléculas que possuem conjugações. De modo geral, quando um fluoróforo (molécula fluorescente) é excitado por um fóton, este passa para um nível de energia mais elevado (estado excitado), parte da energia é dissipada por colisões moleculares ou transferida para moléculas próximas e ao retornar para o estado fundamental a energia restante é emitida sob a forma de fluorescência (Figura 4a) (LAKOWICZ, 2006). Desse modo, é possível utilizar a fluorescência para investigar processos de interação proteína-ligante monitorando a fluorescência intrínseca da proteína, do ligante (quando esse possuir) ou até mesmo através da adição de uma sonda fluorescente no sistema de interação. Com o intuito de identificar possíveis alterações na estrutura da proteína (ovalbumina) na presença do ligante (sulfonamidas), optou-se por realizar os estudos monitorando a fluorescência intrínseca da macromolécula.

As proteínas possuem fluorescência devido à presença de aminoácidos aromáticos em sua cadeia polipeptídica, são eles: triptofano, tirosina e fenilalanina. A maior contribuição é proveniente dos resíduos de triptofano, pois a fenilalanina tem baixo rendimento quântico e, apesar da tirosina possuir um rendimento quântico semelhante ao triptofano, seu espectro de emissão é mais estreitamente distribuído na escala de comprimento de onda quando comparado ao do triptofano (Figura 4b). Além disso, o triptofano desativa resíduos de tirosina que estão próximos a ele (LAKOWICZ, 2006; MATVEEVA et al., 2009). Sendo assim, o fluoróforo (presente na proteína) ao interagir com o ligante tem sua fluorescência suprimida (*quenching* de fluorescência) devido à formação de um complexo proteína-ligante no estado fundamental, colisões no estado excitado e transferência de energia (ANAND et al, 2011; WEERT, 2010).

Na literatura já são reportados inúmeros estudos de interação proteína-ligante que utilizaram a fluorescência molecular, sincronizada, tridimensional (3D) e transferência de energia ressonante (FRET) para calcular parâmetros de ligação e termodinâmicos, bem como identificar mudanças conformacionais na estrutura da macromolécula em decorrência do processo de interação, como por exemplo os estudos desenvolvidos por Katrahalli e colaboradores (2010) (azul de comassie com BSA), Cheng e colaboradores (2013) (tentrandrina com HSA e BSA), Moreira e colaboradores (2015) (complexo de rutênio com BSA e HSA) e Dantas e colaboradores (2017) (ovalbumina com tetraciclina).

Figura 4- a) Diagrama de Jablonski; b) Emissão de fluorescência dos resíduos de aminoácidos aromáticos (Triptofano - Trp, Tirosina - Tyr e Fenilalanina - Phe).



Fonte: adaptado de Lakowicz, 2006.

1.2.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H)

Apesar de possuir baixa sensibilidade, a ressonância magnética nuclear (RMN) é uma das técnicas mais importantes para avaliar interações proteína-ligante. Esta técnica tem grande aplicabilidade para monitorar alterações na estrutura do ligante na ausência e presença da proteína e, dessa maneira, é possível inferir sobre o epítipo de interação (SHEKHTMAN & BURZ, 2012).

Alguns parâmetros físicos podem ser utilizados para avaliar a interação macromolécula-ligante, como por exemplo o deslocamento químico (δ), expresso em ppm, que foi o parâmetro utilizado neste trabalho. Para tal, obteve-se os espectros de RMN ^1H dos ligantes na ausência e presença da proteína, sendo possível compará-los e mapear o epítipo (superfície de contato) de interação entre o ligante e a macromolécula (CALA et al., 2013).

1.3. Ovalbumina – características gerais e potencial alergênico

A ovalbumina (OVA), principal alérgeno natural presente na clara do ovo, é uma fosfoglicoproteína que possui arranjo tridimensional formado por nove α -hélices, três β -folhas e é constituída por 385 resíduos de aminoácidos que lhe conferem um peso molecular de aproximadamente 45 kDa (Tabela 1). Dentre eles, estão os resíduos aromáticos (Trp, Tyr e Phe) responsáveis pela fluorescência intrínseca da proteína (Figura 5).

A OVA existe sob três formas, as quais diferem entre si de acordo com o número de grupos fosfatos ligados à sua cadeia polipeptídica, sendo classificadas como A1 (dois grupos fosfatos), A2 (um grupo fosfato) ou A3 (sem grupos fosfatos) (ALLEONI, 2006; BHATTACHARYA & MUKHOPADHYA, 2012). Esta macromolécula corresponde a 54% do conteúdo proteico total da clara do ovo em massa e, desta forma, é a proteína majoritária deste alimento. Além da OVA, pode-se encontrar mais de 40 tipos de proteínas na clara do ovo, dentre estas podem ser citadas a ovotransferrina, ovomucóide, ovomucina e lisozima (HU et al., 2016).

Tabela 1- Aminoácidos que constituem a cadeia polipeptídica da ovalbumina.

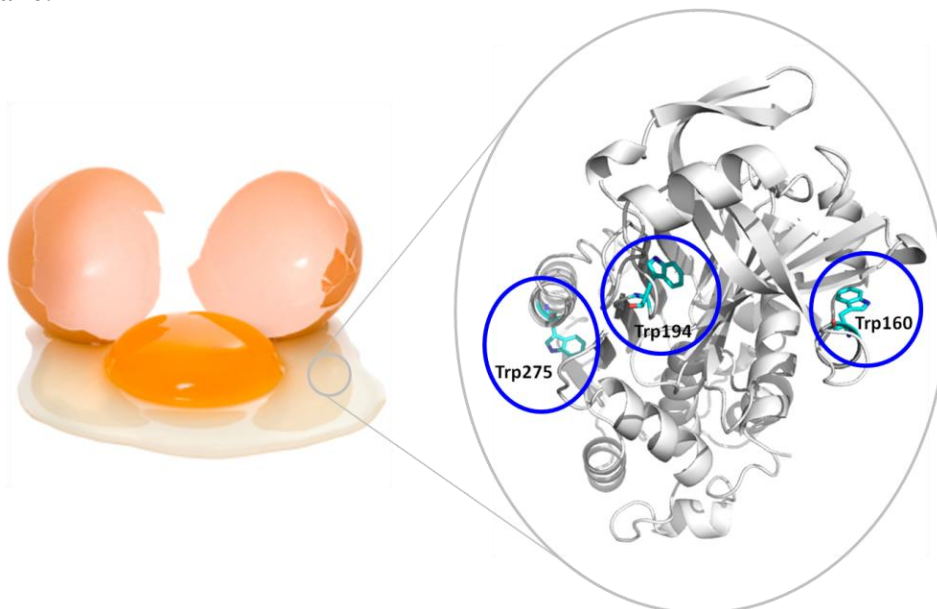
Aminoácido	Resíduos	Carga esperada em pH 7,4
Alanina	34	0
Arginina	19	+
Ácido aspártico	31	-
Cisteína	6	0
Ácido glutâmico	50	-
Glicina	18	0
Histidina	8	+
Isoleucina	24	0
Leucina	32	0
Lisina	20	+
Metionina	15	0
Fenilalanina	20	0
Prolina	16	0
Serina	36	0
Treonina	15	0
Triptofano	3	0
Tirosina	9	0
Valina	30	0

Fonte: Dantas et al., 2015.

Devido as suas excelentes propriedades funcionais, como emulsificação, gelificação e formação de espumas (MINE, 2007), a OVA tem uma grande relevância industrial e é bastante utilizada no processamento de diversos tipos de alimentos. Entretanto, segundo Caubet e colaboradores (2011) quantidades significativas desta proteína podem ser encontradas em vacinas fabricadas a partir da utilização de ovos de galinha, como por exemplo, as vacinas contra o vírus influenza, febre amarela e tríplice viral (sarampo, caxumba e rubéola). Vacinas contra a gripe baseadas em vírus cultivados e isolados de ovos de galinha embrionados e depois inativados têm sido amplamente utilizados há mais de 60 anos devido ao custo/benefício do processo,

mesmo este possuindo um longo tempo de execução, além de possivelmente poder induzir a reações alérgicas em indivíduos hipersensíveis aos componentes do ovo (ULMER et al., 2006; CHUNG, 2014).

Figura 5- Estrutura tridimensional da ovalbumina, com destaque para os três resíduos de triptofano.



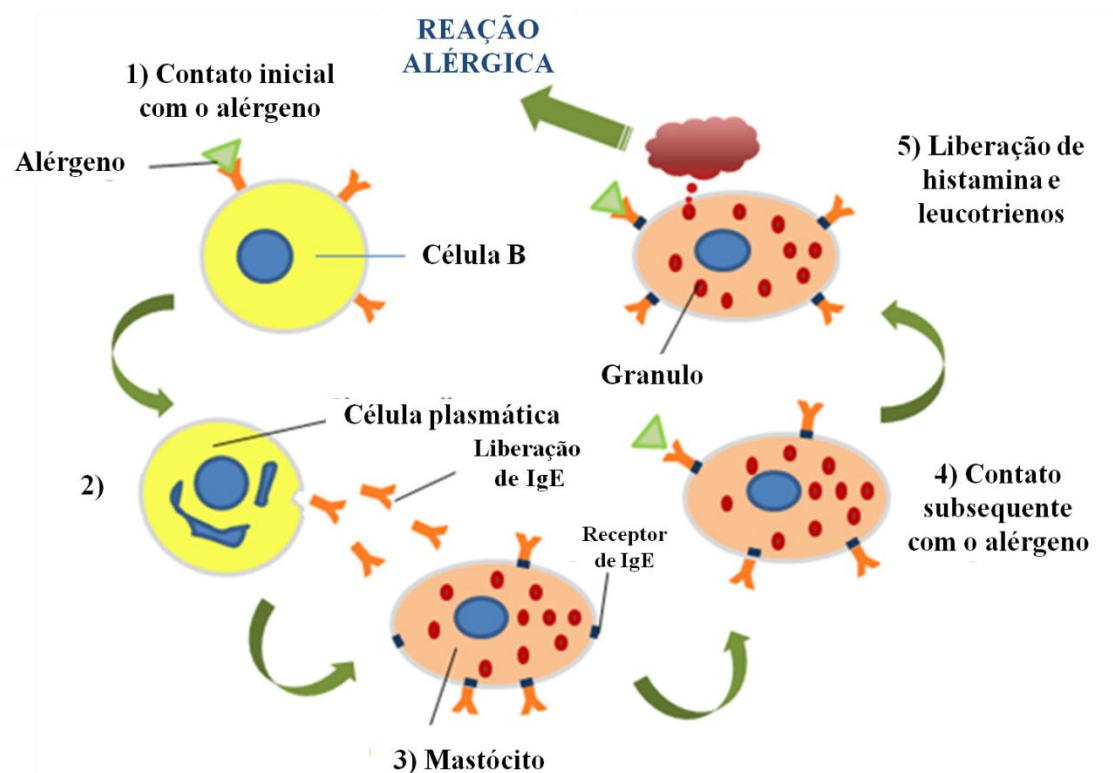
Fonte: Dantas et al., 2017. PDB: Stein et al., 1991.

As reações alérgicas associadas ao ovo de galinha, alimento amplamente distribuído na população devido ao seu alto valor nutricional e baixo custo, é a segunda alergia alimentar mais comum em bebês e crianças, após reações alérgicas relacionadas às proteínas do leite (CAUBET et. al, 2011). Por ser o principal alérgeno natural do ovo, a ovalbumina é responsável por induzir uma reação mediada pela imunoglobulina E (IgE), onde o organismo reconhece o alérgeno como uma espécie estranha e ativa o sistema imune resultando na ligação alérgeno-IgE que promove a liberação de substâncias mediadoras, como a histamina, que ocasionam os sintomas alérgicos (VERHOECKX et al., 2015) (Figura 6).

Para compreender as reações de hipersensibilidade impulsionadas pela ovalbumina, Mine & Rupa (2003) identificaram os epítomos de ligação desta proteína a IgE, sendo visto que cinco peptídeos distintos da estrutura primária da OVA ligam-se preferencialmente a este anticorpo: LAMVYLGAKDST, DVYSFSLA, EDTQAMPFRV, VLLPDE e GLEQLESIIN. Estes peptídeos são constituídos principalmente por aminoácidos hidrofóbicos, seguidos dos resíduos polares carregados, como o ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina e arginina. A ligação da IgE a epítomos

sequenciais das proteínas tornam estas macromoléculas alérgicas devido a alterações na conformação da estrutura nativa (WANG & SAMPSON, 2009).

Figura 6- Mecanismo de alergia mediada por IgE.



Fonte: Disponível em: <http://asthmaallergyclinic.in/allergy/> (acessado em: 11/05/2017).

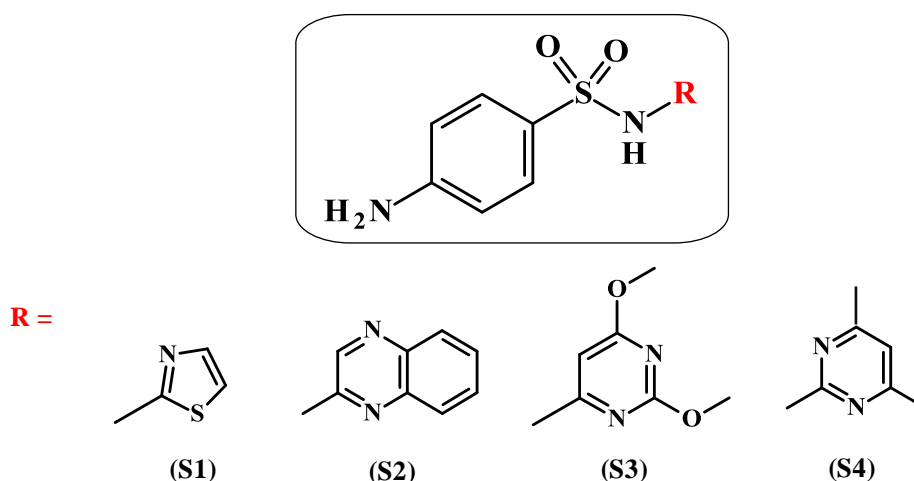
Além disso, estudos de interação macromolécula-ligante já existentes na literatura demonstram que interações não-covalentes entre a ovalbumina e diferentes ligantes também podem induzir a mudanças conformacionais na estrutura nativa da proteína e, dessa forma, poderá potencializar os efeitos alérgicos. Este perfil foi observado avaliando a interação da OVA com fosfocolina (KAMILYA et al., 2007), quercetina (LU et al., 2009), diferentes alcalóides (WANG et al., 2013), polifenóis do chá verde (SHEN et al., 2014), epigallocatequina-3-galato (OGNJENOVIC et al., 2014) e tetraciclina (DANTAS et al., 2017). Portanto, é de suma importância o desenvolvimento de estudos de interação da OVA com diferentes ligantes.

1.4. Sulfonamidas – características gerais e potencial antimicrobiano

As sulfonamidas são antibióticos empregados principalmente na medicina veterinária devido ao baixo custo e amplo espectro de ação agindo sobre bactérias Gram positivas, Gram negativas e protozoários (HOFF & KIST, 2009). As sulfonamidas

competem com uma substância de estrutura análoga, o ácido *p*-aminobenzóico (PABA), composto utilizado pelas bactérias na produção do ácido fólico, o qual é essencial para a síntese de DNA e RNA quando se encontra na sua forma reduzida (ácido tetraidrofólico). Desse modo, as sulfonamidas retardam ou inibem o crescimento bacteriano, sendo, portanto, classificadas como agentes bacteriostáticos (SILVA et al., 2014). Na Figura 7 estão apresentadas as estruturas químicas das sulfonamidas utilizadas neste trabalho, nomeadamente sulfatiazol (S1), sulfaquinoxalina (S2), sulfadimetoxina (S3) e sulfametazina (S4), as quais diferem entre si de acordo com o substituinte –R ligado ao nitrogênio da amida sulfônica.

Figura 7- Estrutura química das sulfonamidas avaliadas na interação com ovalbumina: sulfatiazol (S1), sulfaquinoxalina (S2), sulfadimetoxina (S3) e sulfametazina (S4).



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

As sulfonamidas S1, S2, S3 e S4 são amplamente utilizadas como agentes terapêuticos na avicultura, principalmente em galinhas, para o controle de doenças como coccidiose, tifo e cólera aviária, coriza infecciosa e pulorose (HOFF, 2008). Mehtabuddin e colaboradores (2012) e Xu e colaboradores (2013) verificaram níveis residuais destes antibióticos em algumas das amostras de ovos analisadas, os quais foram superiores aos permitidos por órgãos de controle. Assim, segundo Silva e colaboradores (2014), o uso indiscriminado de medicamentos veterinários em animais produtores de alimentos, como carne, leite, ovos e mel, pode gerar resíduos nestes e resultar em efeitos tóxicos, reações alérgicas e resistência à antibióticos aos consumidores. No Brasil, o programa que monitora a quantidade de resíduos de medicamentos veterinários em carne, leite, ovos, mel e pescado é o Plano Nacional de

Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) coordenado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Segundo o mesmo, o Limite Máximo de Referência (LMR) das seis sulfonamidas que podem ser encontradas em ovos é de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Devido ao grande uso destes antibióticos, já são reportados na literatura estudos de interação de sulfonamidas com a albumina do soro bovino (BSA) e albumina do soro humano (HSA) (Banni-Yassen, 2011; Chen et al., 2012; Ali et al., 2014; Wang et al., 2014). Contudo, trabalhos de interação de sulfonamidas com proteínas alimentares ainda são ausentes, assim como, o possível efeito do processo de interação na atividade biológicas destes compostos. Desta forma, tem-se como objetivo avaliar a interação da ovalbumina, o principal alérgeno natural da clara do ovo com quatro sulfonamidas (S1, S2, S3 e S4) através de técnicas espectroscópicas (fluorescência molecular, UV-vis e ressonância magnética nuclear) e ensaios de atividade antimicrobiana visando avaliar possíveis alterações conformacionais da proteína e variações na atividade biológica, a fim de compreender o processo de interação proteína-ligante simulando as condições do alimento e fisiológicas e suas consequências.

2. JUSTIFICATIVA

As sulfonamidas constituem uma classe de antibióticos amplamente utilizados como medicamento veterinário para animais produtores de alimentos como, por exemplo, galinhas, devido a seu amplo espectro de ação e baixo custo. O uso irregular ou contínuo deste medicamento pode gerar resíduos desta substância em alimentos derivados de frangos, como ovos, e dessa forma resultar em efeitos tóxicos e reações alérgicas na população. Os ovos são alimentos que podem ser consumidos de forma direta ou empregados no preparo de alimentos, sendo distribuídos em todos os extratos da população. A ovalbumina, alérgeno natural, é a principal proteína presente no ovo, e apresenta diferentes propriedades, tais como: fonte proteica na dieta, gelatinização, emulsificação, transporte de substâncias, entre outras. Assim, uma vez presente em ovos, as sulfonamidas podem interagir com a OVA modificando a sua conformação nativa e talvez venha a potencializar sua capacidade alergênica. Portanto, torna-se necessário e importante para a segurança alimentar estudos de interação da ovalbumina com sulfonamidas visando inferir sobre os principais mecanismos envolvidos neste processo, uma vez que na literatura estudos de interação da ovalbumina com antibióticos são ausentes.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a interação entre a proteína majoritária da clara do ovo (ovalbumina) com os antibióticos sulfatiazol, sulfaquinoxalina, sulfadimetoxina e sulfametazina simulando as condições do alimento, e determinar os principais parâmetros associados a este processo.

3.2. Objetivos Específicos

- a) Avaliar a interação das diferentes sulfonamidas (sulfatiazol, sulfaquinoxalina, sulfadimetoxina e sulfametazina) com a ovalbumina comercial e *in natura* (clara do ovo);
- b) Empregar a técnica de fluorescência molecular, tridimensional e sincronizada para avaliar alterações estruturais da proteína e obter parâmetros como: mecanismo de *quenching*, constantes de ligação, estequiometria proteína-ligante e dados termodinâmicos;
- c) Explorar a técnica UV-vis visando avaliar o processo de interação intermolecular (proteína-ligante).
- d) Avaliar distâncias intermoleculares entre o doador (OVA) e o aceptor (Sulfonamidas) de energia envolvidos no processo de interação empregando FRET;
- e) Empregar a sonda ANS visando avaliar sítios preferenciais de interação das sulfonamidas com a ovalbumina;
- f) Avaliar a influência de espécies competidoras metálicas, como Ca(II), Mg(II), Zn(II), Cu(II) e Fe(III) no processo de interação;
- g) Aplicar a técnica de RMN de ^1H para avaliar o epítipo da molécula durante o processo de interação;
- h) Avaliar o potencial antimicrobiano das sulfonamidas na ausência e presença da ovalbumina contra cinco cepas bacterianas e determinar os valores da Concentração Inibitória Mínima (MIC).

4. EXPERIMENTAL

4.1. Materiais e Soluções

A ovalbumina comercial (albumina proveniente da clara do ovo), os antibióticos sulfatiazol (S1), sulfaquinoxalina (S2), sulfadimetoxina (S3) e sulfametazina (S4), Tris-HCl, NaCl, ácido 8-anilino-1-naftaleno-sulfonato (ANS), dimetilsulfóxido (DMSO), dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) e monohidrogenofosfato de potássio (Na_2HPO_4) foram todos obtidos da Sigma-Aldrich (EUA), com grau de pureza analítica. As soluções estoque dos antibióticos (10 mM) foram preparadas dissolvendo-se diretamente quantidade apropriada do sólido em DMSO. As soluções de trabalho dos antibióticos e a solução estoque de OVA comercial (2 μM) foram preparadas em tampão Tris-HCl 50 mM (pH $7,4 \pm 0,1$) com 100 mM de NaCl para ajuste da força iônica. Para a preparação da solução da OVA *in natura* pesou-se 0,150 g da clara de um ovo branco, tipo grande, comercial (Granja Almeida) e solubilizou-se em 30 mL da solução tampão, obtendo uma solução representativa de ovalbumina *in natura* a 2 μM . A concentração da OVA comercial e *in natura* foi determinada utilizando a lei de Beer por meio do valor da absorbância (280 nm) e coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{280} = 30957 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) após diluição de 1:5 da solução estoque da proteína (BHATTACHARYA & MUKHOPADHYAY, 2012). Em todos os experimentos foi utilizada água ultrapura ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) para o preparo das soluções e do tampão (Millipore, USA).

Na avaliação da atividade biológica as soluções estoque dos antibióticos sulfonamidas foram preparadas dissolvendo-se diretamente cada um deles em DMSO (2,5 mg mL^{-1} para S1, S2 e S4, e 1,25 mg mL^{-1} para S3). As soluções combinadas de cada antibiótico com a OVA foram preparadas pela mistura das soluções estoque de antibióticos (1:1 v/v) em solução de OVA em tampão Tris-HCl 50 mM (pH $7,4 \pm 0,1$) contendo 100 mM de NaCl (em água destilada esterilizada, para ajuste da força iônica).

4.2. Estudo por UV-vis

Os espectros de absorção da OVA (3 μM) por UV-vis, das diferentes sulfonamidas (6 μM) e dos complexos (OVA + sulfonamida) foram obtidos empregando um espectrofotômetro Micronal (modelo AJX-6100PC, Brasil) de duplo feixe equipado com cubetas de quartzo de 1,0 cm (caminho óptico) e registrados de 220 a 320 nm (S1, S3 e S4) e 220 a 390 nm (S2).

4.3. Estudos por fluorescência molecular

Nos estudos realizados por fluorescência molecular, os espectros de fluorescência no estado estacionário foram obtidos por meio de um espectrofluorímetro Shimadzu (modelo RF-5301PC, Japão) equipado com uma lâmpada de xenônio de 150 W. Todas as medidas espectrofluorimétricas foram realizadas utilizando uma cubeta de quartzo de 1,0 cm (caminho óptico) com janela (*slit*) de excitação e emissão ajustados em 3 e 5 nm, respectivamente.

Os espectros de emissão da fluorescência intrínseca da OVA na ausência e na presença dos ligantes (S1, S2, S3 e S4) foram obtidos por meio de uma titulação espectrofluorimétrica da OVA (2 μM) com quantidades crescentes das sulfas (0 - 200 μM) em pH 7,4, empregando $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm. Similarmente, foi realizada avaliação em três temperaturas (23, 30 e 37°C) para obter os parâmetros termodinâmicos deste processo de interação macromolécula- ligante.

O estudo por fluorescência tridimensional (3D) foi realizado para avaliar possíveis mudanças conformacionais na estrutura secundária da proteína (HE et al., 2014). Neste estudo, os espectros de emissão em 3D da fluorescência intrínseca da OVA (2 μM) na ausência e na presença de diferentes sulfas (40 μM) foram obtidos empregando uma faixa de comprimento de excitação de 220-350 nm e de emissão de 250-450 nm.

Fluorescência sincronizada foi realizada para monitorar separadamente os fluoróforos, tirosina e triptofano, presentes na OVA e possíveis mudanças da polaridade de seus microambientes (VARLAN & HILLEBRAND, 2010). Para tanto, os espectros foram obtidos por meio da variação simultânea dos monocromadores de emissão e excitação. O valor do $\Delta\lambda$ ($\Delta\lambda = \lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{ex}}$) entre os comprimentos de onda de emissão e excitação foi mantido fixo. Aplicou-se $\Delta\lambda = 15$ nm e $\Delta\lambda = 60$ nm para monitorar o comportamento espectroscópico dos resíduos de tirosina e triptofano, respectivamente (WANG et al., 2013).

Para calcular a distância crítica entre o doador (fluoróforos da OVA) e acceptor de energia (ligantes) durante o processo de interação da ovalbumina (2 μM) com as diferentes sulfonamidas (10 μM) foi realizada o ensaio baseado na Transferência de Energia por Ressonância de fluorescência (FRET) (CHATTERJEE et al., 2012).

Um ensaio de competição com a sonda ANS foi realizado para avaliar os efeitos das quatro sulfonamidas sobre a interação da OVA e inferir sobre sítios hidrofóbicos da proteína (WANG et al., 2008). Para tal, uma titulação do sistema OVA (2 μM) e ANS

(4 μM) foi realizada na presença de diferentes concentrações das sulfonamidas avaliadas (0 - 200 μM) com $\lambda_{\text{ex}} = 334 \text{ nm}$ (OVA-ANS).

Um estudo de competição foi realizado com Ca(II), Mg(II), Zn(II) e Cu(II) (derivados dos respectivos acetatos) e Fe(III) (a partir do respectivo cloreto) todos a 2 μM no processo de interação da proteína (2 μM) com as quatro sulfas (0 - 200 μM).

Por fim, fez-se uma titulação espectrofluorimétrica para avaliar o processo de interação da OVA com as diferentes sulfonamidas utilizando a OVA comercial (pura) e *in natura* (clara do ovo).

4.4. Estudo por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN ^1H das diferentes sulfas na ausência e na presença da OVA foram obtidos por meio de um espectrômetro Bruker 400 MHz ($B_0 = 9,4\text{T}$) equipado com sonda de detecção indireta de 5 mm. Para o preparo das soluções da OVA (40, 20 e 10 μM para S2; 40 μM para S1, S3 e S4) foi utilizado tampão fosfato 10 mM a pH 7,4 em água deuterada (D_2O). As soluções estoques 1 (10 mM) e 2 (1 mM) das diferentes sulfonamidas foram preparadas em DMSO- d_6 deuterado e em tampão fosfato 10 mM a pH 7,4 em D_2O , respectivamente. A concentração de DMSO- d_6 final nos sistemas avaliados foi 10% (v/v). As amostras foram preparadas com adição da OVA, sulfonamida (1 mM), 10 μL do padrão interno, trimetilsililpropionato de sódio (TMS P), a 2,5 mM, e completadas com tampão fosfato 10 mM para um volume final de 600 μL .

4.5. Atividade biológica – Potencial antimicrobiano

Para avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* das diferentes sulfonamidas ligadas a proteína ovalbumina (OVA), efetuaram-se antibiogramas através do método de disco-difusão de Kirby-Bauer (CLSI, 2007; BAUER et al, 1996). Para tal, foram selecionadas cinco bactérias mantidas na bacterioteca do Laboratório de Bioquímica do Parasitismo e Microbiologia Ambiental (LBPMA), do Instituto de Química e Biotecnologia (IQB), da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), a saber: *Escherichia coli* ATCC 25922 (cepa padrão), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (cepa padrão), *Corynebacterium glutamicum* LBPMA-LSA, *Klebsiella oxytoca* BMA-13 e *Bacillus megaterium* APFSG3isox (as duas últimas com depósito de suas sequências de 16S r-RNA no GenBank NCBI, números de acesso respectivamente KU555927 e KX129778).

4.5.1. Preparo e inoculação do meio de manutenção ágar nutriente (AN)

Para a manutenção de células ativas das cepas bacterianas selecionadas, uma colônia (alçada) de cada cultura pura original (mantida ao abrigo da luz a 6 ± 2 °C) foi semeada (por estrias) em meio ágar nutriente esterilizado (AN, composição em água destilada (g L^{-1}): peptona, 5; extrato de carne, 3; cloreto de sódio, 1; ágar, 20; autoclavado por 20 min a 120°C) e contido em placas de Petri. As culturas foram incubadas por 24 h ao abrigo da luz, a 32 ± 1 °C.

4.5.2. Ensaio antimicrobiano em meio Ágar Muller Hinton (AMH)

Suspensões bacterianas das cepas cultivadas por 24 h em AN foram obtidas visando inocular o meio ágar Muller Hinton através da técnica *pour plate*. Para tal, um volume de 10 mL de água destilada esterilizada foi depositado na superfície de cada cultura. A suspensão celular homogeneizada com o auxílio de alça de Drigalsky foi colhida para o tubo esterilizado por sucção, com o auxílio de uma pipeta igualmente esterilizada. A concentração de células de cada suspensão foi determinada através da escala de Mc Farland. As suspensões foram, então, diluídas para 20 mL e transferidas para 200 mL de meio ágar Muller Hinton previamente esterilizado e ainda liquefeito (AMH = 38 g L^{-1} água destilada, marca: HIMEDIA), rendendo a concentração de $2,77 \times 10^7$ células mL^{-1} , e este foi vertido em placas de Petri ($\cong 9$ ou 18 cm de diâmetro, $\cong 4$ -5 mm de espessura de meio).

Sobre a superfície do meio AMH inoculado, então, depositou-se um disco de papel de filtro contendo o padrão ofloxacino (5 μg), e, em posições equidistantes a este e uns dos outros e das bordas, novos discos de papel de filtro preparativo, esterilizados. Alíquotas dos diluentes (DMSO e tampão Tris-HCl), da OVA, e dos antibióticos individuais e/ou ligados a OVA foram, então, coletadas com pipeta esterilizada e depositadas sobre os mesmos.

Em um teste preliminar, em duplicata ($n = 2$), nas placas menores (para *E. coli*, *B. megaterium* e *P. aeruginosa*) foram adicionados sete discos – um para o padrão ofloxacino e os demais para o DMSO puro, o tampão e as quatro sulfonamidas; ou oito discos - um para o padrão de ofloxacino e os demais para o DMSO puro, o tampão, a OVA, as quatro sulfonamidas além dos quatro sistemas OVA-sulfonamidas. Já para *C. glutamicum* e *K. oxytoca* inoculadas nas placas maiores, foram distribuídos 12 discos referentes ao padrão ofloxacino, DMSO puro, tampão, OVA, as diferentes sulfonamidas e os diferentes sistemas de interação OVA-sulfonamidas. Após a deposição de 40 μL

das soluções sobre os discos de papel de filtro (contendo 100 µg de S1, S2, S4 e 50 µg para os respectivos sistemas relativos ao processo de interação OVA-S1, OVA-S2 e OVA-S4, enquanto que se utilizou 50 µg para S3 e 25 µg do sistema OVA-S3), as placas foram incubadas por 24 h ao abrigo da luz, a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ (estufa), e posteriormente os halos de inibição foram mensurados com o auxílio de um paquímetro, e suas médias com os respectivos desvios padrão foram determinadas.

A partir dos resultados obtidos no ensaio preliminar, os demais testes foram utilizados para estabelecer a concentração inibitória mínima (MIC) para as bactérias avaliadas, sendo os sistemas preparados com placas menores contendo apenas seis discos, isto é, além dos controles, uma única sulfonamida e respectiva interação com OVA por réplica de concentração. Todos os ensaios foram efetuados em duplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Parâmetros de ligação e termodinâmicos

A espectroscopia por fluorescência molecular é uma técnica universal imensamente utilizada em estudos de interação proteína-ligante por ser relativamente simples e possuir uma aplicação generalizada. Além disso, é uma técnica altamente sensível e, dessa forma, facilita a avaliação de sistemas com baixas concentrações (WILLIAMS & DAVITER, 2013). Para avaliar o processo de interação entre a OVA e as diferentes sulfonamidas (S1, S2, S3 e S4), realizou-se uma titulação espectrofluorimétrica onde foi monitorada a fluorescência intrínseca da ovalbumina, proveniente dos nove resíduos de tirosina e três resíduos de triptofano (SGARBIERI, 1996). Para tal, a intensidade de fluorescência da OVA livre (2 μM) foi supervisionada em 336 nm após excitação em 280 nm, na ausência e presença de diferentes concentrações das sulfonamidas (0 - 200 μM). Como pode ser visto na Figura 8a à medida que a concentração do sulfatiazol (S1) aumentou, ocorreu o processo de *quenching* de fluorescência, ou seja, a supressão do sinal de fluorescência induzido pela interação da proteína com o *quencher* (ligante), e dessa forma, pode-se inferir que a OVA interage com S1 formando um complexo supramolecular não fluorescente, OVA-S1, corroborando com os resultados obtidos por NI e colaboradores (2010). Resultados similares foram obtidos para S2, S3 e S4 (APÊNDICE I).

Uma vez que foi verificado que a interação macromolécula-ligante ocorre, fez-se um estudo em diferentes temperaturas (23, 30 e 37 °C) para obter os parâmetros de interação (ligação e termodinâmicos) associados a este processo. Os dados do *quenching* de fluorescência são analisados pela equação de Stern-Volmer:

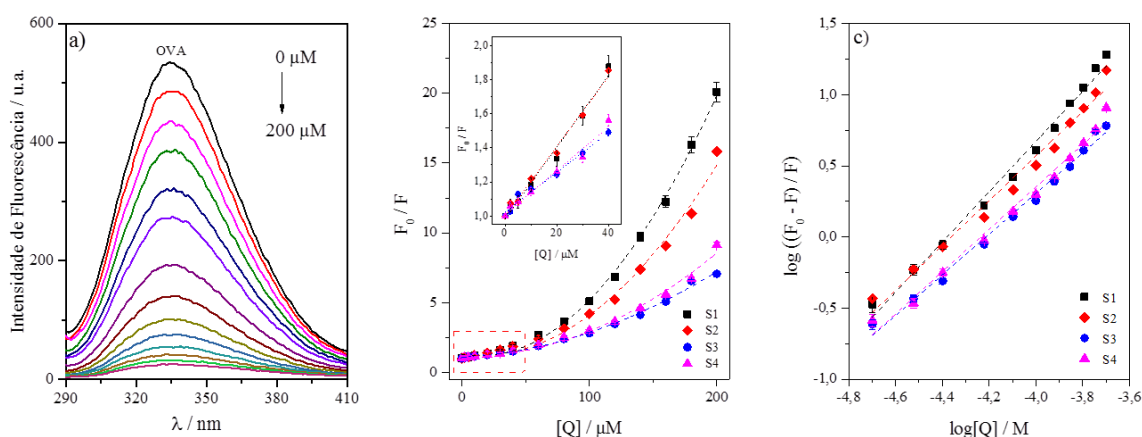
$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} [Q] \quad \text{Equação (1)}$$

Onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do *quencher*, respectivamente, K_{sv} é a constante de Stern-Volmer e $[Q]$ é a concentração do *quencher* (sulfonamidas) (HE et al., 2013). A Equação 1 foi aplicada para determinar K_{sv} por regressão linear a partir do gráfico de F_0/F vs $[Q]$ (Figura 8b). Os dados obtidos nas três temperaturas avaliadas são apresentados na Tabela 2.

Por meio da variação dos valores de K_{sv} em função da temperatura é possível inferir sobre o mecanismo de *quenching* preferencial que está envolvido no processo de interação das diferentes sulfonamidas com a OVA. Segundo Mei e colaboradores (2008), o processo de *quenching* pode ocorrer por dois mecanismos diferentes,

quenching estático ou dinâmico que podem ser diferenciados pela dependência com a temperatura. Temperaturas mais elevadas resultam em uma difusão mais rápida das moléculas e, conseqüentemente, maiores quantidades de colisões que são características para o *quenching* dinâmico, resultando no aumento do K_{SV} . Por sua vez, o *quenching* estático é caracterizado pela formação de um complexo não fluorescente no estado fundamental e, neste caso, em temperaturas mais elevadas o complexo macromolécula-ligante é desestabilizado (LU et al., 2009). De acordo com a Tabela 2, os valores de K_{SV} diminuíram com o aumento da temperatura, dessa forma, o mecanismo de interação entre a OVA e as sulfonamidas avaliadas ocorre preferencialmente por *quenching* estático.

Figura 8- a) Perfil espectral da titulação espectrofluorimétrica da OVA (2 μM) com sulfatiazol (S1), b) Linearização da equação de Stern-Volmer (gráfico interno – expansão da faixa de concentração com tendência linear em destaque com o retângulo), c) Linearização para cálculo da constante de ligação (K_b) e número de sítios de ligação (n). Condições: tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4 e 30°C.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Além da constante de Stern-Volmer (K_{SV}) também foi possível determinar outros dois parâmetros de ligação associados à interação proteína-ligante. Para tanto, a seguinte equação foi utilizada:

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = K_b + n \log[Q] \quad \text{Equação (2)}$$

onde K_b é a constante de ligação relacionada com a força de interação entre a OVA e os ligantes, e n é o número de sítios de ligação do complexo formado (MATHAVAN et al., 2015). A Equação 2 foi aplicada para determinar K_b e n por regressão linear a partir do gráfico $\log((F_0 - F)/F)$ vs $\log[Q]$ (Figura 8c). Os dados obtidos nas três temperaturas

avaliadas estão apresentados na Tabela 2. A partir dos valores de K_b , observa-se que a magnitude da interação seguiu a seguinte ordem: $S1 > S2 > S4 > S3$. Verificou-se, portanto, que a sulfatiazol (S1) é a sulfonamida que interagiu de forma mais efetiva com a OVA, enquanto que a sulfadimetoxina (S3) foi a que apresentou menor interação com esta proteína. Provavelmente o grau de afinidade das sulfonamidas com a OVA está relacionado com o radical $-R$ (Figura 1), uma vez que radicais menos volumosos (como o tiazol em S1) possibilitam uma maior interação, enquanto que radicais mais volumosos devem dificultar a formação do complexo supramolecular, resultando desta forma em um menor valor para K_b , como é o caso de S3.

Além disso, pôde-se observar que os valores de K_b obtidos a 30°C variaram de 3,98 a $27,7 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ para a interação das diferentes sulfonamidas avaliadas com a OVA. Tais valores foram maiores quando comparados com outros estudos de interação de sulfonamidas com diferentes proteínas (Tabela 3), indicando que estes ligantes possuem maior afinidade pela OVA quando comparado com HSA e BSA, por exemplo. Adicionalmente, são apresentados na Tabela 4 os valores das constantes de ligação referentes à interação da OVA com outros ligantes e observa-se que a proteína possui uma maior afinidade pelas sulfonamidas nas condições avaliadas.

Os valores obtidos para n são próximos a uma unidade inferindo que a estequiometria do complexo entre proteína e sulfonamidas é 1:1, indicando provavelmente apenas um sítio preferencial de ligação da OVA com os ligantes.

Tabela 2- Parâmetros de ligação e termodinâmicos para a interação entre OVA e sulfonamidas em diferentes temperaturas. Condições: OVA (2 μ M), sulfonamidas (0 - 200 μ M), tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4.

Ligante	T (°C)	Parâmetros de ligação					Parâmetros termodinâmicos		
		K_{SV} (10^4 L mol $^{-1}$)	r	K_b (10^5 L mol $^{-1}$)	r	n	ΔH (kJ mol $^{-1}$)	ΔS (J mol $^{-1}$ K $^{-1}$)	ΔG (kJ mol $^{-1}$)
S1	23	4,19 \pm 0,03	0,9871	30,6 \pm 2,33	0,9935	1,42	-14,36	+75,76	-36,78
	30	4,08 \pm 0,03	0,9808	27,7 \pm 2,71	0,9784	1,43			
	37	3,75 \pm 0,02	0,9958	23,5 \pm 2,00	0,9905	1,38			
S2	23	1,31 \pm 0,04	0,9972	5,95 \pm 1,78	0,9912	1,37	-48,80	-53,66	-32,92
	30	1,24 \pm 0,04	0,9970	5,17 \pm 1,90	0,9936	1,32			
	37	1,19 \pm 0,01	0,9773	3,73 \pm 1,49	0,9870	1,27			
S3	23	1,06 \pm 0,07	0,9891	4,35 \pm 1,66	0,9803	1,37	-69,70	-125,99	-32,41
	30	0,99 \pm 0,05	0,9902	3,98 \pm 1,99	0,9928	1,36			
	37	0,86 \pm 0,07	0,9809	1,20 \pm 0,24	0,9937	1,22			
S4	23	1,93 \pm 0,08	0,9773	4,60 \pm 1,58	0,9697	1,32	-11,57	+69,34	-32,09
	30	1,67 \pm 0,08	0,9870	4,14 \pm 1,29	0,9876	1,31			
	37	1,47 \pm 0,01	0,9955	3,72 \pm 1,82	0,9908	1,25			

Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Tabela 3- Comparação de valores de K_b de diferentes proteínas e sulfonamidas com o trabalho proposto.

Tampão	pH	Proteína	C_p (μ M)	T ($^{\circ}$ C)	Ligante	K_b ($\times 10^5$ Lmol $^{-1}$)	Referência
Fosfato (1 mM)	7,4	BSA	2	31	Sulfametazina	3,24	Bani-Yaseen et al., 2011.
Tris-HCl 5 mM com NaCl 50 mM	7,4	HSA	1	26	Sulfassalazina	2,31	Tabassun et al., 2012.
Fosfato*	7,4	HSA	3,8	30	Sulfametazina	0,15	Chen et al., 2012.
Fosfato*	7,4	HSA	1,5	30	Sulfadiazina	0,02	Ali et al., 2014.
Tris-HCl 50 mM com NaCl 100 mM	7,4	HSA	3	30	Sulfametoxazol	0,03	Wang et al., 2014.
Tris-HCl (0,02 mM)	7,4	BSA	20	27	Sulfanilamida	0,06	Rajendiran et al, 2015.
					Sulfametoxazol	0,09	
					Sulfatiazol	27,7	
Tris-HCl 50 mM com NaCl 100 mM	7,4	OVA	2	30	Sulfaquinoxalina	5,17	Este Trabalho
					Sulfadimetoxina	3,98	
					Sulfametazina	4,14	

Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Nota: C_p = concentração da proteína / *Valor de concentração não informado.

Tabela 4- Comparação de valores de K_b de diferentes ligantes com a ovalbumina com o trabalho proposto.

Tampão	pH	C_p (μ M)	T ($^{\circ}$ C)	Ligante	K_b ($\times 10^5$ Lmol $^{-1}$)	Referência
Tris-HCl 100 mM com NaCl 100 mM	7,4	10	27	Quercetina	3,33	Lu et al., 2009.
				Diprofilina	0,17	
Tris 100 mM com NaCl 80 mM	7,4	30	24	Cafeína	0,11	Wang et al., 2013.
				Teofilina	0,04	
				Polifenóis do chá verde	0,08	
Fosfato*	7,5	-	-			Shen et al., 2014.
Tris-HCl 20 mM	7,0	22	60	Acrilamida	3,37	Stanciuc et al., 2016.
Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM	7,4	2	30	Tetraciclina	0,27	Dantas et al., 2017.
				Sulfatiazol	27,7	
				Sulfaquinoxalina	5,17	
				Sulfadimetoxina	3,98	
				Sulfametazina	4,14	
Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM	7,4	2	30			Este Trabalho

Fonte: elaborado pela autora, 2017

Nota: C_p = concentração da proteína / *Valores de concentração e temperatura não informados.

Com os valores de K_b obtidos nas diferentes temperaturas foi possível calcular os parâmetros termodinâmicos e, dessa forma, estabelecer as principais forças envolvidas na interação entre a OVA e os ligantes, além de verificar se o processo de interação possui ou não tendência à espontaneidade. Por meio da Equação de Van't Hoff (Equação 3) foi possível determinar os valores relativos a variação de entalpia (ΔH) e entropia (ΔS):

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{R} \left[\frac{1}{T} \right] + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{Equação (3)}$$

onde R é a constante universal dos gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) e T é a temperatura em Kelvin (K) (KOLY et al., 2015). A Equação 3 foi aplicada para determinar ΔH e ΔS por regressão linear do gráfico $\ln K_b$ vs $1/T$ (Figura 9). Os valores de ΔG foram calculados através da seguinte equação:

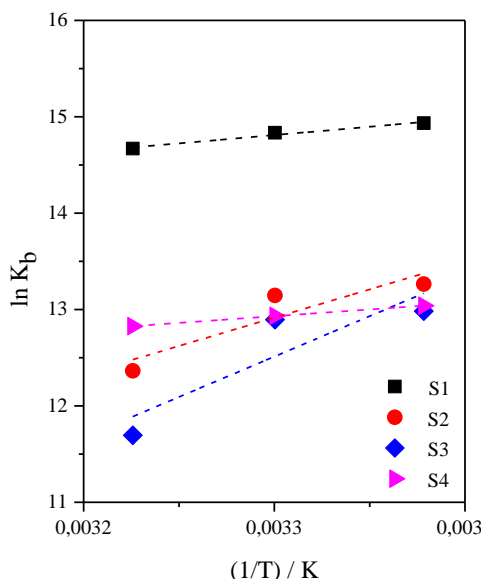
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Equação (4)}$$

Os dados obtidos para os parâmetros termodinâmicos estão apresentados na Tabela 2. Os valores negativos de ΔG indicam que o processo de interação é espontâneo (CHAVES et al., 2015). Segundo Hu e colaboradores (2006), as forças envolvidas na interação de biomoléculas com drogas podem ser interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas. As interações eletrostáticas são responsáveis por estabilizar os complexos formados entre S1 e S4 com a OVA, uma vez que $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$, enquanto que para a interação de S2 e S3 com esta proteína as forças que atuam preferencialmente são Van der Waals e ligações de hidrogênio, pois $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$ (MALTAS, 2014).

Anteriormente foi visto que a magnitude de interação seguiu a seguinte ordem: $S1 > S2 > S4 > S3$. A natureza das forças de atração contribui para os valores de K_b relativo à interação entre a OVA e sulfonamidas, uma vez que as interações eletrostáticas por serem forças mais fortes podem resultar em uma maior afinidade entre a proteína e o ligante e, conseqüentemente, S1 é a sulfonamida com maior constante. Enquanto que forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio são mais fracas em relação às eletrostáticas resultando em uma menor afinidade entre S3 e a OVA. Contudo, sabe-se que a formação do complexo supramolecular é resultado de um somatório das forças atrativas e isso pode ocasionar valores de constantes menores ou maiores do que o previsto, como é o caso de S2 e S4, onde S2 possui constante relativamente maior que S4, mesmo a última possuindo interações eletrostáticas como preferenciais. Por fim, deve-se levar em consideração também possíveis diferenças nos

sítios de interação preferenciais de cada ligante em relação à proteína. Logo, a previsão da afinidade entre sulfonamidas e OVA não constitui um processo simples, devido ao número de fatores que podem afetar/modular o processo de interação.

Figura 9- Gráfico de Van't Hoff para calcular os parâmetros termodinâmicos. Condições: tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

As principais forças relacionadas às interações entre sulfonamidas e a OVA podem ser explicadas com base na distribuição de espécies em função do pH, visto que as moléculas avaliadas são derivadas de ácidos fracos. O perfil do gráfico de distribuição de espécies (Figura 10a) utiliza os valores das constantes de dissociação (pK_a) de cada uma das sulfonamidas avaliadas (HOFF, 2008).

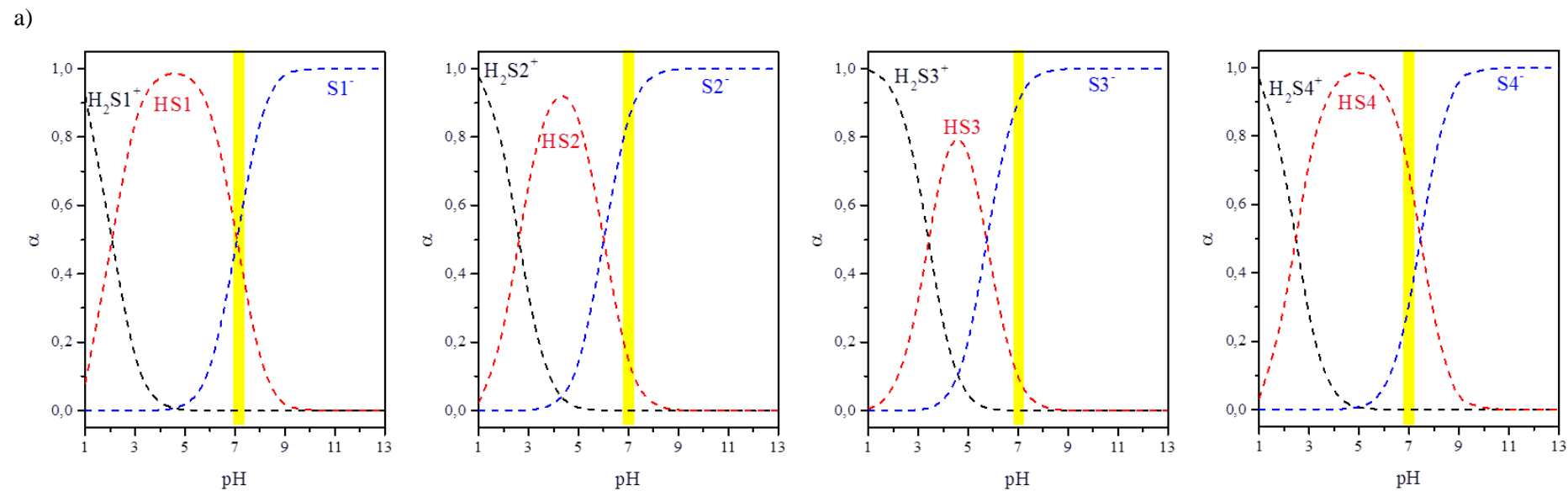
Estas, por sua vez, apresentam dois valores de constantes, assim podem ser encontradas em solução em três formas distintas: H_2SF^+ (carga positiva, $pH < pK_{a1}$), HSF (carga neutra, $pK_{a1} < pH < pK_{a2}$) e SF^- (carga negativa, $pH > pK_{a2}$) (Figura 10b). Considerando que as cargas da proteína também serão alteradas devido ao pH do meio, a natureza da interação preferencial pode ser distinta entre os ligantes a depender do comportamento ácido-base do mesmo.

Como S1 ($pK_{a1} = 2,06$ e $pK_{a2} = 7,07$) e S4 ($pK_{a1} = 2,46$ e $pK_{a2} = 7,45$) possuem pK_{a2} próximo a 7,4 (pH do sistema), estas encontram-se aproximadamente 50% na sua forma neutra e 50% na sua forma aniônica possibilitando que as interações eletrostáticas ocorram. Além disso, S1 e S4 são as sulfonamidas com radicais menos volumosos que

acabam por facilitar o processo de interação através da carga negativa do nitrogênio pertencente à amida sulfônica. Porém, S2 ($pK_{a1} = 2,62$ e $pK_{a2} = 6,01$) e S3 ($pK_{a1} = 3,40$ e $pK_{a2} = 5,76$) possuem pK_{a2} inferior a 7,4 e, dessa forma, encontram-se preferencialmente na forma aniônica. Contudo, $pH = 7,4$ a OVA possui carga global negativa ($pI = 4,5$), assim, pode existir uma repulsão entre os resíduos de aminoácidos negativos presentes na OVA (ácido glutâmico e aspártico) e as sulfonamidas, favorecendo a interação por meio das forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio. Estas devem ocorrer principalmente entre a proteína e os grupos aromáticos de S2 e S3 ou por meio dos oxigênios presentes no grupo sulfóxido destas moléculas (NISBET et al., 1981; ABEYRATHNE et al., 2014).

Foi visto anteriormente que existem poucos trabalhos de interação na literatura envolvendo o sistema proteína-sulfonamidas (Tabela 3). Dentre estes apenas dois estudos possuem como ligante uma das sulfonamidas utilizadas neste trabalho (sulfametazina). De acordo com Bani-Yassen (2011) a sulfametazina interage com a BSA através de ligações de hidrogênio e força de Van der Waals. Contudo, Chen e colaboradores (2012) constataram que a interação HSA-sulfametazina ocorre por meio de interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio. No presente estudo verificou-se que a OVA e a sulfametazina interagem preferencialmente por interações eletrostáticas. Tais diferenças podem estar associadas ao fato de que os trabalhos utilizam proteínas diferentes e, conseqüentemente, o sítio de ligação onde ocorre a formação do complexo supramolecular pode variar e, dessa forma, a mudança nos resíduos de aminoácidos na região de interação pode favorecer ou desfavorecer que determinadas interações ocorram.

Figura 10- a) Gráficos de distribuição de espécies das sulfonamidas em função do pH, b) Equilíbrio de dissociação das sulfonamidas (SF).



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

5.2. Estudos por espectroscopia de absorção molecular no UV-vis

A espectroscopia por absorção molecular no UV-vis é uma técnica útil para investigar interações macromolécula-ligante e inferir sobre o real mecanismo de *quenching* que está envolvido no processo de interação (HE et al., 2016).

Os espectros de absorção molecular da OVA, da sulfatiazol (S1) e do complexo entre OVA e S1 (OVA-S1) foram obtidos e são mostrados na Figura 11a. Pôde-se observar que a OVA tem uma banda com pico de absorção máximo em 280 nm, característico dos resíduos de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) presentes na proteína apresentando transições eletrônicas $\pi-\pi^*$. O espectro de absorção do complexo formado entre a OVA e a sulfatiazol apresentou deslocamento para o azul em relação à OVA livre, o que indica que a interação provoca mudanças conformacionais na cadeia polipeptídica da macromolécula (GUAN et al., 2014). Além disso, o espectro de absorção resultante da subtração do espectro do complexo supramolecular e da OVA livre ((OVA-S1)_c – OVA) não é sobreponível ao espectro da S1 livre, confirmando que ocorre o processo de interação (SAEIDIFAR et al., 2015).

Adicionalmente, de acordo com Tian e colaboradores (2010) quando o mecanismo de interação macromolécula-ligante ocorre por *quenching* dinâmico, o espectro de absorção por UV-vis da OVA não é alterado na presença das sulfonamidas, uma vez que este é causado em grande parte por colisões entre o fluoróforo no estado excitado (presente na proteína) e o ligante. Entretanto, quando a interação entre a proteína e o ligante ocorre preferencialmente por *quenching* estático, alterações na estrutura da OVA na presença das sulfonamidas ocorrem, pois, mudanças associadas à formação dos complexos supramoleculares no estado fundamental são observadas no espectro de absorção por UV-vis (Tabela 5). Estes dados confirmam os resultados obtidos por fluorescência molecular. Resultados similares foram obtidos para S2, S3 e S4 e são mostrados na Figura 11b, 11c e 11d, respectivamente. As variações nos valores de absorvâncias são apresentadas na Tabela 5. Os resultados obtidos no presente estudo (OVA-sulfonamidas) estão de acordo com o trabalho desenvolvido por Dantas e colaboradores (2017) (OVA-tetraciclina).

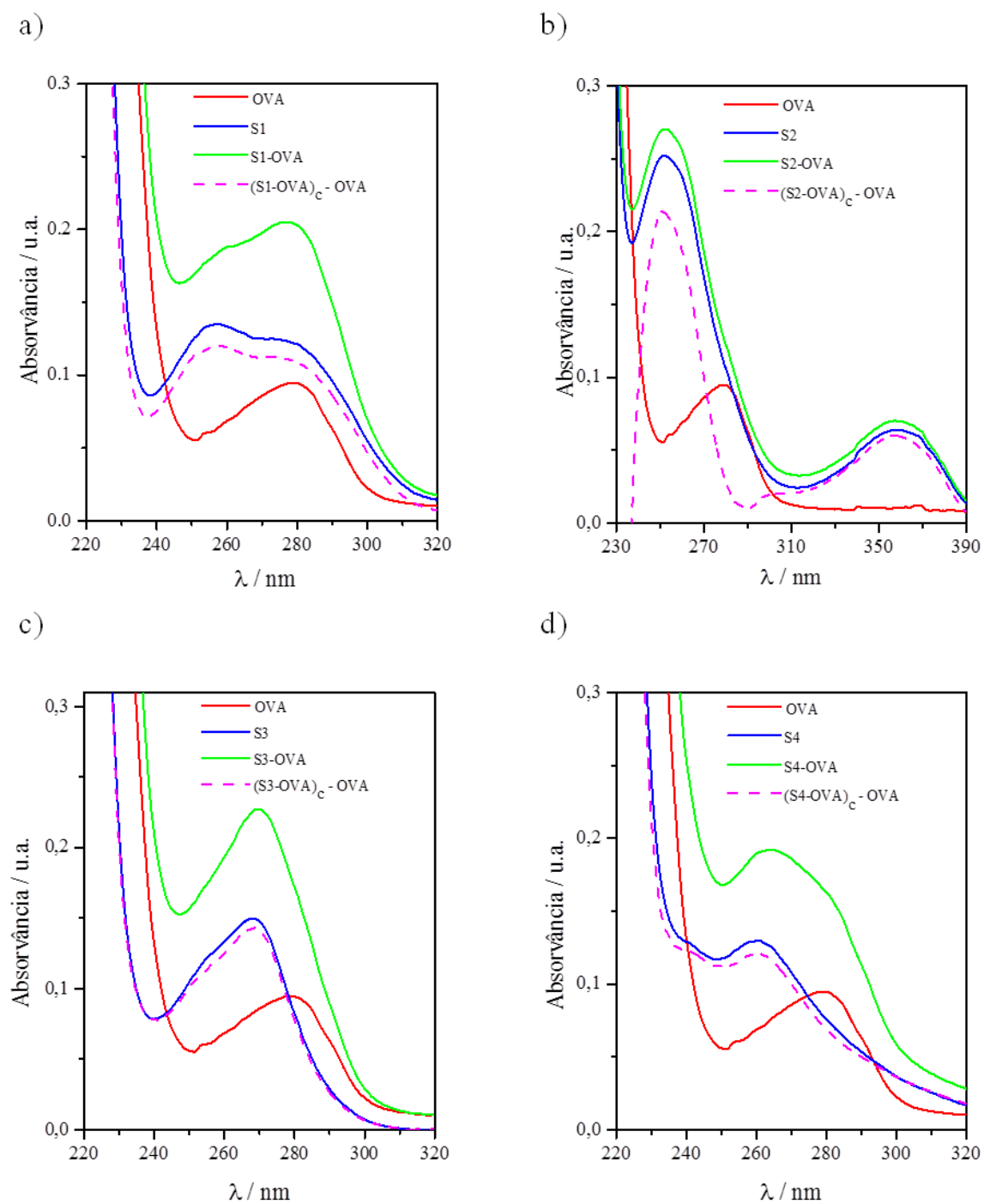
Tabela 5- Valores de absorvância para as sulfonamidas avaliadas, OVA e complexos OVA-sulfonamidas. Condições: OVA (3 μ M), sulfonamidas (6 μ M), tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4 e 30°C.

Ligante	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	A_{ligante}	A_{OVA}	Comparação		ΔA^*
				$A_{\text{composto}} + A_{\text{oval}}$	A_{complexo}	
S1	280 (P)	0,1212	0,0944	0,2156	0,2029	- 0,0127
	257 (L)	0,1352	0,0627	0,1979	0,1831	- 0,0148
	278 (PL)	0,1227	0,0943	0,2170	0,2048	- 0,0122
S2	280 (P)	0,1058	0,0944	0,2002	0,1221	- 0,0781
	252 (L)	0,2523	0,0552	0,3075	0,2701	- 0,0374
	253 (PL)	0,2517	0,0598	0,3115	0,2705	- 0,0410
S3	280 (P)	0,0821	0,0944	0,1765	0,1714	- 0,0051
	268 (L)	0,1501	0,0825	0,2326	0,2260	- 0,0066
	269 (PL)	0,1496	0,0844	0,2340	0,2275	- 0,0065
S4	280 (P)	0,0757	0,0944	0,1701	0,1629	- 0,0072
	261 (L)	0,1299	0,0699	0,1998	0,1907	- 0,0091
	264 (PL)	0,1259	0,0752	0,2011	0,1924	- 0,0087

Nota: P = proteína / L= ligante / PL = complexo proteína-ligante / $\Delta A = A_{\text{complexo}} - (A_{\text{ligante}} + A_{\text{OVA}})$.

Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Figura 11- Espectros de absorção por UV-vis para os sistemas contendo a) Sulfatiazol (S1), b) Sulfaquinoxalina (S2), c) Sulfadimetoxina (S3) e d) Sulfametazina (S4). Condições: OVA (3 μ M), sulfonamidas (6 μ M), tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4 e 30°C.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

5.3. Avaliação de mudanças conformacionais na ovalbumina

5.3.1. Fluorescência tridimensional (3D)

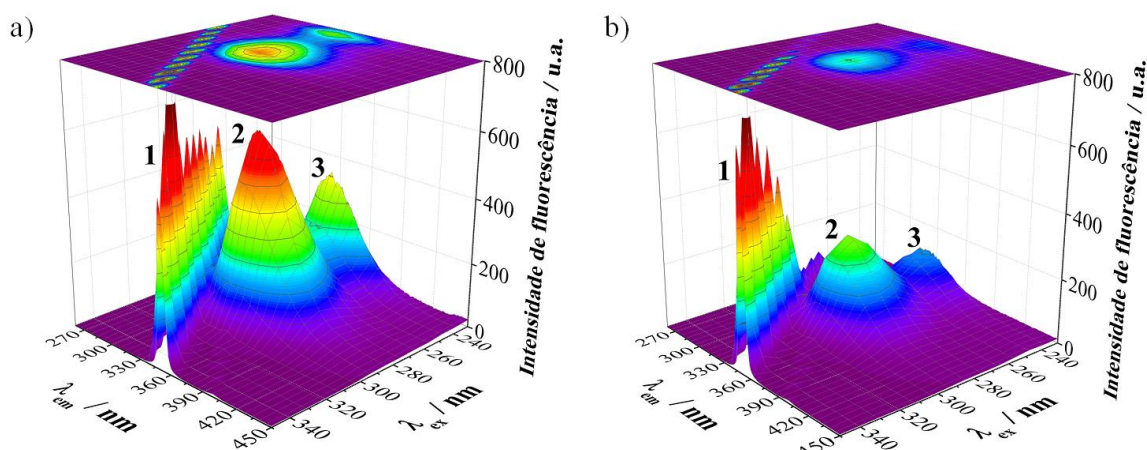
Para avaliar possíveis alterações conformacionais na estrutura secundária de proteínas e no microambiente de seus fluoróforos (triptofano e tirosina) na presença de ligantes foi realizado um estudo utilizando a fluorescência tridimensional (3D), a qual vem sendo utilizada nos últimos anos para esta finalidade (SAEIDIFAR et al., 2015). Assim, através desta técnica, informações abrangentes acerca da fluorescência da OVA na ausência e na presença das diferentes sulfonamidas foram obtidas. Os espectros de fluorescência 3D obtidos para a OVA na ausência e presença de S1 são mostrados na Figura 12. Os espectros referentes à OVA na ausência e presença de S2, S3 e S4 estão apresentados no APÊNDICE II. Os principais parâmetros associados aos espectros 3D obtidos quanto à posição e intensidade dos picos de máxima emissão de fluorescência e efeito Stokes foram sumarizados na Tabela 6. Os espectros de emissão de fluorescência 3D possuem três picos principais característicos: (1) relacionado ao espalhamento Rayleigh do solvente sempre que $\lambda_{ex} = \lambda_{em}$; (2) relacionado à fluorescência intrínseca dos resíduos de aminoácidos de triptofano e tirosina contidos na OVA e (3) relativo à fluorescência da cadeia polipeptídica da proteína, proveniente das transições $\pi \rightarrow \pi^*$ das carbonilas amídicas (NHC=O) presentes nos resíduos de aminoácidos (ZHANG et al., 2008).

Ao comparar os gráficos da OVA livre (Figura 12a) e OVA-S1 (Figura 12b) é possível observar que na presença da sulfonamida há uma diminuição na fluorescência referente ao pico 2 de 52% e ao pico 3 de 59% após adição de S1 indicando, portanto, que a estrutura secundária da proteína é alterada na presença do ligante e, conseqüentemente, os efeitos alérgicos da OVA presente em ovos provenientes de frangos tratados com sulfonamidas pode ser potencializado (LU et al., 2009). Mudanças espectrais similares podem ser observadas nos espectros 3D obtidos para a OVA na presença de S2, S3 e S4. Para S2, os picos 2 e 3 foram reduzidos em 42 e 69%, respectivamente. Para S3 observou redução de 35 e 64%, enquanto que para S4, 45 e 71% de redução para os picos 2 e 3 respectivamente.

Estes resultados estão de acordo com os trabalhos desenvolvidos por Wang e colaboradores (2013) e Wang e colaboradores (2014) em que foi avaliada por fluorescência 3D a interação da OVA com a cafeína e a interação da HSA com sulfametoxazol, respectivamente. Em ambos os trabalhos, a presença do ligante resultou

na redução da intensidade de fluorescência dos picos 2 (fluoróforo) e 3 (cadeia polipeptídica da OVA). Além disso, os dados de fluorescência 3D corroboram com os resultados obtidos anteriormente, uma vez que a ordem de redução do pico 2 é semelhante a ordem de magnitude de interação citada.

Figura 12- Espectros de fluorescência tridimensional (3D) para a) OVA, b) OVA + S1. Condições: OVA (2 μ M), S1 (40 μ M), tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4 e 30°C.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Tabela 6- Parâmetros associados ao espectro de fluorescência tridimensional para a interação entre OVA e as sulfonamidas avaliadas. Condições: OVA (2 μ M), S1 (40 μ M), tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4 e 30°C.

Sistema	Pico	Descrição	Posição ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$)	Deslocamento Stokes $\Delta\lambda$ (nm)	Intensidade de fluorescência (% de redução)
OVA	1	Espalhamento Rayleigh	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	-
	2	Trp e Tir	285 / 335	50	575 (100%)
	3	Cadeia polipeptídica	238 / 335	97	360 (100%)
OVA-S1	1	Espalhamento Rayleigh	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	-
	2	Trp e Tir	285 / 332	47	277 (52%)
	3	Cadeia polipeptídica	238 / 340	102	148 (59%)
OVA-S2	1	Espalhamento Rayleigh	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	-
	2	Trp e Tir	285 / 332	47	336 (42%)
	3	Cadeia polipeptídica	238 / 335	97	111 (69%)
OVA-S3	1	Espalhamento Rayleigh	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	-
	2	Trp e Tir	285 / 337	52	372 (35%)
	3	Cadeia polipeptídica	238 / 337	99	131 (64%)
OVA-S4	1	Espalhamento Rayleigh	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	-
	2	Trp e Tir	285 / 335	50	345 (45%)
	3	Cadeia polipeptídica	238 / 336	98	103 (71%)

Fonte: elaborado pela autora, 2017.

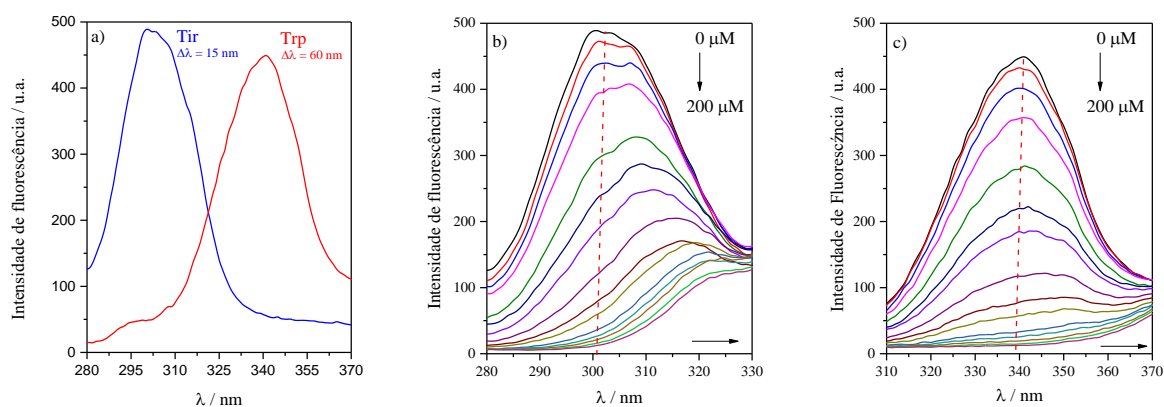
5.3.2. Fluorescência Sincronizada

Para monitorar separadamente os resíduos de triptofano (Trp) e tirosina (Tir) presentes na OVA, e verificar se ocorrem alterações no microambiente destes aminoácidos na presença de diferentes concentrações das sulfonamidas, foram realizados estudos com base na técnica de fluorescência sincronizada. Para tal, se manteve constante um determinado intervalo de comprimento de onda entre os monocromadores de excitação e emissão ($\Delta\lambda$). Desta maneira, $\Delta\lambda$ foi estabelecido em 15 e 60 nm, que são variações características para avaliar os resíduos de tirosina e triptofano, respectivamente (Figura 13a) (WANG et al., 2013).

Os espectros referentes à titulação da OVA pela sulfonamida S1 obtidos quando $\Delta\lambda = 15$ e 60 nm, estão apresentados na Figura 13b e 13c, respectivamente. Ao aumentar a concentração de S1 houve redução na intensidade de fluorescência para os resíduos de Tir e Trp, além disso, se observou deslocamentos para o vermelho de 21 ($\Delta\lambda = 15$ nm) e 9 nm ($\Delta\lambda = 60$ nm) relativo ao comprimento de onda máximo de emissão (Tabela 7). Adicionalmente, pode-se inferir que o microambiente destes resíduos de aminoácidos foi alterado com aumento da polaridade devido a uma maior exposição à água, resultante da mudança conformacional da OVA na presença do ligante (HAN et al., 2016). Resultados similares foram obtidos para a interação da OVA com as outras sulfonamidas e são sumarizados no APÊNDICE III.

A partir dos valores de K_{SV} calculados (Tabela 7) é observado que os resíduos de triptofano influenciam mais no processo de interação quando comparados com os resíduos de tirosina, uma vez que para todas as sulfonamidas avaliadas, o valor de K_{SV} é maior para o triptofano, indicando que estes resíduos (Trp160, Trp194 e Trp275) devem estar mais próximos ao sítio de ligação do complexo entre a proteína e as sulfonamidas (LI et al., 2016; STEIN et al., 1991). Adicionalmente, a magnitude dos valores de K_{SV} para cada um dos sistemas OVA-Sulfonamidas estão de acordo com os dados de K_b citados anteriormente.

Figura 13- a) Espectro de emissão sincronizado para os resíduos de tirosina ($\Delta\lambda = 15$ nm) e triptofano ($\Delta\lambda = 60$ nm) da OVA livre. Titulação empregando fluorescência sincronizada para o resíduo de b) tirosina e o resíduo de c) triptofano com adição de S1. Condições: OVA (2 μ M), S1 (0 - 200 μ M), tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4 e 30°C.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Tabela 7- Valores de K_{SV} relativos a titulação por fluorescência sincronizada entre OVA e as sulfonamidas avaliadas. Condições: OVA (2 μ M), S1 (0 - 200 μ M), tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4 e 30°C.

Sulfonamidas	$\Delta\lambda$ (nm)	Varição de máxima no λ_{em} (nm)	K_{sv} (10^4 L mol $^{-1}$)
S1	15	+21	$3,52 \pm 0,10$
	60	+9	$3,72 \pm 0,21$
S2	15	+9	$2,24 \pm 0,10$
	60	+9	$3,10 \pm 0,24$
S3	15	+11	$1,55 \pm 0,06$
	60	+14	$1,59 \pm 0,07$
S4	15	+8	$1,78 \pm 0,07$
	60	+10	$1,80 \pm 0,01$

Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Trabalhos similares de interação desenvolvidos por Lu e colaboradores (2009) (OVA-quercetina) e Ali e colaboradores (2014) (HSA-sulfadiazina) mostram que por fluorescência sincronizada foi possível investigar mudanças conformacionais na proteína. Os resultados obtidos no presente estudo (OVA-sulfonamidas) estão de acordo com ambos os trabalhos citados anteriormente, pois ao aplicar um $\Delta\lambda = 15$ e 60 nm houve um deslocamento para o vermelho do comprimento de onda máximo, indicando que o microambiente dos fluoróforos tornou-se mais polar.

5.4. Ensaio de transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET)

O ensaio empregando FRET é utilizado para medir a distância entre o doador (fluoróforos da OVA) e o receptor (ligantes) envolvidos no processo de interação

(NAIK et al., 2010). A eficiência do processo de FRET depende principalmente dos seguintes fatores (HONGWEY et al., 2005): (i) sobreposição entre o espectro de emissão de fluorescência da OVA (doador) e o espectro de absorção das sulfonamidas (receptor) (Figura 14); (ii) orientação relativa dos dipolos do doador e receptor; (iii) distância (r_0) entre a OVA e a molécula receptora de energia (1-10 nm).

De acordo com a teoria de transferência de energia de Förster, o valor da energia transferida (E) envolvida no processo de interação da OVA com uma determinada sulfonamida é calculada a partir da Equação 5 (RANJBAR et al., 2013):

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r_0^6} \quad \text{Equação (5)}$$

onde F e F_0 são as intensidades de fluorescência da OVA na presença e na ausência das sulfonamidas, respectivamente, e R_0 é a distância crítica quando a eficiência de transferência de energia equivale a 50%, sendo calculada a partir da seguinte equação (RANJBAR et al., 2013):

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \Phi J \quad \text{Equação (6)}$$

Sendo K^2 o fator de orientação espacial que descreve a geometria dos dipolos do doador e receptor de energia ($K^2 = 2/3$ para alinhamento aleatório), N é o índice de refração do meio ($N = 1,36$), Φ é o rendimento quântico da OVA livre ($\Phi = 0,118$) e J é a integral de sobreposição do espectro de emissão de fluorescência da OVA e espectro de absorção dos ligantes dado por (HONGWEY et al., 2005; LU et al., 2009; SARKAR et al., 2013):

$$J = \frac{\int_0^\infty F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F(\lambda) dy} \quad \text{Equação (7)}$$

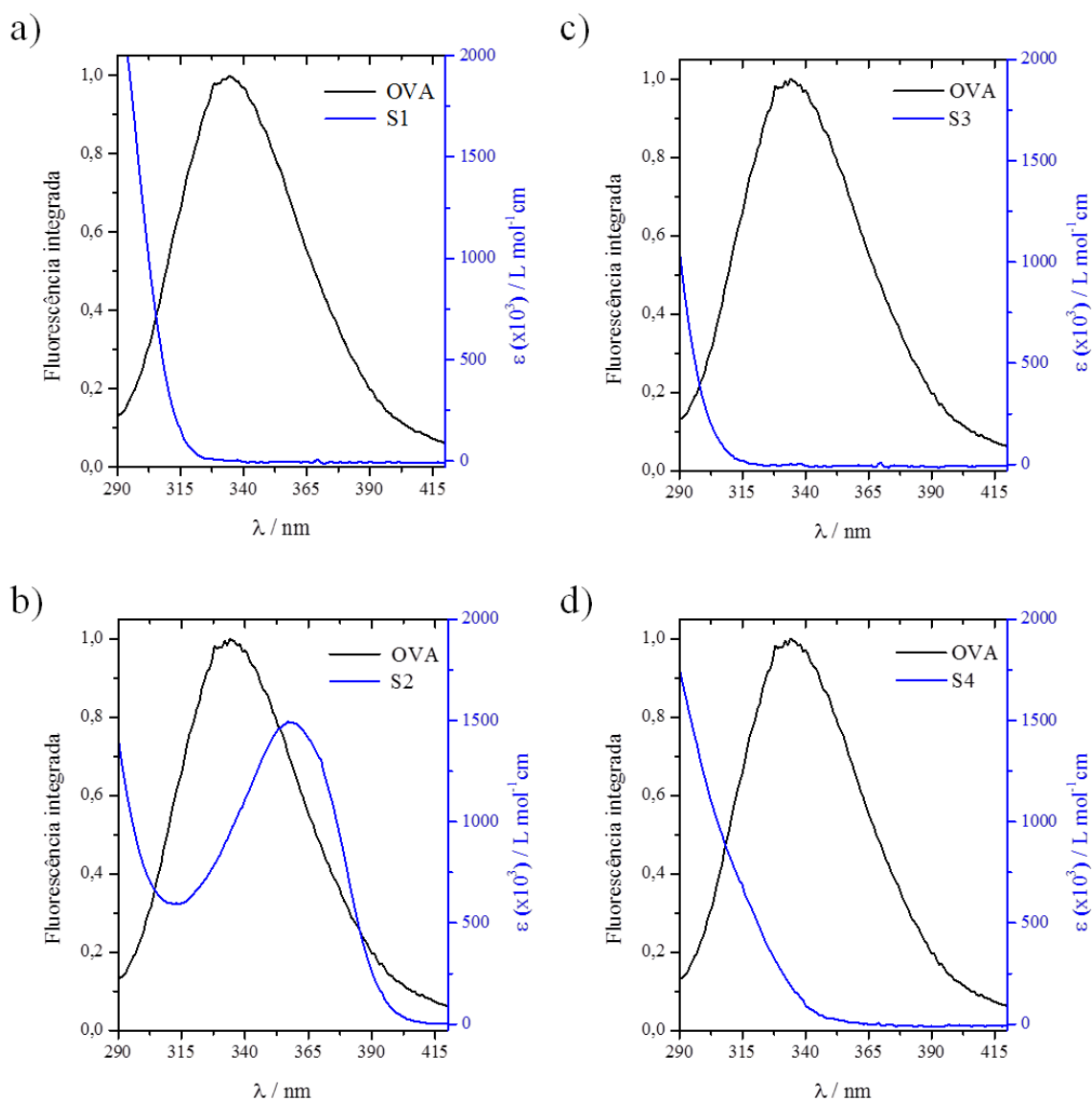
Em que $F(\lambda)$ é a intensidade de fluorescência normalizada da OVA enquanto $\varepsilon(\lambda)$ é o coeficiente de absorção molar das sulfonamidas no comprimento de onda λ . Através das equações (5-7) foi possível obter os parâmetros do estudo de FRET (J, R_0 , E e r_0) que estão apresentados na Tabela 8.

Pôde-se observar que a distância crítica de Förster (R_0) e a distância entre os resíduos de triptofano da OVA e as sulfonamidas (r_0) estão entre 1 e 2 nm, indicando

que à transferência de energia entre a OVA e as sulfonamidas, acontece com alta probabilidade, pois tais valores estão entre 1-10 nm (HONGWEY, 2005). Além disso, também foi observado que para todos os sistemas de interação avaliados a transferência de energia, E , foi inferior a 50% e, portanto, $R_0 < r_0$, concordando com os resultados obtidos (SARKAR, 2013).

Por fim, os valores de r_0 obtidos para os sistemas de interação avaliados neste estudo são próximos aos resultados obtidos em trabalhos desenvolvidos por outros autores (Tabela 9).

Figura 14- Sobreposição espectral da emissão de fluorescência da OVA com o espectro de absorção de a) S1, b) S2, c) S3 e d) S4. Condições: OVA (2 μM), sulfonamidas (10 μM), tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4 e 30°C.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Tabela 8- Parâmetros de FRET da interação entre as sulfonamidas e a OVA.

Sulfonamidas	J ($10^{-16} \text{ cm}^3 \text{ L mol}^{-1}$)	R_0 (nm)	E (%)	r_0 (nm)
S1	2,60	1,32	29,7	1,52
S2	13,6	1,74	33,5	1,95
S3	1,78	1,24	25,8	1,48
S4	3,78	1,40	27,4	1,65

Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Tabela 9- Comparação de valores de r_0 obtidos em outros estudos com o trabalho proposto. Condições: OVA (2 μM), sulfonamidas (10 μM), tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4 e 30°C.

Proteína	Ligante	r_0 (nm)	Referência
BSA	Sulfametazina	2,73	Bani-Yaseen, 2011.
HSA	Sulfametazina	3,07	Chen et al., 2012.
OVA	Diprofilina	2,23	Wang et al., 2013.
	Cafeína	2,25	
	Teofilina	2,20	
OVA	Tetraciclina	3,11	Dantas et al., 2017.
OVA	Sulfatiazol	1,52	Este trabalho
	Sulfaquinoxalina	1,95	
	Sulfadimetoxina	1,48	
	Sulfametazina	1,65	

Fonte: elaborado pela autora, 2017.

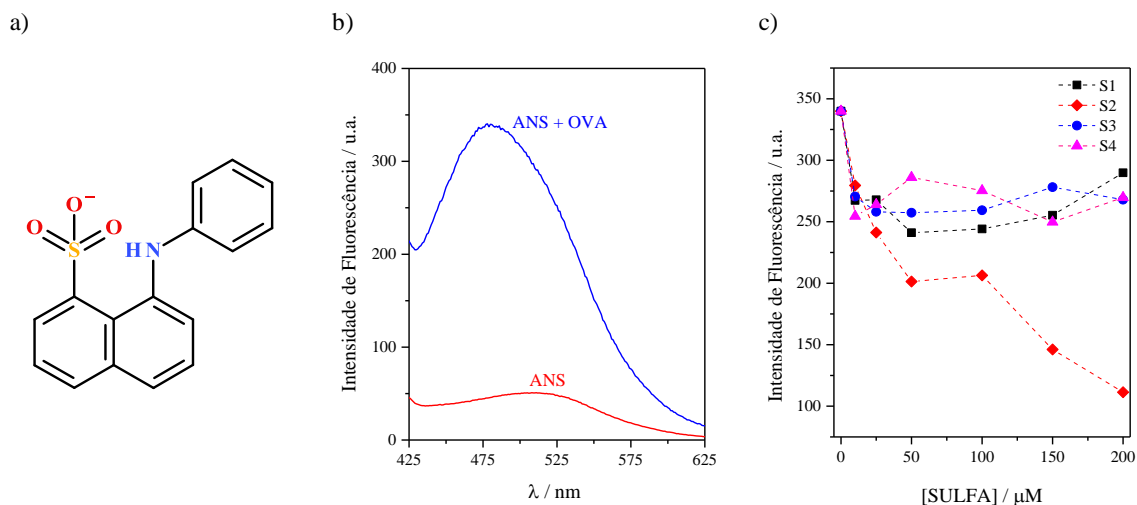
5.5. Estudo de competição: interação com a sonda ANS (ácido 8-anilino-1-naftaleno-sulfonato) e com íons metálicos

5.5.1. ANS

A sonda orgânica ANS (Figura 15a) é bastante utilizada na análise de proteínas, pois apesar de possuir baixa fluorescência intrínseca em meio aquoso, a intensidade de emissão de fluorescência aumenta quando o ANS se liga em regiões hidrofóbicas destas macromoléculas (Figura 15b) (SCHÖNBRUNN et al., 2000). Desse modo, o ANS foi utilizado como uma espécie competidora no processo de interação entre a OVA e as sulfonamidas, com o objetivo de avaliar se o sítio preferencial de ligação ocorre em regiões hidrofóbicas da OVA. Para isso, avaliou-se o efeito da adição de diferentes concentrações das sulfonamidas no sistema OVA-ANS, uma vez que se o sítio de ligação das sulfonamidas na proteína for próximo ou similar ao do ANS, ocorrerá uma competição e, dessa maneira, os ligantes podem afetar a intensidade de fluorescência do sistema OVA-ANS (ANDREWS et al., 2012).

A partir da Figura 15c p \hat{o} de-se avaliar a influ \hat{e} ncia da adi \hat{c} o das diferentes concentra \hat{c} es das sulfonamidas ao sistema OVA-ANS. Ao se adicionar as sulfonamidas, a emiss \hat{a} o de fluoresc \hat{e} ncia diminui, entretanto a redu \hat{c} o \acute{e} mais efetiva com a adi \hat{c} o da sulfaquinoxalina (S2), em compara \hat{c} o aos outros compostos avaliados. De acordo com Guan e colaboradores (2014) isto indica que o processo de intera \hat{c} o OVA-S2 ocorre preferencialmente em regi \hat{o} es hidrof \hat{o} bicas, pois esta sulfonamida possivelmente desloca o ANS da regi \hat{o} o de liga \hat{c} o ou ainda inibe a transfer \hat{e} ncia de energia dos fluor \hat{o} foros da OVA para os ligantes (sulfonamidas). Adicionalmente, isto tamb \acute{e} m pode ser explicado por meio dos valores do coeficiente de parti \hat{c} o (logP), que \acute{e} uma medida quantitativa da lipofilicidade de compostos org \hat{n} icos (MEYLAN, 1994). Para S1, S2, S3 e S4 os valores de logP foram obtidos atrav \acute{s} do programa Molinspiration Cheminformatics sendo iguais a 0,83, 1,70, 0,75 e 0,84 respectivamente. Assim, sabendo que quanto maior o valor de logP mais hidrof \hat{o} bico \acute{e} o composto, verifica-se que S2 \acute{e} a sulfonamida que possui uma estrutura molecular mais hidrof \hat{o} bica em rela \hat{c} o \grave{a} s outras, possibilitando, portanto, uma maior intera \hat{c} o em regi \hat{o} es hidrof \hat{o} bicas da OVA e, conseq \hat{u} entemente, o deslocamento do ANS dessas regi \hat{o} es de liga \hat{c} o. Desta forma, \acute{e} pertinente inferir que as outras sulfonamidas avaliadas interagem preferencialmente em s \acute{i} tios mais hidrof \hat{i} licos, diferindo da S2.

Figura 15- a) Estrutura qu \acute{i} mica do ANS, b) Intensidade de fluoresc \hat{e} ncia do ANS na aus \hat{e} ncia e na presen \hat{c} a da OVA, c) Intensidade de fluoresc \hat{e} ncia do sistema ANS-OVA na presen \hat{c} a de diferentes concentra \hat{c} es das sulfonamidas avaliadas. Condi \hat{c} es: OVA (2 μ M), ANS (4 μ M) sulfonamidas (0 - 200 μ M), tamp \hat{a} o Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4 e 30 $^{\circ}$ C.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

5.5.2. Competição com íons metálicos

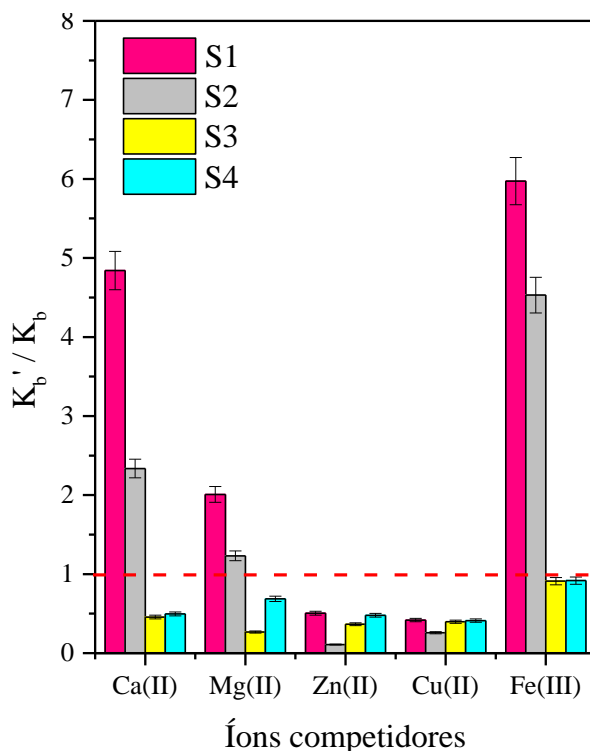
O ovo é um alimento de alto valor nutricional, pois em sua composição há vários nutrientes importantes para a saúde humana, entre eles proteínas, vitaminas e sais minerais (AGUIAR et al., 2009). Contudo, segundo Saldanha e colaboradores (2009), no Brasil já existe a prática de adicionar níveis excessivos de sais minerais, como cálcio (Ca), zinco (Zn), cobre (Cu) e ferro (Fe), na dieta de aves, para prevenir deficiências que podem ser causadas por possíveis interações entre estes minerais e outros componentes, que os tornam indisponíveis.

Sabendo disso, este estudo foi realizado para avaliar a influência de íons metálicos que podem estar presentes no ovo (Ca(II), Mg(II), Cu(II), Zn(II) e Fe(III)) sobre o processo de interação das diferentes sulfonamidas com a OVA a pH 7,4 e 30 °C. Para tal, a razão entre as constantes de ligação na presença do íon competidor (K_b') e na ausência (K_b) foi considerada como parâmetro de comparação (Figura 10). Quando $K_b'/K_b < 1$ pode-se inferir que a presença do íon desfavorece a formação do complexo entre a OVA e a sulfonamida, entretanto quando $K_b'/K_b > 1$, indica que o processo de interação entre a macromolécula e o ligante é favorecido.

Na Figura 16 é mostrado que a presença de Ca(II), Mg(II) e Fe(III) favoreceram o processo de interação entre a OVA com S1 e S2, isto possivelmente pode estar associado a mudança conformacional da proteína induzida pela ligação destes íons a grupos presentes na sua cadeia polipeptídica, como por exemplo fosfatos e sulfetos, favorecendo a formação do complexo (YANG et al., 2015). Porém, Cu(II) e Zn(II) desfavoreceu a formação destes complexos para todas as sulfonamidas avaliadas, provavelmente devido a formação de complexos metálicos entre as sulfonamidas e estes cátions (ROCHA et al., 2011). Adicionalmente, para S3 e S4 a presença de todos os íons desfavoreceu a interação com a proteína.

Portanto, quando a constante de ligação dos sistemas de interação aumenta na presença dos íons metálicos avaliados, pode-se inferir que a adição destes possa alterar a estrutura da OVA tornando mais favorável a interação da proteína com os ligantes. Contudo, quando a adição de íons resulta na diminuição da constante de ligação indica que houve competição entre o íon e o ligante pelo mesmo sítio de ligação da macromolécula ou que o íon interage com o ligante tornando a interação OVA-ligante menos favorável.

Figura 16- Efeito da presença de íons metálicos no processo de interação entre a OVA e as sulfonamidas. Condições: Proteína e competidores (2 μM), sulfonamidas (0 - 200 μM), tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4 e 30°C.



Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

5.6. Estudo de interação das sulfonamidas com a proteína comercial e *in natura*

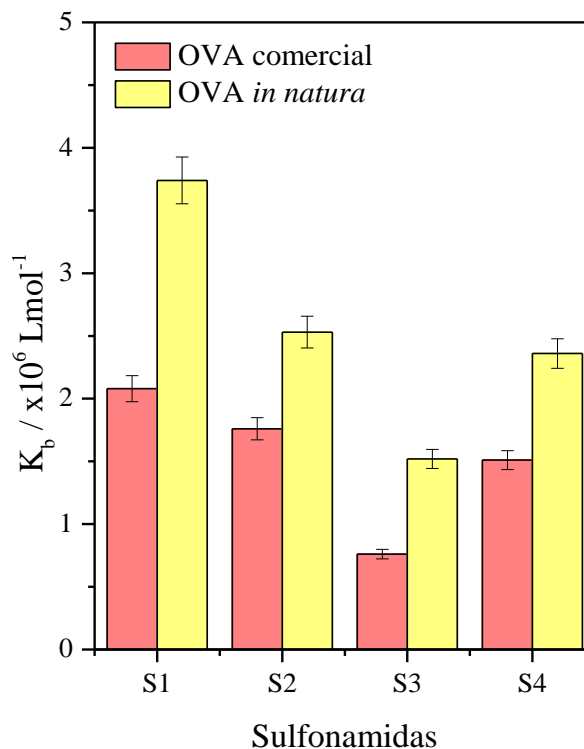
Este estudo foi realizado para avaliar a interação das sulfonamidas com a proteína *in natura* e comparar com a interação destes ligantes com a ovalbumina comercial. A concentração das soluções de OVA preparada a partir da proteína comercial e *in natura* foi determinada pela razão do sinal de absorvância a 280 nm e coeficiente de extinção molar de $30957 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (BHATTACHARYA & MUKHOPADHYAY, 2012). Assim, empregando titulação espectrofluorimétrica foi possível obter as constantes de ligação (K_b) para os diferentes sistemas.

Para todas as sulfonamidas os valores de K_b foram maiores para os processos de interação com a OVA *in natura* (clara do ovo) (Figura 17). Possivelmente isto ocorre porque a clara do ovo é uma matriz mais complexa, possuindo diversos componentes, como outras macromoléculas (proteínas, lipídios e carboidratos), que podem favorecer a interação. Além disso, foi observado que a ordem de afinidade de interação das sulfonamidas foi a mesma ($S1 > S2 > S4 > S3$) para ambos os sistemas.

Portanto, verificou-se que as sulfonamidas interagem com a ovalbumina, independente da forma como esta se encontra no sistema, comercial (pura) ou *in natura*

(clara do ovo). Uma vez que ocorre a interação, leva a mudanças conformacionais na cadeia polipeptídica da OVA o que pode potencializar a ocorrência de possíveis reações alérgicas para os consumidores deste alimento.

Figura 17- Comparação das constantes de ligação (K_b) do processo de interação das sulfonamidas com a OVA comercial e *in natura*. Condições: OVA comercial e *in natura* (2 μM), sulfonamidas (0-200 μM), tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4 e 30°C.



Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

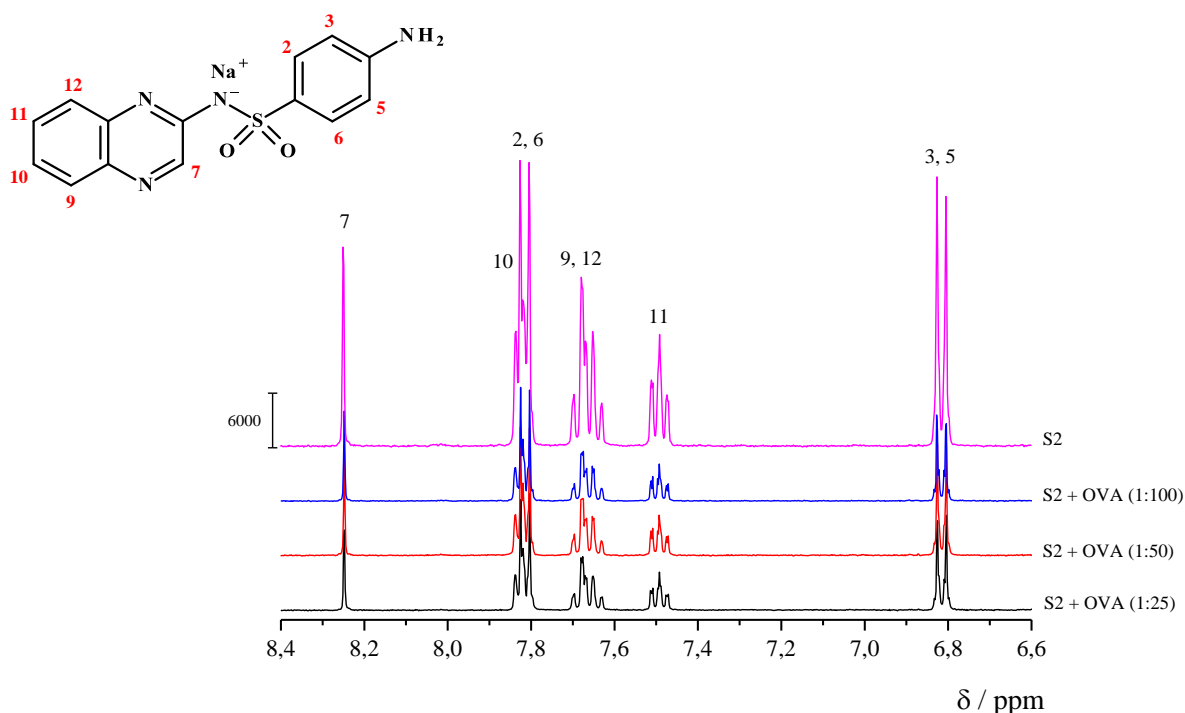
5.7. Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H)

Por fluorescência molecular e UV-vis foi possível avaliar a interação da OVA com as diferentes sulfonamidas monitorando as mudanças que ocorrem na cadeia polipeptídica da proteína na presença do ligante. Porém, para monitorar possíveis mudanças nos ligantes (sulfonamidas) decorrentes da formação do complexo supramolecular com a macromolécula utilizou-se a espectroscopia de RMN ^1H que é uma técnica bastante útil para estudos de interação proteína-ligante, pois permite mapear o epítipo (superfície de contato) de interação entre o ligante e a macromolécula (FIGUEIREDO & MARSALOLI, 2007).

Desta maneira, realizou-se o monitoramento do deslocamento químico (δ) dos sinais de hidrogênio dos ligantes por RMN ^1H através do perfil espectral. Inicialmente, foram obtidos os espectros de RMN ^1H da sulfaquinoxalina (S2) na ausência e presença

da OVA em três concentrações diferentes (Figura 18). Esta sulfonamida foi escolhida para os estudos iniciais devido a sua solubilidade em água ($7,5 \text{ mg L}^{-1}$) ser inferior à de S1 (373 mg L^{-1}), S3 (343 mg L^{-1}) e S4 (1500 mg L^{-1}) (JÚNIOR, 2015), pois uma vez verificado que não ocorre problemas de precipitação nos sistemas OVA-S2 com diferentes concentrações da proteína, não haveria problemas com os sistemas formados pela OVA e as outras sulfonamidas.

Figura 18- Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz) da sulfaquinoxalina (S2) na ausência e na presença de diferentes concentrações da ovalbumina (OVA). Condições: S2:OVA (1:25, 1:50 e 1:100), S2 (1 mM) em 10% (v/v) de DMSO- d_6 em tampão fosfato 10 mM com D $_2$ O a pH 7,4.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

A atribuição dos sinais aos respectivos hidrogênios presentes em S2 está de acordo com Turkzan e Medwick (1972) e os deslocamentos químicos do ligante na ausência e na presença das diferentes concentrações da OVA são apresentados na Tabela 10. A partir dos valores de variação de deslocamento químico ($\Delta\delta$) calculados pôde-se observar que os hidrogênios que estão provavelmente envolvidos na interação OVA-S2 são os aromáticos (2, 6, 3, 5, 7, 9 e 12) indicando que possivelmente a parte aromática e central de S2 interage com os resíduos de aminoácidos da cadeia polipeptídica da proteína. Estes resultados corroboram com o tipo de forças preferenciais envolvidas neste processo de interação para S2, são elas: força de Van der

Waals e ligação de hidrogênio, uma vez que ligações de hidrogênio ocorrem possivelmente com o grupo sulfóxido (SO_2) e $-\text{NH}_2$ e as forças de Van der Waals com os grupos aromáticos da molécula.

Além disso, também foi observado que na presença da OVA, ocorreu redução dos sinais relativos aos hidrogênios monitorados, indicando que a interação proteína-ligante ocorre. Isto acontece devido à redução do tempo de relaxação (T_1) do ligante na presença da macromolécula, pois moléculas de alto peso molecular, como as proteínas, possuem rápida velocidade de relaxação e, dessa forma, as sulfonamidas ao interagir com a OVA adquire suas propriedades e, conseqüentemente, tem sua velocidade de relaxação reduzida, resultando nas mudanças espectrais (BOJKO, 2009).

Tabela 10- Deslocamento químico (δ) do RMN ^1H (400 MHz) de S2 na ausência e presença de diferentes concentrações de OVA em tampão fosfato 10 mM em D_2O a pH 7,4.

Hidrogênio	δ / ppm					
	S2 ^a	S2 ^b	S2-OVA			$\Delta\delta^c$
			1:100	1:50	1:25	
2, 6	7,80	7,813	7,812	7,812	7,811	+ 0,002
3, 5	6,65	6,817	6,816	6,816	6,815	+ 0,002
7	8,65	8,251	8,248	8,248	8,247	+ 0,004
9, 12		7,670	7,667	7,667	7,666	+ 0,004
10	7,4 – 8,1	7,836	7,837	7,837	7,837	- 0,001
11		7,492	7,493	7,493	7,492	0,000

Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Nota: ^a δ para S2 em $\text{DMSO}-d_6$ por Turkzan e Medwick (1972) / ^b δ para S2 neste trabalho / ^c $\Delta\delta$ foi calculado baseado na diferença entre $\delta(\text{S2})$ e $\delta(\text{S2:OVA} = 1:25)$.

Similarmente obteve-se os espectros do sulfatiazol (S1), sulfadimetoxina (S3) e sulfametazina (S4) na ausência e na presença da OVA (1:25). A atribuição dos sinais aos respectivos hidrogênios presentes em S1, S3 e S4 está de acordo com Bellú et al. (2003), Hong e Jo (2008), Huynh et al. (2006), respectivamente. Os espectros de RMN ^1H e os dados dos deslocamentos químicos dos ligantes na ausência e na presença da OVA são apresentados nos APÊNDICES IV, V e VI.

Os valores de $\Delta\delta$ referentes à sulfadimetoxina (S3) na ausência e na presença da macromolécula (1:25) indicam que os hidrogênios 2, 6, 3 e 5 (aromáticos) fazem parte do epítipo da ligação OVA-S3 e, como explicado anteriormente para S2, isto possivelmente ocorre devido as forças preferenciais serem Van der Waals e ligações de hidrogênio. Já para S1 e S4, pôde-se observar que os hidrogênios monitorados

provavelmente não estão envolvidos no processo de interação OVA-S1 e OVA-S4. Estes resultados corroboram com o tipo de força preferencial envolvida nestes processos que são as interações eletrostáticas, pois esta interação deve ocorrer possivelmente no nitrogênio presente na amida sulfônica.

5.8. Atividade biológica – Potencial antimicrobiano

Para avaliar se a interação entre a OVA e as sulfonamidas S1, S2, S3 e S4, interferia ou não na ação biológica destes antibióticos sobre diferentes bactérias *in vitro*, realizou-se uma série de antibiogramas, com diferentes concentrações dos compostos avaliados na presença e ausência da ovalbumina, estabelecendo-se os valores para a MIC. Os valores dos halos de inibição obtidos no ensaio preliminar, testando-se a dosagem de 100 e 50 µg das sulfonamidas e suas associações, são apresentados na Tabela 11.

De acordo com os parâmetros estabelecidos pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, 2007), para que um microrganismo seja sensível à classe das sulfonamidas, os valores do halo de inibição devem ser ≥ 17 mm. No entanto, observou-se no ensaio preliminar que, nas concentrações das sulfonamidas testadas, apenas *E. coli* (bacilos Gram negativos) e *B. megaterium* (bacilos Gram positivos) foram sensíveis (Figuras 19 e 20). As outras bactérias avaliadas mostraram-se resistentes a tais antibióticos (halos de inibição ≤ 12 mm) e aos sistemas contendo antibiótico e OVA. Portanto, os testes relativos para estabelecer os valores de MIC foram efetuados apenas contra *E.coli* e *B. megaterium*.

Para determinar os valores de MIC as dosagens testadas variaram de 0,125 a 50 µg (S1, S2 e S4) e de 0,05 a 25 µg (S3). Os resultados obtidos para a sulfatiazol (S1) são mostrados na Tabela 12, observando-se que, à medida que as dosagens diminuíram, halos de inibição menores foram obtidos. De modo geral, verifica-se que os halos de inibição referentes à atividade antimicrobiana da sulfonamida livre são inferiores quando comparados aos halos obtidos para os sistemas sulfonamidas-OVA (com apenas 50% da concentração). Contudo, apesar deste perfil os valores de MIC na ausência e presença da OVA não variaram independente da bactéria avaliada. Assim, a MIC encontrada para S1 foi igual a 2,5 µg para *E. coli* e 25 µg para *B. megaterium*, pois em concentrações inferiores os halos são < 17 mm. Resultados similares foram obtidos para as demais sulfonamidas e são mostrados no APÊNDICE VII. Para S2, S3 e S4 obteve-

se MIC igual a 1,0; 2,5 e 25 μg para *E. coli*, respectivamente. Enquanto que para *B. megaterium* obteve-se MIC igual a 25 μg para todas as sulfonamidas testadas.

As Figuras 21 e 22 ilustram os halos de inibição referentes a diferentes dosagens de Sulfatiazol contra *E. coli* e *B. megaterium*, respectivamente.

Tabela 11- Média dos diâmetros dos halos de inibição (em mm) do crescimento das bactérias submetidas aos controles e às sulfonamidas e suas interações com OVA. Ofloxacino - OFX (5 µg); DMSO - dimetilsulfóxido; tampão - Tris-HCl (50 mM com NaCl 100 mM a pH 7,4); OVA em tampão (100 µg); S1, S2, S4 (100 µg); S3 (50 µg); interações OVA- S1, OVA-S2, OVA-S4 (50 µg) e OVA-S3 (25 µg).

Cepas bacterianas	OFX	DMSO	Tampão	OVA	S1	S1+OVA	S2	S2+OVA	S3	S3+OVA	S4	S4+OVA
<i>E. coli</i> [*]	33,0 ± 0,0	6,0 ± 2,1	0,0 ± 0,0	-	40,0 ± 0,0	-	32,0 ± 1,4	-	30,0 ± 0,0	-	30,0 ± 0,0	-
<i>E. coli</i> ^{**}	34,0 ± 1,4	5,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	-	39,0 ± 1,4	-	40,0 ± 0,0	-	33,0 ± 4,2	-	34,0 ± 3,5
<i>B. megaterium</i> [*]	33,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	-	20,0 ± 0,0	-	18,0 ± 0,0	-	18,0 ± 0,0	-	18,0 ± 0,0	-
<i>B. megaterium</i> ^{**}	33,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0	-	22,0 ± 0,0	-	21,0 ± 0,0	-	21,0 ± 0,0	-	20,0 ± 0,0
<i>P. aeruginosa</i> [*]	32,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	-	12,0 ± 0,0	-	3,0 ± 0,0	-	0,0 ± 0,0	-	0,0 ± 0,0	-
<i>P. aeruginosa</i> ^{**}	32,0 ± 1,4	11,0 ± 2,1	5,0 ± 0,0	6,0 ± 0,0	-	12,0 ± 0,0	-	12,0 ± 0,0	-	0,0 ± 0,0	-	3,0 ± 0,0
<i>C. glutamicum</i> ^{***}	33,0 ± 1,1	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,7	14,0 ± 1,4	12,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0
<i>K. oxytoca</i> ^{***}	41,0 ± 1,4	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0

Fonte: elaborado pela autora, 2017.

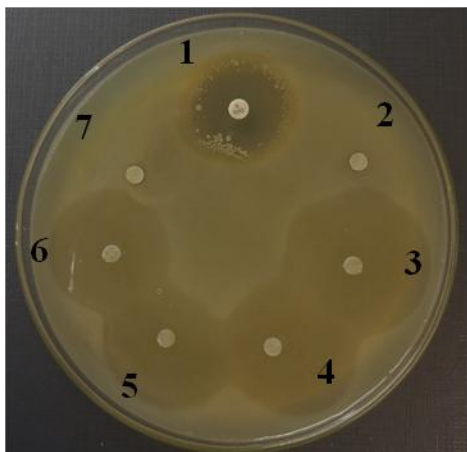
Notas: ^{*}Placas com o padrão, diluentes e sulfonamidas,

^{**}Placas com o padrão, diluentes, OVA e sistemas OVA-sulfonamidas.

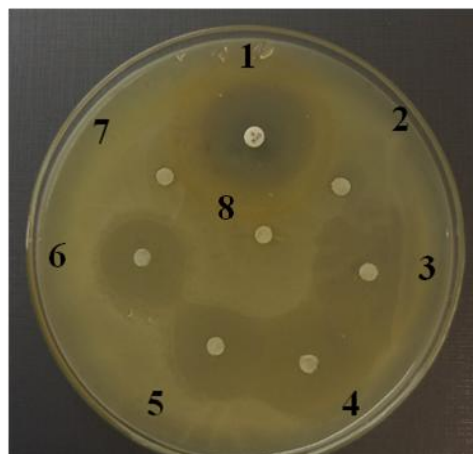
^{***}Placas com o padrão, diluentes, OVA, sulfonamidas e sistemas OVA-sulfonamidas.

Figura 19- Aspecto de antibiograma contra *Escherichia coli*. a) Ofloxacino 5 µg (disco 1), DMSO (disco 2, 40 µL), sulfonamidas 1-4 (discos 3-6, 40 µL= 100 ou 50 µg), tampão (disco 7, 40 µL); b) Ofloxacino 5 µg (disco 1), DMSO (disco 2, 40 µL), interação das sulfonamidas 1-4 com OVA (discos 3-6, 40 µL= 50 ou 25 µg), tampão (disco 7, 40 µL), e OVA (disco 8, 40 µL= 100 µg).

a)



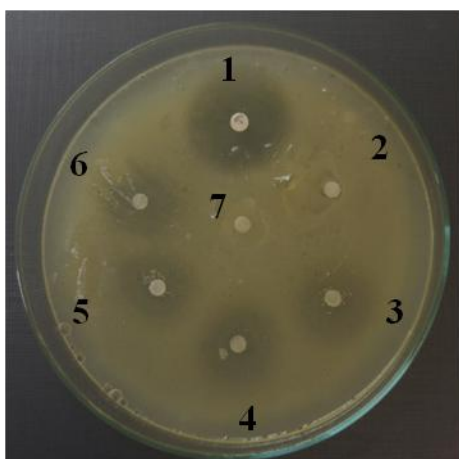
b)



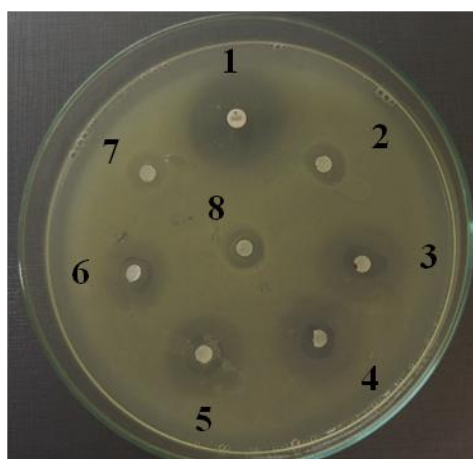
Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Figura 20- Aspecto de antibiograma contra *Bacillus megaterium*. a) Ofloxacino 5 µg (disco 1), DMSO (disco 2, 40 µL), sulfonamidas 1-4 (discos 3-6, 40 µL = 100 ou 50 µg), tampão (disco 7, 40 µL); b) Ofloxacino 5 µg (disco 1), DMSO (disco 2, 40 µL), interação das sulfonamidas 1-4 com OVA (discos 3-6, 40 µL= 50 ou 25µg), tampão (disco 7, 40 µL), e OVA (disco 8, 40 µL = 100 µg).

a)



b)



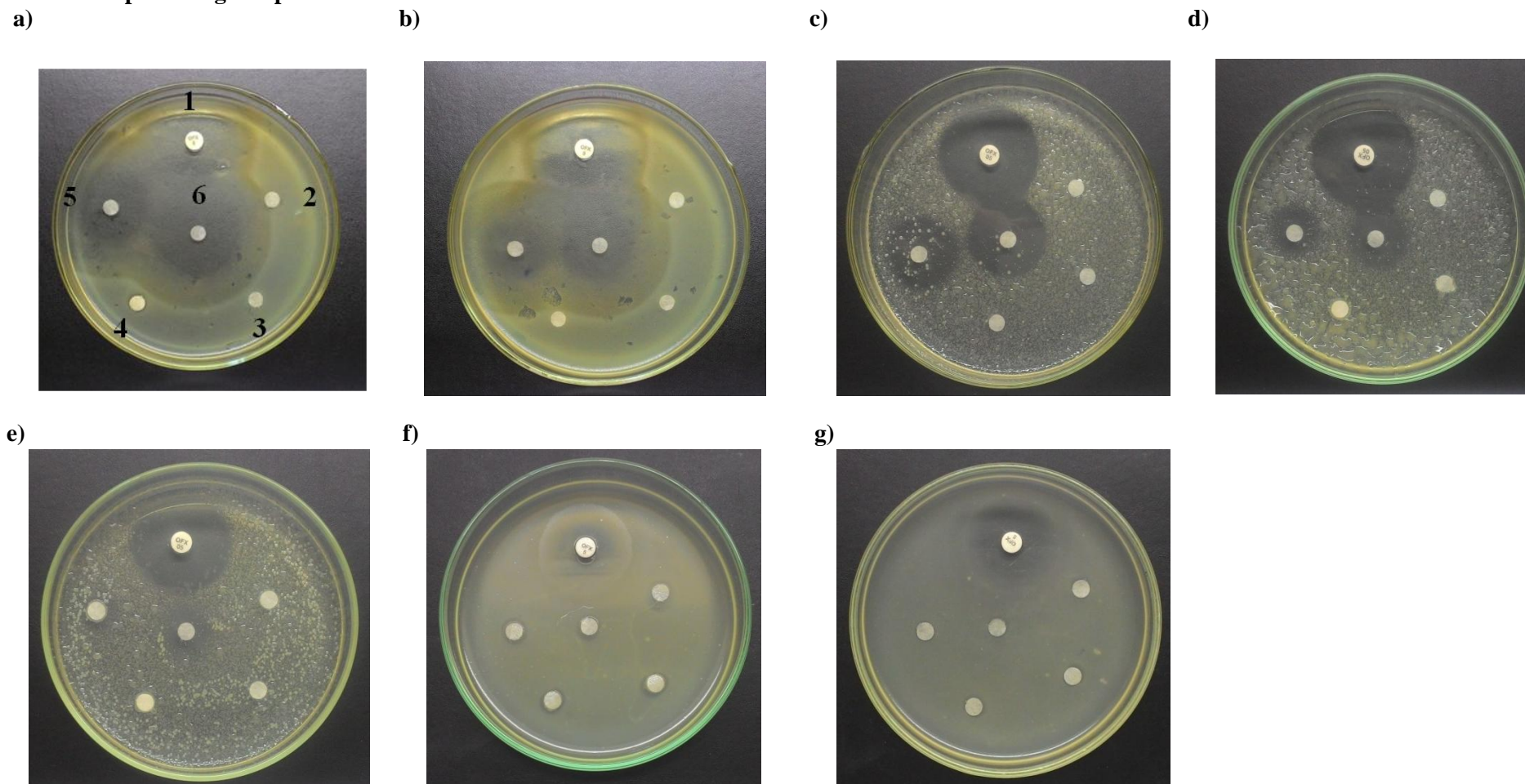
Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Tabela 12- Média dos diâmetros dos halos de inibição (em mm) do crescimento de *E. coli* e *B. megaterium* submetidas aos controles e à sulfatiazol (S1) e suas interações com OVA. Ofloxacino - OFX (5 µg); DMSO; tampão (50 mM com NaCl 100 mM a pH 7,4); OVA em tampão (100 µg); sulfatiazol (S1) - 0,125-50 µg e interações OVA-S1.

Cepas	Diâmetro do halo de inibição (mm)						
	Dosagens (µg)	OFX	DMSO	Tampão	OVA	S1	S1+OVA
<i>E. coli</i> ATCC 25922	50	37,0 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	50,0 ± 0,7	48,0 ± 2,1
	25	30,0 ± 4,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	39,0 ± 2,8	47,0 ± 2,1
	2,5	29,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	22,0 ± 0,0	17,0 ± 2,1
	1,0	29,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	14,0 ± 0,0	9,0 ± 0,7
	0,5	27,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	5,0 ± 0,0
	0,25	23,0 ± 2,1	3,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0
	0,125	24,0 ± 3,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>Bacillus</i> <i>Megate-</i> <i>rium</i>	50	33,0 ± 2,8	5,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0	5,0 ± 0,7	21,0 ± 2,8	20,0 ± 3,5
	25	32,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	4,0 ± 1,4	21,0 ± 0,7	20,0 ± 0,7
	2,5	21,0 ± 0,7	5,0 ± 2,1	2,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0	12,0 ± 0,7	11,0 ± 0,7
	1,0	21,0 ± 2,8	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	10,0 ± 0,7	7,0 ± 1,4
	0,5	18,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,0 ± 0,7	0,0 ± 0,0
	0,25	25,0 ± 1,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	0,125	27,0 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

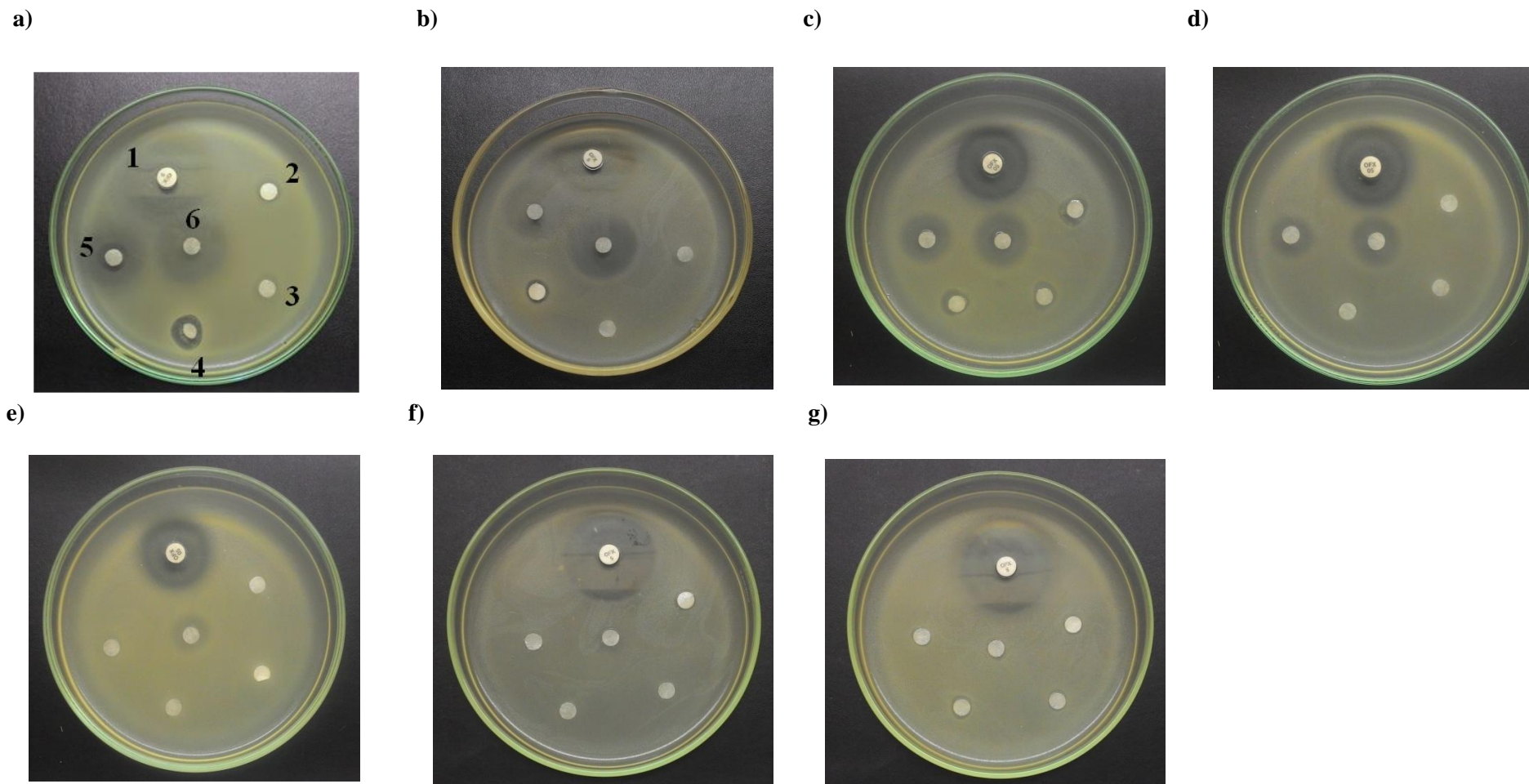
Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Figura 21- Aspecto de antibiograma contra *Escherichia coli*. Ofloxacina 5 μg (disco 1), DMSO (disco 2), tampão (disco 3), OVA (disco 4), OVA-S1 (disco 5), S1 (disco 6), com dosagem de S1 iguais a: a) 50 μg ; b) 25 μg ; c) 2,5 μg ; d) 1,0 μg ; e) 0,5 μg ; f) 0,25 μg e g) 0,125 μg . A numeração dos discos de todas as placas segue o padrão do item “a”.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Figura 22- Aspecto de antibiograma contra *Bacillus megaterium*. Ofloxacino 5 μg (disco 1), DMSO (disco 2), tampão (disco 3), OVA (disco 4), OVA-S1 1 (disco 5), S1 (disco 6), com dosagem de S1 iguais a: a) 50 μg ; b) 25 μg ; c) 2,5 μg ; d) 1,0 μg ; e) 0,5 μg ; f) 0,25 μg e g) 0,125 μg . A numeração dos discos de todas as placas segue o padrão do item “a”.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, o processo de interação entre OVA e quatro sulfonamidas foi investigado por fluorescência molecular, UV-vis e RMN ^1H . Os resultados experimentais indicaram que a formação dos complexos supramoleculares, proteína-ligante, ocorreu preferencialmente por mecanismo de *quenching* estático com formação dos complexos no estado fundamental. De acordo com as constantes de ligação (K_b) calculadas, a magnitude de interação segue a seguinte ordem: $S1 > S2 > S4 < S3$. Além disso, foi visto que há uma maior afinidade entre as sulfonamidas e a ovalbumina *in natura* (clara do ovo) quando comparada com a proteína comercial. A partir dos dados termodinâmicos, verificou-se que as interações ocorrem espontaneamente e que as forças predominantes na estabilização dos complexos são ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals para S2 e S3, e interações eletrostáticas para S1 e S4.

Possíveis modificações na cadeia polipeptídica da OVA foram verificadas por fluorescência sincronizada e 3D. Por meio de FRET foi possível calcular as distâncias intermoleculares entre as sulfonamidas e a OVA que variaram de 1,48 a 1,95 nm. O estudo de competição com a sonda ANS mostrou que apenas a S2 interage preferencialmente em sítios hidrofóbicos da proteína. Ca(II), Mg(II) e Fe(III) favorecem o processo de interação da OVA com S1 e S2, enquanto Zn(II) e Cu(II) provavelmente formam complexos com todas as sulfonamidas desfavorecendo a interação destes ligantes com a macromolécula.

Por meio dos estudos de variação de deslocamento químico (δ) por RMN ^1H foi possível verificar que houve variação nos sinais dos hidrogênios aromáticos presentes em S2 e S3 quando estes ligantes interagiram com a ovalbumina. Contudo, para S1 e S4, não foi observado mudanças nos espectros de RMN ^1H destas sulfonamidas na ausência e presença da proteína.

Por fim, por meio dos estudos biológicos constatou-se que as sulfonamidas são sensíveis a *E. Coli* e *B. megaterium*. E, além disso, que os valores de MIC destes antibióticos na ausência e presença da proteína foram similares.

Portanto, por meio dos estudos realizados, verificou-se que ocorre interação entre as diferentes sulfonamidas e a OVA resultando em mudanças conformacionais da macromolécula bem como no microambiente dos fluoróforos presentes na mesma. Tais alterações podem vir a potencializar a alergenicidade natural desta macromolécula o que pode compor um risco na segurança alimentar dos seres humanos.

7. REFERÊNCIAS

VARSHNEY, D.B. et al. Supramolecular interactions. In: STEED, W. & GALE, P.A. (Ed). *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*. 1 ed. Hoboken: Wiley, 2012.

LEHN, J.M. *Química supramolecular conceitos e perspectivas*. Lisboa: Press,1996.

WILLIAMS, M.A.; DAVITER, T. *Protein-ligands interactions – Methods and applications*. 2 ed. London: Humana Press, 2013.

HU, X.; LI, H. Force spectroscopy studies on protein–ligand interactions: a single protein mechanics perspective. **FEBS letters**, Holanda, v. 588, p. 3613–3620, Out., 2014.

CHENG, Z.; LIU, R.; JIANG, X. Spectroscopic studies on the interaction between tetrandrine and two serum albumins by chemometrics methods. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v. 115, p. 92–105, Jun., 2013.

DU, X. et al. Insights into Protein–Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. **International Journal of Molecular Sciences**, China, v. 17, n. 144, p. 1-34, Jan., 2016.

NIENHAUS, K. & NIENHAUS, G.U. Probing Heme Protein–Ligand Interactions by UV/Visible Absorption Spectroscopy. In: NINHEAUS, G.U. (Ed). *Protein–Ligand Interactions: Methods and Applications*, v. 305, Totowa: Humana press, 2005.

XING, A. et al. In vitro study on the interaction of methoxyflurane with human serum albumin: phenotypic characterization. **Journal of fluorine chemistry**, Holanda, v. 153, p. 107–113, Maio, 2013.

HEGYI, G. et al. *Introdução à Bioquímica Prática*. Budapeste: Eötvös Loránd University, 2013.

MOCZ, G.; ROSS, J.A. Fluorescence Techniques in Analysis of Protein–Ligand Interactions. In: WILLIAMS, M.A. & DAVITER, T. (Ed). *Protein-ligands interactions – Methods and applications*. 2 ed. London: Humana Press, 2013.

LAKOWICZ, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3 ed. Baltimore, Maryland: Springer , 2006.

MATVEEVA, E.G. et al. Tryptophan Fluorescence Quenching by Enzyme Inhibitors As a Tool for Enzyme Active Site Structure Investigation: Epoxide Hydrolase. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, USA ,v. 10, n. 6, p. 589–599, Set., 2009.

ANAND, U. et al. Exploring the Mechanism of Fluorescence Quenching in Proteins Induced by Tetracycline. **The Journal of Physical Chemistry B**, Índia, v. 115, p. 6312–6320, Abr., 2011.

WEERT, M.V. Fluorescence Quenching to Study Protein-ligand Binding: Common Errors. **Journal of fluorescence**, Dinamarca, v. 20, p. 625–629, Dez., 2009.

KATRAHALLI, U.; KALANUR, S.S.; SEETHARAMAPPA, J. Interaction of Bioactive Coomassie Brilliant Blue G with Protein: Insights from Spectroscopic Methods. **Scientia pharmaceutica**, Índia, v. 78, p. 869–880, Ago., 2010.

MOREIRA, M.B. Investigação da supressão de fluorescência de soro albumina bovina e humana por complexo de rutênio. **Química nova**, Brasil, v. 38, n. 2, p. 227–232, Dec., 2015.

DANTAS, M.D.A. et al. Interactions of tetracyclines with ovalbumin, the main allergen protein from egg white: Spectroscopic and electrophoretic studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, Brasil, v. 102, p. 505–514, Abr., 2017.

SHEKHTMAN, A.; BURZ, D.S. Protein NMR Techniques. 3 ed. Nova York: Humana press, 2012.

CALA, O.; GUILLIÈRE, F.; KRIMM, I. NMR-based analysis of protein–ligand interactions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, França, v. 406, n. 4, p. 943–956, Mar., 2013.

ALLEONI, A.C.C. Albumen protein and functional properties of gelation and foaming. **Sci. Agric.**, Brasil, v. 63, n. 3, p. 291-298, Maio, 2006.

BHATTACHARYA, M.; MUKHOPADHYAY, S. Structural and dynamical insights into the molten-globule form of ovalbumin, **J. Phys. Chem. B**, Índia, v. 116, p. 520-531, Nov., 2012.

HU, Y. et al. Synergistic effects of small amounts of konjac glucomannan on functional properties of egg white protein. **Food Hydrocolloids**, China, v. 52, p. 213-220, Jul., 2016.

DANTAS, M.D.A. Avaliação da interação das proteínas do ovo (ovalbumina e outras) com os antibióticos tetraciclina, oxitetraciclina e clorotetraciclina empregando técnicas espectroscópicas e eletroforese. 2015. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Curso de Pós-graduação em Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió.

MINE, Y. Egg proteins and peptides in human health-chemistry, bioactivity and production. **Current Pharmaceutical Design**, Canadá, v. 13, p. 875-884, 2007.

CAUBET, Jean-Christoph; WANG, J. Current understanding of egg allergy. **Pediatr. Clin. North Am.**, USA, v. 58, n. 2, p. 427-443, Abr. 1, 2011.

ULMER, J.B.; VALLEY, U.; RAPPUOLI, R. Vaccine manufacturing: challenges and solutions, **Nature Biotechnology**, USA, v. 24, n. 11, Nov., 2006.

CHUNG, E.H. Clinical and experimental vaccine research. **Clin Exp Vaccine Res**, Coreia do Sul, v. 3, p. 50-57, Out., 2014.

STEIN, R.E. et al. Crystal structure of uncleaved ovalbumin at 1.95 Å resolution. **J. Mol. Biol.**, Reino Unido, v. 221, p. 941-959, Out., 1991.

VERHOECKX, K.C.M. et al. Food processing and allergenicity, **Food and Chemical Toxicology**, Países Baixos, v. 80, p. 223–240, Março, 2015.

MINE, Y.; RUPA, P. Fine mapping and structural analysis of immunodominant IgE allergenic epitopes in chicken egg ovalbumin. **Protein Engineering**, Canadá, v. 16, n. 10, p. 747-752, Ago., 2003.

WANG, J.; SAMPSON, H.A. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. **Allergy Asthma Immunol Res, USA**, v. 1, n. 1, p. 19-29, Out., 2009.

Allergy. Disponível em: <<http://asthmaallergyclinic.in/allergy/>>. Acesso em: 11 de Maio de 2017.

KAMILYA, T.; PAL, P.; TALAPATRA, G.B. Interaction of ovalbumin with phospholipids langmuir-blodgett film, **J. Phys. Chem. B**, Índia, v.111, p. 1199-1205, Dez., 2007.

LU, Y. et al. Interaction of quercetin with ovalbumin: Spectroscopic and molecular modeling studies, **Journal of Luminescence**, China, v. 129, p. 1048-1054, Abr., 2009.

WANG, Rui-Qiang et al. Comparative study of the interactions between ovalbumin and three alkaloids by spectrofluorimetry, **Mol Biol Rep**, China, v. 40, p. 3409-3418, Dez., 2013.

SHEN, F. et al. Interactions between tea polyphenol and two kinds of typical egg white proteins—ovalbumin and lysozyme: Effect on the gastrointestinal digestion of both proteins in vitro, **Food Research International**, China, v. 59 p. 100-107, Jan., 2014.

OGNJENOVIC, J., et al. Interactions of epigallo-catechin 3-gallate and ovalbumin, the major allergen of egg white, **Food Chemistry**, Sérvia, v. 164, p. 36-43, Maio, 2014.

HOFF, R.; KIST, T.B.L. Analysis of sulfonamides by capillary electrophoresis, **J. Sep. Sci.**, Brasil, v. 32, p. 854-866, Dez., 2009.

PACHECO-SILVA, E.; SOUZA, J.R.; CALDAS, E.D.; Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos, **Quim. Nova**, Brasil, v. 37, n. 1, p. 111-122, Jul., 2014.

HOFF, R. Análise de resíduos de sulfonamidas em alimentos por eletroforese capilar e espectrometria de massas. 2008. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Curso de Pós-graduação em biologia celular e molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MEHTABUDDIN, A.A. et al. Sulfonamide residues determination in commercial poultry meat and eggs, **The Journal of Animal & Plant Sciences**, Paquistão, v. 22, n. 2, p. 473-478, 2012.

XU, Y. et al. Fast determination of sulfonamides from egg samples using magnetic multiwalled carbon nanotubes as adsorbents followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, **Food Chemistry**, China, v. 140, p. 83-90, Fev., 2013.

BANI-YANSEEN, A.D. Spectrofluorimetric study on the interaction between antimicrobial drug sulfamethazine and bovine serum albumin, **Journal of Luminescence**, Arábia Saudita, v. 131, p. 1042-1047, Jan., 2011.

CHEN, J.; ZHOU, X.; ZHANG, Y.; GAO, H. Potential toxicity of sulfanilamide antibiotic: Binding of sulfamethazine to human serum albumin, **Science of the Total Environment**, China, v. 432, p. 269-274, Jun., 2012.

ALI, M.S.; AL-LOHEDAN, H.A. Interaction of human serum albumin with sulfadiazine, **Journal of Molecular Liquids**, Arábia Saudita, v. 197, p. 124-130, Abr., 2014.

WANG, Q.; ZHANG, Sheng-Rui; JI, X. Investigation of interaction of antibacterial drug sulfamethoxazole with human serum albumin by molecular modeling and multi-spectroscopic method, **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v. 124, p. 84-90, Dez., 2014.

HE, W. et al. Investigation of the interaction between five alkaloids and human hemoglobin by fluorescence spectroscopy and molecular modeling, **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v. 123, p. 176-186, Dez., 2014.

VARLAN, A.; HILLEBRAND, M. Bovine and Human Serum Albumin Interactions with 3-Carboxyphenoxathiin Studied by Fluorescence and Circular Dichroism Spectroscopy, **Molecules**, Romênia, v. 15, p. 3905-3919, Maio, 2010.

WANG, R. et al. Comparative study of the binding of pepsin to four alkaloids by spectrofluorimetry, China, **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 108, p. 62–74, Jan., 2013.

CHATTERJEE, T. et al. Interaction of Virstatin with Human Serum Albumin: Spectroscopic Analysis and Molecular Modeling, **Plos One**, Índia, v. 7, n. 5, Maio, 2012.

WANG, N. et al. Spectroscopic studies on the interaction of efonidipine with bovine serum albumin, **Braz J Med Biol Res**, China, v. 41, n. 7, p. 589-595, Jun., 2008.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Approved standard M100-S17, Wayne, Pennsylvania-USA, 17th ed. 2007.

BAUER, A.W. et al. Teste de susceptibilidade a antibióticos por um método de disco único padronizado, **Am J Clin Pathol**, v. 45, n. 4, p. 493-496, Abr., 1966.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos**. São Paulo: Livraria Varela, 1996.

NI, Y.; WANG, S.; KOKOT, S. Spectrometric study of the interaction between Alpinetin and bovine serum albumin using chemometrics approaches, **Analytica Chimica Acta**, China, v. 663, p. 139-146, Jan., 2010.

HE, X., SONG, Z. Study on the proteins-luminol binding by use of luminal as a fluorescence probe, **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v. 114, p. 231-235, Maio, 2013.

MEI, P., et al. Fluorescence Quenching Study on the Interaction of Some Schiff Base Complexes with Bovine Serum Albumin, **Chinese Journal of Chemistry**, China, v. 26, p. 85-91, Set., 2008.

LU, Xi-Liang, et al. Characterization of the interaction between cationic Erbium (III)-porphyrin complex with bovine serum albumin, **Journal of Molecular Structure**, China, v. 934, p. 1-8, Maio, 2009.

MATHAVAN, A.; RAMDASS, A.; RAJAGOPAL, S. A Spectroscopy Approach for the Study of the Interaction of Oxovanadium(IV)-Salen Complexes with Proteins, **J. Fluoresc.**, USA, v. 25, p. 1141-1149, Jun., 2015.

TABASSUM, S. et al. Synthesis, characterization and interaction studies of copper based drug with Human Serum Albumin (HSA): Spectroscopic and molecular docking investigations, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Índia, v. 114, p. 132-139, Jun., 2012.

RAJENDIRAN, N.; THULASIDHASAN, J. Interaction of sulfanilamide and sulfamethoxazole with bovine serum albumin and adenine: Spectroscopic and molecular docking investigations, **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Índia, v. 144, p. 183-191, Jan., 2015.

STANCIUC, N. et al. pH and heat induced structural changes of chicken ovalbumin in relation with antigenic properties, **International Journal of Biological Macromolecules**, Romênia, v. 93, p. 572-581, Set., 2016.

KOLY, F. et al. Analysis of aceclofenac and bovine serum albumin interaction using fluorescence quenching method for predictive, preventive, and personalized medicine, **EPMA Journal**, Bangladesh, v. 6, n. 24, 2015.

CHAVES, O.A. et al. Fluorescence and Docking Studies of the Interaction between Human Serum Albumin and Pheophytin, **Molecules**, Brasil, v. 20, p. 19526-19539, Out., 2015.

HU, Yan-Jun et al. Spectroscopic studies on the interaction between methylene blue and bovine serum albumin, **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, China, v. 179, p. 324-329, Ago., 2006.

MALTAS, E. Binding interactions of niclosamide with serum proteins, **Journal of Food and Drug Analysis**, Túrquia, v. 22, p. 549-555, Mar., 2014.

NISBET, A.D. et al. The complete amino-acid sequence of hen ovalbumin, **Eur J Biochem**, Escócia, v. 115, p. 335-345, Nov., 1981.

ABEYRATHNE, E.D.N.S.; LEE, H.Y.; AHN, D.U. Sequential separation of lysozyme, ovomucin, ovotransferrin, and ovalbumin from egg white, **Poultry Science**, Coréia do Sul, v. 93, p. 1001-1009, Dez., 2014.

HE, Ling-Ling et al. Studies on the interaction between promethazine and human serumalbumin in the presence of flavonoids by spectroscopic and molecular modeling techniques, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, China, v. 145, p. 820-829, Jun., 2016.

GUAN, Y.; ZHANG, H.; WANG, Y. New insight into the binding interaction of hydroxylated carbon nanotubes with bovine serum albumin. **Spectrochimica Acta Part A**, China, v. 124, p. 556–563, Jan., 2014.

SAEIDIFAR, M.; MANSOURI-TORSHIZI, H.; SABOURY, A.A. Biophysical study on the interaction between two palladium (II) complexes and human serum albumin by Multispectroscopic methods, **Journal of Luminescence**, Irã, v. 167, p. 391-398, Jul., 2015.

TIAN, Fang-Fang; JIANG, Feng-Lei; HAN, Xiao-Len; XIANG, C.; GE, Yu-Shu; LI, Jia-Han; ZHANG, Y.; LI, R.; DING, Xin-Liang; LIU, Y. Synthesis of a novel hydrazone derivative and biophysical studies of its interactions with bovine serum albumin by spectroscopic, electrochemical, and molecular docking methods, **J. Phys. Chem. B**, China, v. 114, p. 14842-14853, Set., 2010.

ZHANG, Ye-Zhong et al. Spectroscopic studies on the interaction of lanthanum(III) 2-oxo-propionic acid salicyloyl hydrazone complex with bovine serum albumin, **Luminescence**, China, v. 23, p. 150-156, Maio, 2008.

WANG, Rui-Quiang et al. Comparative study of the interactions between ovalbumin and three alkaloids by spectrofluorimetry, **Mol. Biol. Rep.**, China, v. 40, p. 3409-3418, Dez., 2013.

HAN, R. et al. Investigation on the interaction of cefpirome sulfate with lysozyme by fluorescence quenching spectroscopy and synchronous fluorescence spectroscopy, **Luminescence**, China, v. 31, p. 580-586, Nov., 2016.

LI, G. et al. Investigation on the effect of fluorescence quenching of bovine serum albumin by cefoxitin sodium using fluorescence spectroscopy and synchronous fluorescence spectroscopy, **Luminescence**, China, v. 31, p. 1054-1062, Nov., 2016.

STEIN, P.E.; LESLIE, A.G.; FINCH, J.T.; CARRELL, R.W. Crystal structure of uncleaved ovalbumin at 1.95 Å resolution. **J. Mol. Biol.**, Reino Unido, v. 221, n. 3, p. 941-959, Out., 1991.

NAIK, P.N.; CHIMATADAR, S.A.; NANDIBWOOR, S.T. Interaction between a potent corticosteroid drug – Dexamethasone with bovine serum albumin and human

serum albumin: A fluorescence quenching and fourier transformation infrared spectroscopy study, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Índia, v. 100, p. 147-159, Maio, 2010.

HONGWEY, Z. et al. Spectroscopic studies on the interaction between riboflavin and albumins, **Spectrochimica Acta Part A**, China, v. 65, p. 811-817, Dez., 2006.

RANJBAR, S. et al. Studies of the Interaction between Isoimperatorin and Human Serum Albumin by Multispectroscopic Method: Identification of Possible Binding Site of the Compound Using Esterase Activity of the Protein, **The Scientific World Journal**, Irã, v. 2013, p. 1-13, Set., 2013.

SARKAR, M.; PAUL, S.S.; MUKHERJEA, K.K. Interaction of bovine serum albumin with apsychootropic drug alprazolam: Physicochemical, photophysical and molecular docking studies, **Journal of Luminescence**, Índia, v. 142, p. 220-230, Mar., 2013.

SCHÖNBRUNN, E. et al. Structural basis for the interaction of the fluorescence probe 8-anilino-1 naphthalene sulfonate (ANS) with the antibiotic target MurA, **PNAS**, USA, v. 97, n. 12, p. 6345-6349, Jun. 6, 2000.

ANDREWS, W.J. et al. A calcium-dependent interaction between calmodulin and the calponin homology domain of human IQGAP1, **Mol Cell Biochem**, UK, v. 371, p. 217-223, Ago., 2012.

MEYLAN, W.M.; HOWARD, P.H. Atom/fragment contribution method for estimating octanol-water partition coefficients, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, USA, v. 84, n. 1, 83-92, Jan., 1995.

AGUIAR, M.S.; ZAFFARI, S.; HÜBSCHER, G.H. O ovo e sua contribuição na saúde humana, **Revista Saúde e Ambiente**, Brasil, v. 10, n. 1, Jun., 2009.

SALDANHA, E.S.P.B. et al. Effect of organic mineral supplementation on the egg quality of semi-heavy layers in their second cycle of lay, **Brazilian Journal of Poultry Science**, Brasil, v.11, n.4, p. 215 -222, Dez., 2009.

YANG, Y.; LI, D.; XU, C. Influences of urea, pH and metal ions on the interaction between cepharanthine and lysozyme by steady state fluorescence spectroscopy, **Journal of Molecular Structure**, China, v. 1084, p. 229-235, Dez., 2015.

ROCHA, D.P. et al. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana, **Quím. Nova**, Brasil, v. 34, n. 1, p. 111-118, Ago., 2011.

FIGUEIREDO, I.M.; MARSAIOLI, A.J. Mapeamento das interações proteína-ligante através de técnicas de RMN de ¹H utilizando detecção do ligante, **Quím. Nova**, Brasil, v. 30, n. 7, p. 1597-1605, Ago., 2007.

JÚNIOR, L.A.S. Degradação de antibióticos de uso veterinário em reator de carbonização hidrotermal. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e

Ambiental) – Curso de Pós-graduação em engenharia do meio ambiente, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

TURCZAN, J.; MEDWICK, T. Identification of sulfonamides by NMR spectroscopy, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, USA, v. 61, n. 3, p. 434-443, Mar., 1972.

BOJKO, B. et al. Investigations of acetaminophen binding to bovine serum albumin in the presence of fatty acid: Fluorescence and ^1H NMR studies, **Journal of Molecular Structure**, v. 924-926, p. 332–337, Dez., 2009.

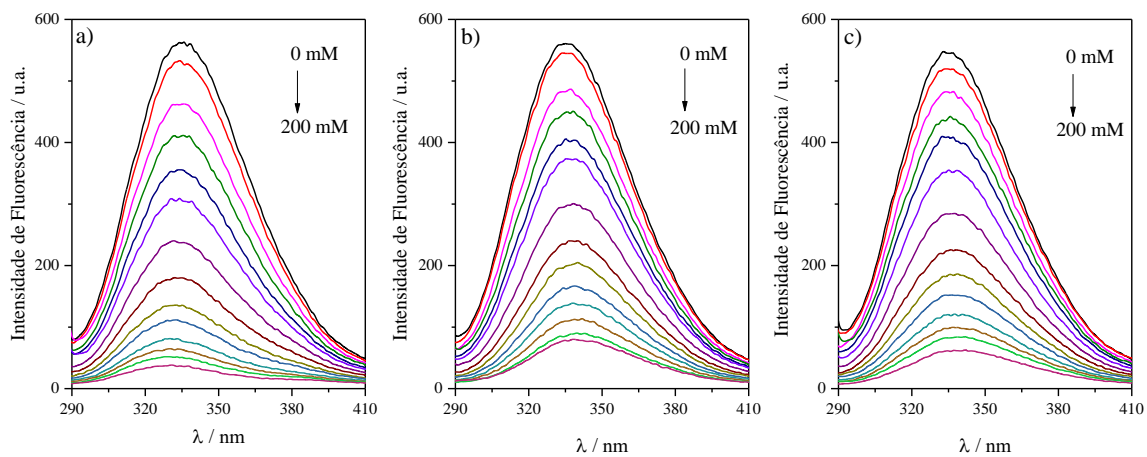
BELLÚ, S. et al. The interaction between mercury(II) and sulfathiazole. **Quim. Nova**, Brasil, v. 26, n. 2, p. 188-192, Out., 2003.

HONG, S.W.; JO, W.H. A fluorescence resonance energy transfer probe for sensing pH in aqueous solution, **Polymer**, Coréia do Sul, v. 49, p. 4180-4187, Jul., 2008.

HUYNH, D.P. et al. pH/temperature sensitive poly(ethylene glycol)-based biodegradable polyester block copolymer hydrogels, **Polymer**, Coréia do Sul, v. 47, p. 7918-7926, Set., 2006.

APÊNDICE I

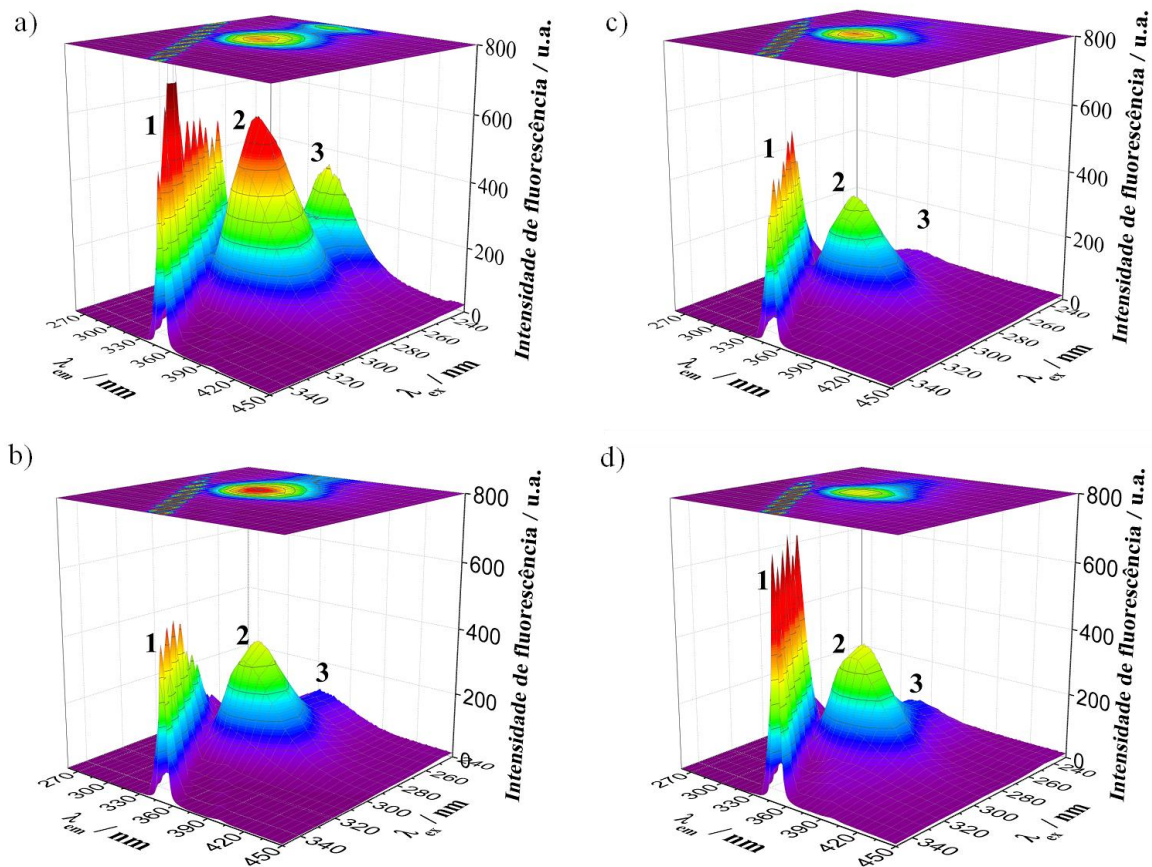
Figura 23- Titulação espectrofluorimétrica da ovalbumina para os seguintes ligantes: a) Sulfaquinoxalina (S2), b) Sulfadimetoxina (S3) e c) Sulfametazina (S4). Condições: OVA (2 mM), sulfonamidas (0 - 200 μ M), tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4 e 30°C.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

APÊNDICE II

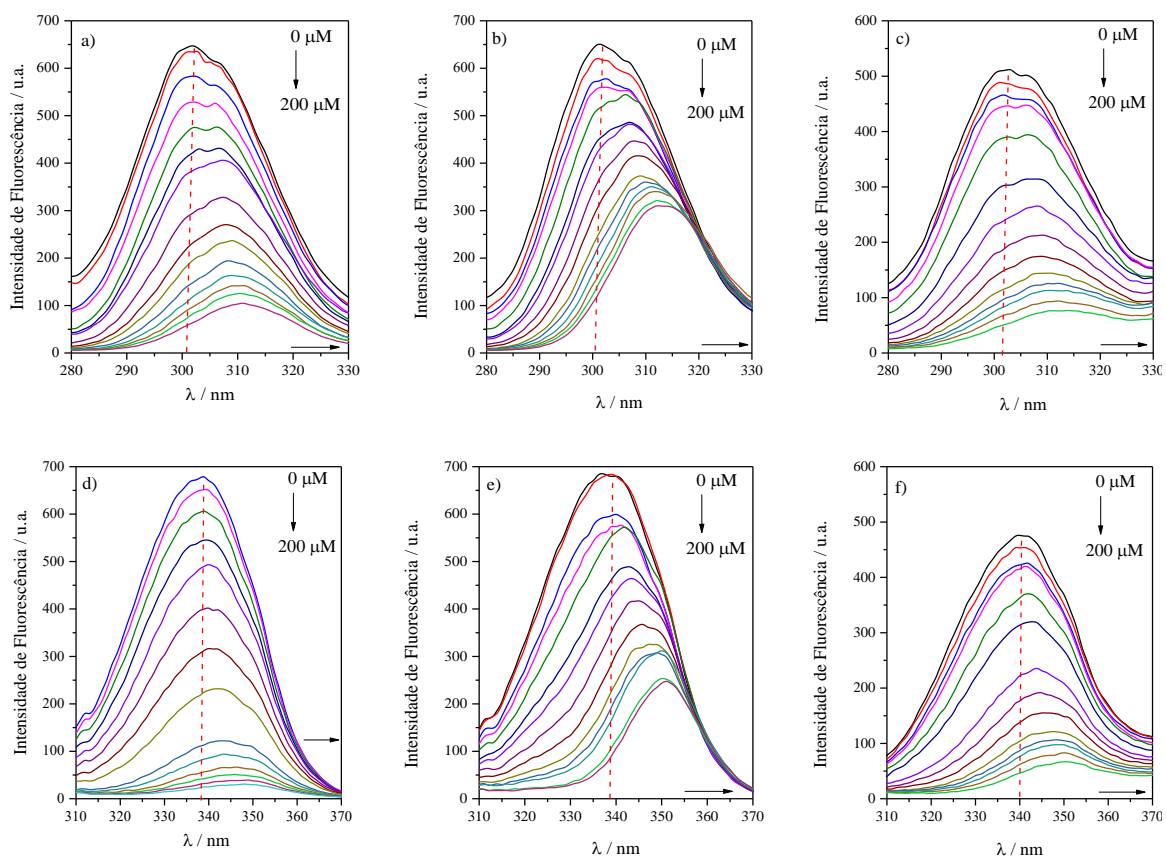
Figura 24- Espectros de fluorescência tridimensional para a) OVA, b) com adição de S2, c) com adição de S3, d) com adição de S4. Condições: OVA (2 μ M), sulfonamidas (40 μ M), tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4 e 30°C.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

APÊNDICE III

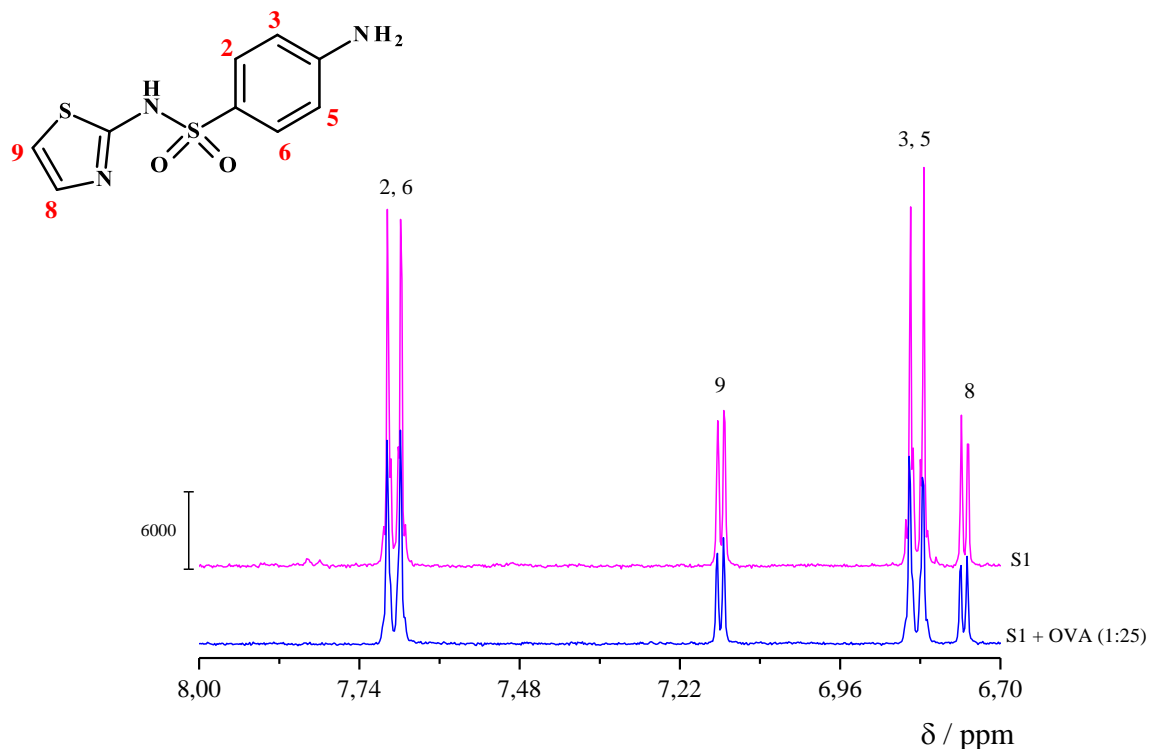
Figura 25- Fluorescência sincronizada para o resíduo de tirosina ($\lambda = 15$ nm) com adição de incrementos de a) S2, b) S3 e c) S4 e para o resíduo de triptofano ($\lambda = 60$ nm) com adição de incrementos de d) S2, e) S3 e f) S4. Condições: OVA (2 μ M), sulfonamidas (0 - 200 μ M), tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 100 mM a pH 7,4 e 30°C.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

APÊNDICE IV

Figura 26- Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz) da sulfatiazol (S1) na ausência e na presença da ovalbumina (OVA). Condições: S1:OVA (1:25), S1 (1 mM) em 10% (v/v) de DMSO- d_6 em tampão fosfato 10 mM com D_2O a pH 7,4.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Tabela 13- Deslocamento químico (δ) do RMN ^1H (400 MHz) de S1 na ausência e presença da OVA em tampão fosfato 10 mM em D_2O a pH 7,4.

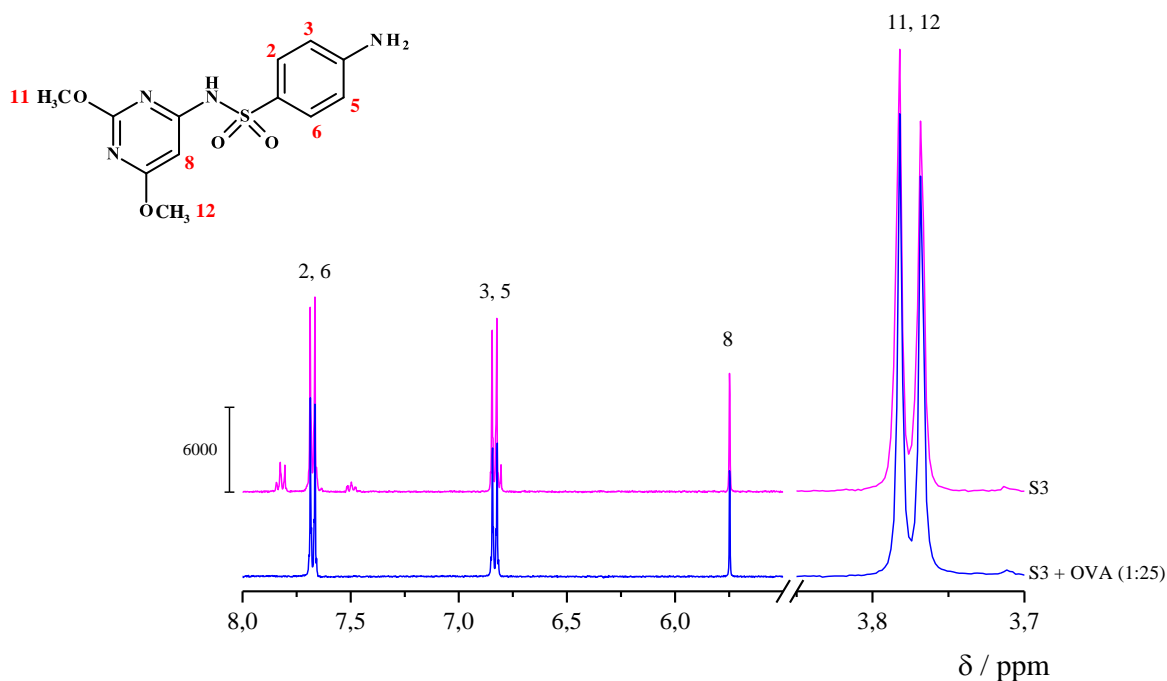
Hidrogênio	δ / ppm			$\Delta\delta^d$
	S1 ^{a,b}	S1 ^c	S1:OVA (1:25)	
2, 6	7,45	7,685	7,685	0,000
3, 5	6,58	6,836	6,836	0,000
9	7,18	7,153	7,153	0,000
8	6,74	6,759	6,760	-0,001

Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Nota: ^a δ para S1 em DMSO- d_6 por Bellú et al. (2003) / ^b δ para S1 neste trabalho / ^c δ foi calculado baseado na diferença entre $\delta(\text{S1})$ e $\delta(\text{S1:OVA} = 1:25)$.

APÊNDICE V

Figura 27- Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz) da sulfadimetoxina (S3) na ausência e na presença da ovalbumina (OVA). Condições: S3:OVA (1:25), S3 (1 mM) em 10% (v/v) de $\text{DMSO-}d_6$ em tampão fosfato 10 mM com D_2O a pH 7,4.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Tabela 14- Deslocamento químico (δ) do RMN ^1H (400 MHz) de S3 na ausência e presença da OVA em tampão fosfato 10 mM em D_2O a pH 7,4.

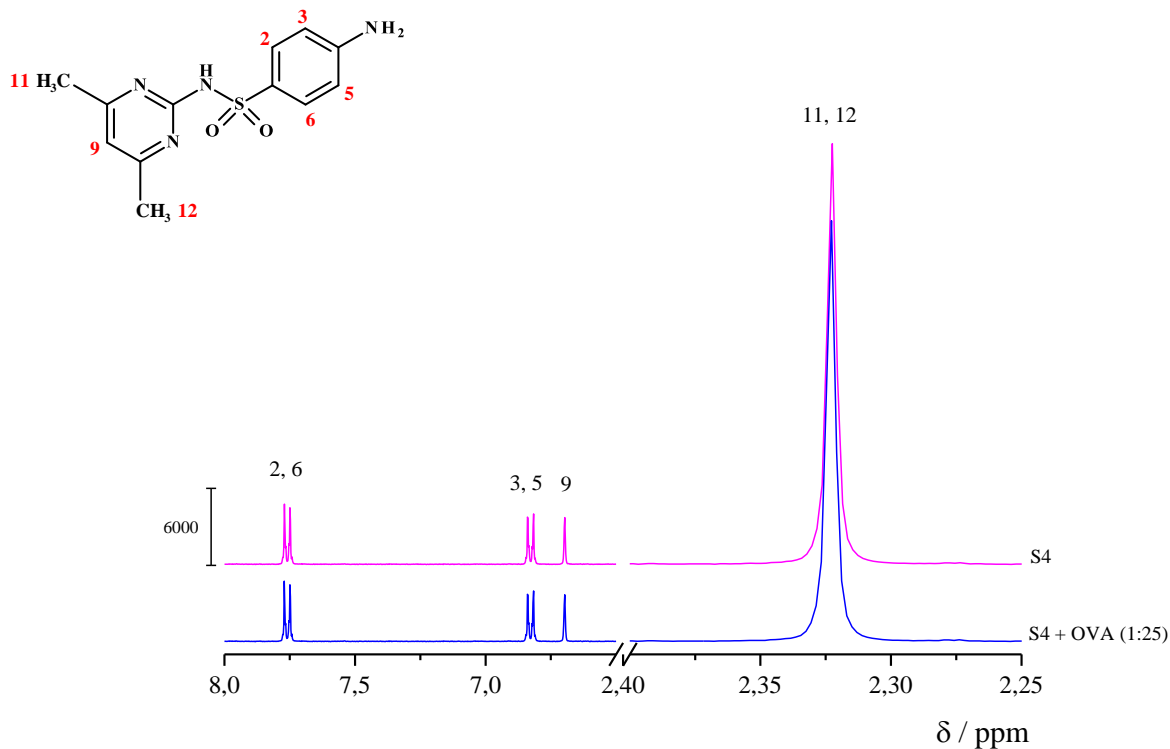
Hidrogênio	δ / ppm			$\Delta\delta^d$
	S3 ^{a,b}	S3 ^c	S3:OVA (1:25)	
2, 6	7,8	7,677	7,675	+0,002
3, 5	7,8	6,836	6,834	+0,002
8	6,0	5,748	5,748	0,000
11,12	3,8	3,776	3,776	0,000

Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Nota: ^a δ para S3 em $\text{DMSO-}d_6$ por Hong e Jo (2008) / ^b δ para S3 neste trabalho / ^c δ foi calculado baseado na diferença entre $\delta(\text{S3})$ e $\delta(\text{S3:OVA} = 1:25)$.

APÊNDICE VI

Figura 28- Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz) da sulfametazina (S4) na ausência e na presença da ovalbumina (OVA). Condições: S4:OVA (1:25), S4 (1 mM) em 10% (v/v) de DMSO- d_6 em tampão fosfato 10 mM com D_2O a pH 7,4.



Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Tabela 15- Deslocamento químico (δ) do RMN ^1H (400 MHz) de S4 na ausência e presença da OVA em tampão fosfato 10 mM em D_2O a pH 7,4.

Hidrogênio	δ / ppm			$\Delta\delta^d$
	S4 ^{a,b}	S4 ^c	S4:OVA (1:25)	
2, 6	~ 6,5 - 7,8	7,761	7,761	0,000
3, 5	~ 6,5 - 7,8	6,828	6,828	0,000
9	~ 7,0	6,697	6,697	0,000
11,12	~ 2,0	2,322	2,323	-0,001

Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Nota: ^a δ para S3 em DMSO- d_6 por Huynh et al. (2006) / ^b δ para S3 neste trabalho / ^c $\Delta\delta$ foi calculado baseado na diferença entre $\delta(\text{S3})$ e $\delta(\text{S3:OVA} = 1:25)$.

APÊNDICE VII

Tabela 16- Média dos diâmetros dos halos de inibição (em mm) do crescimento de *E. coli* e *B. megaterium* submetidas aos controles e à sulfaquinoxalina (S2) e suas interações com OVA. Ofloxacino- OFX (5 µg); DMSO- dimetilsulfóxido; tampão - Tris-HCl (50 mM com NaCl 100 mM a pH 7,4); OVA- ovoalbumina em tampão (100 µg); sulfaquinoxalina (S2) - 0,125-50 µg e interações OVA-S2.

Cepas	Diâmetro do halo de inibição (mm)						
	Dosagens (µg)	OFX	DMSO	Tampão	OVA	S2	S2+OVA
<i>E. coli</i> ATCC 25922	50	34,0 ± 1,4	2,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0	39,0 ± 1,4	35 ± 4,2
	25	34,0 ± 0,7	2,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	38,0 ± 4,2	32 ± 1,4
	2,5	27,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	20,0 ± 0,0	14 ± 0,7
	1,0	30,0 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	15,0 ± 0,0	10 ± 4,9
	0,5	10,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0
	0,25	25,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0
	0,125	25,0 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>Bacillus</i> <i>Megate-</i> <i>rium</i>	50	42,0 ± 2,8	4,0 ± 0,7	4,0 ± 1,4	7,0 ± 0,0	19 ± 0,7	17 ± 0,0
	25	32,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	5,0 ± 0,0	21 ± 2,8	20 ± 2,1
	2,5	20,0 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	13 ± 0,7	10 ± 0,0
	1,0	17,0 ± 2,8	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	12 ± 0,7	8,0 ± 0,0
	0,5	6,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	10 ± 0,0	6,0 ± 0,0
	0,25	23,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0	6,0 ± 0,7	4,0 ± 0,7
	0,125	24,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Tabela 17- Média dos diâmetros dos halos de inibição (em mm) do crescimento de *E. coli* e *B. megaterium* submetidas aos controles e à sulfadimetoxina (S3) e suas interações com OVA. Ofloxacino- OFX (5 µg); DMSO- dimetilsulfóxido; tampão - Tris-HCl (50 mM com NaCl 100 mM a pH 7,4); OVA- ovalbumina em tampão (100 µg); sulfadimetoxina (S3) - 0,05-25 µg e interações OVA – S3.

Cepas	Diâmetro do halo de Inibição (mm)						
	Dosagens (µg)	OFX	DMSO	Tampão	OVA	S3	S3+OVA
<i>E. coli</i> ATCC 25922	25	31,0 ± 1,4	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	39,0 ± 2,1	29,0 ± 4,2
	12,5	36,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	35,0 ± 2,8	37,0 ± 4,2
	1,0	29,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	17,0 ± 1,4	12,0 ± 0,0
	0,5	27,0 ± 1,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	12,0 ± 3,5	6,0 ± 2,1
	0,25	28,0 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	0,125	26,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	0,05	24,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>Bacillus</i> <i>Megate-</i> <i>rium</i>	25	30,0 ± 4,2	3,0 ± 0,0	4,0 ± 1,4	7,0 ± 2,8	20,0 ± 0,7	19,0 ± 0,7
	12,5	35,0 ± 6,3	3,0 ± 0,7	2,0 ± 0,0	5,0 ± 1,4	16,0 ± 2,1	16,0 ± 0,7
	1,0	22,0 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	12,0 ± 0,7	9,0 ± 0,7
	0,5	22,0 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	9,0 ± 0,7	5,0 ± 0,7
	0,25	21,0 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,0 ± 0,7	0,0 ± 0,0
	0,125	21,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	0,05	23,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Tabela 18- Média dos diâmetros dos halos de inibição (em mm) do crescimento de *E. coli* e *B. megaterium* submetidas aos controles e à sulfametazina (S4) e suas interações com OVA. Ofloxacino- OFX (5 µg); DMSO- dimetilsulfóxido; tampão - Tris-HCl (50 mM com NaCl 100 mM a pH 7,4); OVA- ovoalbumina em tampão (100 µg); sulfametazina (S4) - 0,125-50 µg e interações OVA – S4.

Cepas	Diâmetro do halo de Inibição (mm)						
	Dosagens (µg)	OFX	DMSO	Tampão	OVA	S4	S4+OVA
<i>E. coli</i> ATCC 25922	50	30,0 ± 2,1	5,0 ± 0,0	8,0 ± 0,7	3,0 ± 0,0	39,0 ± 1,4	33,0 ± 0,0
	25	33,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	35,0 ± 0,7	33,0 ± 3,5
	2,5	29,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	11,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	1,0	29,0 ± 1,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	0,5	29,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	0,25	24,0 ± 0,0	4,0 ± 0,7	4,0 ± 0,7	3,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0
	0,125	24,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>Bacillus</i> <i>Megate-</i> <i>rium</i>	50	27,0 ± 2,8	4,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,0 ± 0,7	21,0 ± 0,0	18,0 ± 0,7
	25	36,0 ± 0,7	2,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	18,0 ± 2,8	13,0 ± 0,0
	2,5	20,0 ± 0,0	5,0 ± 0,0	5,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0	7,0 ± 1,4	5,0 ± 0,0
	1,0	22,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	5,0 ± 1,4	2,0 ± 0,0
	0,5	21,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	0,25	22,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0	3,0 ± 1,4	3,0 ± 1,4	3,0 ± 0,7	3,0 ± 1,4
	0,125	24,0 ± 1,4	2,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Fonte: elaborado pela autora, 2017.