



# UFAL

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

**MARIA DAYANNE DE ARAÚJO DANTAS**

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO OVO (OVALBUMINA E OUTRAS) COM OS  
ANTIBIÓTICOS TETRACICLINA, OXITETRACICLINA E CLOROTETRACICLINA  
EMPREGANDO TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS E ELETROFORESE**

**MACEIÓ- 2015**

**Universidade Federal de Alagoas**

**Campus A. C. Simões  
Tabuleiro do Martins  
57072-970 - Maceió-AL**

MARIA DAYANNE DE ARAÚJO DANTAS

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO OVO  
(OVALBUMINA E OUTRAS) COM OS ANTIBIÓTICOS  
TETRACICLINA, OXITETRACICLINA E CLOROTETRACICLINA  
EMPREGANDO TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS E  
ELETROFORESE**

Dissertação de mestrado apresentada 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

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Isis Martins Figueiredo

Maceió – AL  
2015

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade**

- D192a Dantas, Maria Dayanne de Araújo.  
Avaliação da interação das proteínas do ovo (ovalbumina e outras) com os antibióticos tetraciclina, oxitetraciclina e clorotetraciclina empregando técnicas espectroscópicas e eletroforese / Maria Dayanne de Araújo Dantas. – 2015.  
93 f. : il., grafs., tabs.
- Orientador: Josué Carinhanha Caldas Santos.  
Coorientadora: Isis Martins Figueiredo.  
Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2015.
- Bibliografia: f. 84-93..
1. Antibióticos - Interação. 2. Ovalbumina. 3. Tetraciclina.  
4. Fluorescência molecular. 5. Espectrofotometria – UV-Vis.  
6. Eletroforese. 7. RMN1H. I. Título.

CDU: 543.54:615.33



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

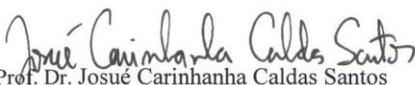


BR 104 Km14, Campus A. C. Simões  
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL, Brasil  
Fone: (82) 3214-1144  
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

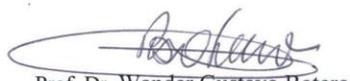
**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Membros da Comissão Julgadora da defesa de dissertação da mestranda **Maria Dayanne de Araújo Dantas**, intitulada: **“Avaliação da Interação das Proteínas do Ovo (ovalbumina e outras) com os antibióticos tetraciclina, oxitetraciclina e clorotetraciclina empregando técnicas espectroscópicas e eletroforese”**, realizada no dia 26 de março de 2015, às 09h, na Sala de Reuniões do PPGQB/IQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

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

  
Profa. Dra. Ísis Martins Figueiredo  
Coorientadora (PPGQB/IQB/UFAL)

  
Prof. Dr. Wander Gustavo Bótero  
(PPGQB/UFAL)

  
Profa. Dra. Sílvia Helena Cardoso  
(UFAL-Campus Arapiraca)

*Dedico este trabalho à minha querida mãe Maria de Araújo Dantas, toda minha gratidão pela imensurável dedicação, compreensão, apoio, força, carinho e amor durante esta jornada.*

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente a Deus, pela saúde, força e coragem para superar os obstáculos,*  
*Ao meu querido pai José Davi Dantas (in memorian), pelo amor, ensinamentos e dedicação,*  
*Ao meu irmão José Darci Dantas pela torcida e apoio,*  
*Ao meu noivo Diego Rodrigo Leite da Silva pelo amor, compreensão, apoio, força e paciência,*  
*Ao prof. Dr. Josué Carinhonha Caldas Santos pela oportunidade, orientação e ajuda,,*  
*A prof<sup>ª</sup> Dr<sup>a</sup> Isis Martins Figueiredo pela orientação e ajuda nos ensaios de RMN <sup>1</sup>H,*  
*A todos os amigos do Laboratório de Instrumentação e Desenvolvimento em Química Analítica (LINQA, em especial Iza, Marina, Shenia, Wood, Elysson e Allysson, pelo apoio, convivência e companheirismo durante esta jornada, sentirei saudades.*  
*Ao prof. Dr. Hugo Pereira por ceder o equipamento de eletroforese para realização dos estudos por SDS-PAGE e native-PAGE*  
*Ao doutorando Humberto de Araújo pela ajuda na realização dos ensaios de eletroforese,*  
*Ao mestrando José Adriano pela construção da estrutura da ovalbumina,*  
*Ao prof. Dr. Luciano Grilo por ceder o equipamento leitor de microplacas para realização dos estudos de competição,*  
*À doutoranda Camila Camerino pela ajuda nos ensaios de estudo de competição,*  
*Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento – CNPq pelo apoio financeiro.*  
*A todos que de alguma forma contribuíram com a minha formação acadêmica e para a concretização deste trabalho.*

*“Sem sonhos, a vida não tem brilho.  
Sem metas, os sonhos não têm alicerces.  
Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais.”*

Augusto Cury, trecho do livro o vendedor de sonhos.

## RESUMO

A ovalbumina é a proteína majoritária da clara do ovo, sendo amplamente utilizada na alimentação, principalmente na suplementação nutricional e na composição de diferentes alimentos. As tetraciclinas constituem uma classe de antibióticos de amplo espectro empregada em veterinária na criação de animais e produção de aves. No entanto, o seu uso abundante e indiscriminado pode resultar na presença de resíduos deste medicamento em alimentos como o ovo, causando efeitos tóxicos, além da possibilidade de reações alérgicas. Este trabalho teve como objetivo estudar a interação da ovalbumina (comercial e *in natura*) com os antibióticos tetraciclina, oxitetraciclina e clorotetraciclina empregando fluorescência molecular, absorção molecular e eletroforese. A partir dos dados obtidos por fluorescência foram calculadas as constantes de Stern–Volmer, ligação, o número de sítios de ligação ( $n$ ) entre as três tetraciclinas (TC, OTC e CTC) e a ovalbumina, e por fim os parâmetros termodinâmicos ( $\Delta G$ ,  $\Delta H$  e  $\Delta S$ ) em diferentes condições de pH. Os valores de  $K_b$  para a TC variaram de  $2,11 (\pm 0,21)$  a  $25,8 (\pm 0,30) \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ , para a OTC variaram de  $3,96 (\pm 0,07)$  a  $58,4 (\pm 0,50) \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$  e por fim para a CTC variaram de  $2,45 (\pm 0,13)$  a  $32,4 (\pm 0,40) \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$  a depender do valor do pH do meio. O número de sítios de ligação em todas as condições foi próximo à unidade. O mecanismo de interação foi estudado e os dados experimentais demonstraram que o processo de interação entre a ovalbumina e as diferentes tetraciclinas ocorreu através de *quenching* estático com formação de complexos não-fluorescentes. Os dados termodinâmicos calculados indicaram que as interações ocorrem espontaneamente ( $\Delta G < 0$ ), e as forças de ligação predominantes são ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals e interações eletrostáticas, a depender do valor de pH do meio. A partir dos estudos por fluorescência sincronizada foi possível observar que houve deslocamentos para os resíduos de tirosina apenas em pH 7,4 independente da tetraciclina e da origem da ovalbumina. Para os resíduos de triptofano foram observados deslocamentos em todos os valores de pH independente do ligante e da origem da ovalbumina. Através dos estudos por fluorescência 3D observou-se que houve redução na intensidade de fluorescência dos picos 2 e 3 para as proteínas comercial e *in natura* independente da tetraciclina adicionada. A partir dos estudos por FRET foi possível calcular as distâncias intermoleculares entre a ovalbumina e as três tetraciclinas estudadas em diferentes condições de pH, que variaram de 2,95 a 3,52 nm. Com os estudos de competição observou-se que houve competição pelo sítio de ligação da ovalbumina apenas para o íon  $\text{Mg(II)}$  para a TC. Para a OTC, houve competição pelo sítio de ligação da proteína entre todos os íons avaliados. Por fim, para CTC, a adição dos íons  $\text{Ca(II)}$ ,  $\text{Mg(II)}$  e  $\text{Cu(II)}$  provocou competição entre estes íons e a CTC pela proteína. Através dos estudos por UV-Vis verificou-se que houve a formação de complexos entre a ovalbumina e as diferentes tetraciclinas avaliadas neste trabalho, independente do pH do meio. A partir dos estudos por eletroforese foi observado um deslocamento na banda protéica para a proteína nativa (indicando aumento da mobilidade eletroforética) em função da presença dos ligantes. A partir dos estudos por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) observou-se que houve deslocamento e alargamento dos sinais para todos os hidrogênios da molécula de tetraciclina, e os tempos de relaxação ( $T_1$ ) para os átomos de hidrogênio da tetraciclina reduziram na presença da ovalbumina. Por fim, com base nos resultados obtidos empregando diferentes técnicas espectroscópicas e eletroforese foi possível avaliar as interações de três tetraciclinas em diferentes condições de pH.

**Palavras-chave:** interação. ovalbumina. tetraciclinas. fluorescência molecular. espectrofotometria. UV-Vis. eletroforese. RMN  $^1\text{H}$ .

## ABSTRACT

The albumin is the major protein from egg white, being widely used in the food, mainly in nutritional supplementation and in different food composition. Tetracyclines are a class of antibiotics broad spectrum employed in animal husbandry and poultry production. However, its abundant use and indiscriminate may result in the presence of residues this medicine in foods like egg causing toxic effects, in addition the possibility of allergic reactions. The aim of this work was evaluation interaction between ovalbumin (commercial and in natura) with tetracycline, oxitetracycline and chlortetracycline employing molecular fluorescence, molecular absorption and electrophoresis. Through the results obtained by fluorescence were calculated Stern-Volmer's constant, binding, binding sites number between the three tetracyclines and ovalbumin, finally, the thermodynamic parameters ( $\Delta G$ ,  $\Delta H$  and  $\Delta S$ ) under different conditions of pH.  $K_b$  values for TC variety from  $2.11 (\pm 0.21)$  to  $25.8 (\pm 0.30) \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$  for OTC variety from  $3.96 (\pm 0.07)$  to  $58.4 (\pm 0.50) \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ . And finally, the values for CTC variety from  $2.45 (\pm 0.13)$  to  $32.4 (\pm 0.40) \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ . Depending on the pH of the resource. The number of the binding sites in all conditions was close to unity. The interaction mechanism was studied and the experimental results showed that interaction process between ovalbumin and different tetracyclines occurred by static quenching with non-fluorescent complexes formation. The thermodynamics parameters calculated indicated that interactions occur spontaneously ( $\Delta G < 0$ ), and bonding forces predominant are hydrogen bonds, Van der Waals force and electrostatic interactions, depending on the pH of the resource. From the studies by synchronous fluorescence was observed shift to the tyrosine residues only pH 7.4 independent of tetracycline and ovalbumin source. For tryptophan residues were observed shift in all values of pH independent of ligand and source of ovalbumin. Through the studies by 3D fluorescence was observed decreased the fluorescence intensity of peaks 2 e 3 for commercial and egg white proteins independent of tetracycline added. From studies by FRET was possible to calculate the intermolecular distances between ovalbumin and three tetracycline studied under different conditions of pH, variety from 2.95 to 3.52 nm. With competition studies was observed there was competition for ovalbumin binding site only by ion Mg (II) and TC. For OTC, there was competition for the binding site of the protein among all ions evaluated. Finally, for CTC, the addition of ions Ca (II), Mg (II) e Cu (II) caused competition between these ions and CTC by protein. Through UV-Vis studies, there was the formation of complexes between ovalbumin and distinct tetracyclines evaluated in this work, independent of pH and source. From electrophoresis studies was observed shift of the protein band for the native protein (indicating increase electrophoretic mobility) due to the presence of the ligands. The nuclear magnetic resonance of hydrogen ( $^1\text{H NMR}$ ) studies indicated that signals of all hydrogens tetracycline molecule had shift and enlargement and the relaxation time ( $T_1$ ) decreasing in the presence of the ovalbumin.

**Keywords:** interaction. ovalbumin. tetracycline. molecular fluorescence. UV-Visible. spectrophotometry. electrophoresis.  $^1\text{H NMR}$ .

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Exemplo de ligação reversível proteína-ligante .....	12
<b>Figura 2.</b> Conjunto de ligações seletivas para o sistema proteína-ligante.....	13
<b>Figura 3.</b> Esquemas representando o processo de quenching dinâmico ou colisional.....	17
<b>Figura 4.</b> Esquemas representando o processo de quenching estático.....	17
<b>Figura 5. a)</b> Representação genérica de um sistema com transferência de energia com e sem (re)emissão de luz; <b>b)</b> Gráfico da relação entre a transferência de energia (E) e a distância entre doador (verde) e receptor (vermelho) com destaque para $R_0$ ( $E = 50\%$ ou $0,5$ ) e <b>c)</b> Sobreposição espectral (área hachurada - J) do espectro de emissão do doador em relação ao espectro de absorção do receptor.....	22
<b>Figura 6.</b> Estrutura cristalina da ovalbumina gerada empregando o programa Pymol (Delano Scientific LLC, CA) a partir do Protein Data Bank (PDB: 1OVA) evidenciando os resíduos de triptofano (Trp <sup>160</sup> , Trp <sup>194</sup> e Trp <sup>275</sup> .....	26
<b>Figura 7.</b> Estrutura química das tetraciclinas (totalmente associadas) avaliadas neste estudo.	30
<b>Figura 8.</b> Distribuição das espécies de tetraciclina (TC) em função do pH.....	32
<b>Figura 9.</b> Efeito do pH no espectro da ovalbumina (0,5 $\mu\text{M}$ ).....	43
<b>Figura 10.</b> Efeito da temperatura nos espectros normalizados de fluorescência da ovalbumina (0,5 $\mu\text{M}$ ) em função do pH da temperatura.....	44
<b>Figura 11.</b> Avaliação espectral do microambiente dos resíduos de triptofano e tirosina (pH = 7,4) por gráficos de contorno.....	46
<b>Figura 12.</b> Avaliação da cinética de interação em diferentes valores de pH entre a ovalbumina ( $\mu\text{M}$ ) e tetraciclina ( $\mu\text{M}$ ) durante 60 min.....	47
<b>Figura 13.</b> Titulação espectrofluorimétrica da ovalbumina (2,0 $\mu\text{M}$ ) em pH 7,4 (30 °C) para os ligantes TC, OTC e CTC.....	49
<b>Figura 14.</b> Tratamento matemático das titulações espectrofluorimétricas em pH 7,4 (30 °C)....	50
<b>Figura 15.</b> Espectros de fluorescência sincronizada após adição de concentrações crescentes de tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC) e clorotetraciclina (CTC) a ovalbumina comercial (pH = 1,5).....	55
<b>Figura 16.</b> Espectros de fluorescência sincronizada após adição de concentrações crescentes de TC, OTC e CTC a ovalbumina comercial (pH = 4,6).....	56
<b>Figura 17.</b> Espectros de fluorescência sincronizada após adição de concentrações crescentes de TC, OTC e CTC a ovalbumina comercial (pH = 7,4). .....	57
<b>Figura 18.</b> Avaliação do efeito da adição de tetraciclina a ovalbumina comercial e <i>in natura</i> em pH 7,4 por fluorescência 3D (gráfico com projeção).....	60
<b>Figura 19.</b> Avaliação do efeito da adição de oxitetraciclina (20 $\mu\text{M}$ ) e clorotetraciclina (20 $\mu\text{M}$ ) a ovalbumina comercial (0,5 $\mu\text{M}$ ) e <i>in natura</i> (0,5 $\mu\text{M}$ ) a pH 7,4 através de gráficos de fluorescência 3D.....	62
<b>Figura 20.</b> Sobreposição dos espectros normalizados de fluorescência da ovalbumina (1,0 $\mu\text{M}$ ) que atua como doador (D) de radiação e absorção molecular da tetraciclina (TC),	66

oxitetraciclina (OTC) e clorotetraciclina (CTC) que atuam como aceptores (A) em **a)** pH 1,5; **b)** pH 4,6 e **c)** pH 7,4. Todas as tetraciclinas foram avaliadas a 1,0  $\mu\text{M}$ .....

**Figura 21.** Espectros de absorção molecular da ovalbumina (3,5  $\mu\text{M}$ ) com concentrações crescentes de **a)** TC, **b)** OTC e **c)** CTC..... 71

**Figura 22.** Perfil espectral na região do UV-Vis da ovalbumina (0,35  $\mu\text{M}$ ), tetraciclinas (17,5  $\mu\text{M}$ ) e o complexo formado entre proteína e ligante em diferentes valores de pH..... 72

**Figura 23.** Efeito da adição das tetraciclinas (TC, OTC e CTC) a ovalbumina comercial e in natura na mobilidade eletroforética por Native-PAGE..... 74

**Figura 24.** SDS-PAGE efeito da adição das tetraciclinas (TC, OTC e CTC) a OVAL comercial e in natura na mobilidade eletroforética da OVAL..... 75

**Figura 25.** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) para tetraciclina na presença e ausência da ovalbumina em pH 7,4..... 78

**Figura 26.** Expansão de diferentes regiões (a, b, c e d) dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) para TC na presença e ausência da ovalbumina em pH 7,4..... 79

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Principais equações para calcular a constante de ligação ( $K_b$ ).....	19
<b>Tabela 2.</b> Relação dos aminoácidos que compõem a ovalbumina.....	27
<b>Tabela 3.</b> Características das principais proteínas da clara do ovo.....	28
<b>Tabela 4.</b> Constantes de acidez das moléculas de tetraciclinas avaliadas.....	31
<b>Tabela 5.</b> Associação dos valores de $pK_a$ da tetraciclina (TC, como modelo) em função dos seus grupos.....	31
<b>Tabela 6.</b> Estudo da abertura da fenda de emissão e excitação em função da faixa linear da ovalbumina.....	42
<b>Tabela 7.</b> Constantes de quenching para o triptofano livre e ovalbumina frente a tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC) e clorotetraciclina (CTC) em pH 7,4 a 30 °C.....	47
<b>Tabela 8.</b> Parâmetros relativos a equação de Stern-Volmer quanto a avaliação do tipo de quenching para TC, OTC e CTC em diferentes condições de pH e temperatura.....	51
<b>Tabela 9.</b> Parâmetros relativos a constante de ligação e parâmetros termodinâmicos para TC, OTC e CTC em diferentes condições de pH e temperatura.....	54
<b>Tabela 10.</b> Parâmetros relacionados aos estudos de fluorescência sincronizada na avaliação do microambiente dos resíduos de aminoácidos tirosina e triptofano quanto a interação da ovalbumina com TC, OTC e CTC.....	58
<b>Tabela 11.</b> Características do perfil espectral dos gráficos de fluorescência em três dimensões (3D) para os sistemas ovalbumina e ovalbumina-TC, sendo avaliadas a ovalbumina comercial (C) e <i>in natura</i> (OVO). Indicações entre parêntesis são relativas ao percentual do sinal de emissão de fluorescência da proteína na ausência (100%) e presença do ligante.....	63
<b>Tabela 12.</b> Características do perfil espectral dos gráficos de fluorescência em três dimensões (3D) para os sistemas ovalbumina, ovalbumina-OTC e ovalbumina-CTC. Foram avaliadas a ovalbumina comercial (C) e <i>in natura</i> (OVO). Indicações entre parêntesis são relativas ao percentual do sinal de emissão de fluorescência da proteína na ausência (100%) e presença do ligante.....	63
<b>Tabela 13.</b> Parâmetros calculados relacionados ao processo de FRET e comparação com os dados da literatura.....	65
<b>Tabela 14.</b> Efeito de diversos íons metálicos nas constantes de ligação ( $K_b$ ) e número de sítios de ligação (n) no processo de interação entre a ovalbumina e as três tetraciclinas.....	67
<b>Tabela 15.</b> Avaliação de parâmetros espectrais relacionadas às medidas espectrofotométricas da ovalbumina (0,35 $\mu$ M), tetraciclinas (17,5 $\mu$ M) e o complexo formado entre proteína e ligante.....	68
<b>Tabela 16.</b> Comparação dos resultados obtidos com trabalhos da literatura.....	73
<b>Tabela 17.</b> Variação dos deslocamentos químicos ( $\delta$ ) para tetraciclina na presença e ausência da ovalbumina em pH 7,4.....	76
<b>Tabela 18.</b> Tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) para tetraciclina na presença e ausência da ovalbumina em pH 7,4.....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS

A – Absorvância

ANVISA - Agência nacional de vigilância sanitária

CD - Dicroísmo circular

CTC – Clorotetraciclina

DC - Doxociclina

DMC - Demeclociclina

FRET – Transferência de energia por ressonância de fluorescência

$K_b$  – Constante de ligação

$K_{SV}$  – Constante de Stern-Volmer

LMR - Limite máximo de resíduos

MAPA - Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento

MINO – Minociclina

MRE - Elipicidade molar do resíduo

MTC - Metaciclina

*Native*-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida nativa

OTC – Oxitetraciclina

OVAL – Ovalbumina

PAMVet - Programa de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos

PNCRC - Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

RMN - Ressonância magnética nuclear

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

STD - Diferença de transferência de saturação

TC – Tetraciclina

UV–Ultravioleta

TCs – Tetraciclinas

$\mu\text{M}$  – Micromolar

3D- Tridimensional

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1</b>	<b>Química supramolecular.....</b>	<b>11</b>
<b>1.2</b>	<b>Química supramolecular quanto a interação proteína-ligante.....</b>	<b>11</b>
<b>1.3</b>	<b>Técnicas empregadas para o estudo da interação proteína-ligante <i>in vitro</i>....</b>	<b>13</b>
1.3.1	Espectroscopia de absorção no UV-visível .....	14
1.3.2	Espectroscopia de fluorescência molecular.....	15
<i>1.3.2.1</i>	<i>Quenching de fluorescência .....</i>	<i>15</i>
<i>1.3.2.2</i>	<i>Constantes de ligação (<math>K_b</math>).....</i>	<i>18</i>
<i>1.3.2.3</i>	<i>Fluorescência tridimensional (fluorescência 3D) .....</i>	<i>20</i>
<i>1.3.2.4</i>	<i>Fluorescência sincronizada (synchronous fluorescence).....</i>	<i>20</i>
<i>1.3.2.5</i>	<i>Transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET).....</i>	<i>21</i>
<i>1.3.2.6</i>	<i>Estudos de competição.....</i>	<i>22</i>
1.3.3	Ressonância magnética nuclear (RMN).....	23
<i>1.3.3.1</i>	<i>Deslocamento químico (<math>\delta</math>).....</i>	<i>23</i>
<i>1.3.3.2</i>	<i>Tempos de relaxação longitudinal (<math>T_1</math>).....</i>	<i>23</i>
<i>1.3.3.3</i>	<i>Diferença de transferência de saturação (STD).....</i>	<i>23</i>
1.3.4	Eletroforese em gel.....	24
1.3.5	Dicroísmo circular (CD).....	25
<b>1.4</b>	<b>Ovalbumina: características gerais.....</b>	<b>26</b>
1.4.1	Ovalbumina: alimento.....	27
<b>1.5</b>	<b>Tetraciclinas .....</b>	<b>28</b>
<b>1.6</b>	<b>Justificativa do estudo proposto.....</b>	<b>33</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
<b>2.1</b>	<b>Geral.....</b>	<b>34</b>
<b>2.2</b>	<b>Específicos.....</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTAL.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Reagentes e preparo das soluções .....</b>	<b>35</b>
<b>3.2</b>	<b>Equipamentos utilizados.....</b>	<b>37</b>
<b>3.3</b>	<b>Procedimentos.....</b>	<b>37</b>
3.3.1	Determinação da concentração da ovalbumina.....	37
3.3.2	Estudo da abertura das fendas ( <i>slit</i> ) de excitação e emissão.....	38
3.3.3	Estudo cinético e efeito do pH.....	38

3.3.4	Fluorescência 3D.....	38
3.3.5	Interação proteína-ligante: titulações empregando fluorescência e UV-Vis.....	39
3.3.6	Estudo de competição.....;	39
3.3.7	Fluorescência sincronizada.....	39
3.3.8	Transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET).....	39
3.3.9	Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	40
3.3.10	Interação proteína-ligante por RMN <sup>1</sup> H.....	40
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Otimização dos parâmetros químicos e instrumentais.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2</b>	<b>Avaliação de pH e temperatura.....</b>	<b>42</b>
<b>4.3</b>	<b>Estudo cinético.....</b>	<b>46</b>
<b>4.4</b>	<b>Avaliação da acessibilidade dos resíduos de triptofano na ovalbumina.....</b>	<b>47</b>
<b>4.5</b>	<b><i>Quenching</i> de fluorescência.....</b>	<b>48</b>
<b>4.6</b>	<b>Constante de ligação e parâmetros termodinâmicos.....</b>	<b>52</b>
<b>4.7</b>	<b>Estudos por fluorescência sincronizada.....</b>	<b>55</b>
<b>4.8</b>	<b>Estudos por fluorescência tridimensional (3D).....</b>	<b>60</b>
<b>4.9</b>	<b>Transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET).....</b>	<b>64</b>
<b>4.10</b>	<b>Estudo de competição.....</b>	<b>66</b>
<b>4.11</b>	<b>Comparações dos resultados obtidos com os valores da literatura.....</b>	<b>68</b>
<b>4.12</b>	<b>Estudos por UV-Vis.....</b>	<b>69</b>
<b>4.13</b>	<b><i>Native</i>-PAGE e SDS-PAGE.....</b>	<b>74</b>
<b>4.14</b>	<b>Deslocamento químico (<math>\delta</math>).....</b>	<b>76</b>
<b>4.15</b>	<b>Tempos de relaxação longitudinal (<math>T_1</math>).....</b>	<b>80</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>81</b>
<b>5.1</b>	<b>Perspectivas futuras.....</b>	<b>83</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>84</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Química supramolecular

O conceito de química supramolecular foi proposto pela primeira vez em 1978, pelo químico francês Jean-Marie Lehn como a “*química além da molécula*” (LEHN, 1996). Neste contexto, a *química molecular* é baseada na formação de ligações covalentes, enquanto que a *química supramolecular* está relacionada as associações moleculares organizadas através de ligações não covalentes, tais como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas, entre outras (HALL, 2004). Interações estas que são a base dos processos biológicos entre substratos e enzimas, DNA e fármacos, reconhecimento celular e indução de sinais através de neurotransmissores.

## 1.2 Química supramolecular quanto a interação proteína-ligante

As proteínas desempenham um conjunto diversificado de atividades no meio *intra* e *extra* celular e grande parte dessas funções são baseadas na capacidade de desempenharem uma atividade comum: ligação (interação) química<sup>1</sup>. As proteínas podem se ligar umas às outras, a diferentes macromoléculas, a moléculas pequenas (ligantes) e a íons, definindo desta forma, suas funções no organismo (LODISH, et al., 2005).

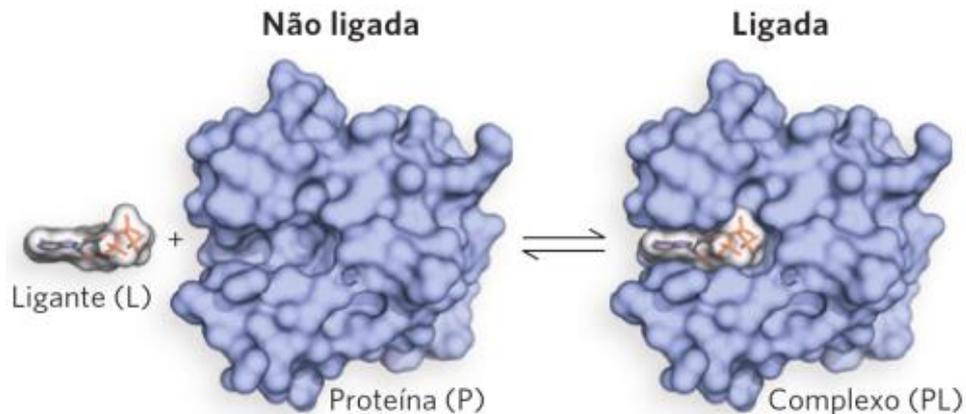
O estudo das interações proteína-ligante, incluindo íons, substratos, cofatores e outras proteínas é a base central para o entendimento de muitos processos biológicos como catálise enzimática, sinalização receptor-molécula pequena e transporte seletivo (HELD, et al., 2011; ALLISON, et al., 2014). A região de uma proteína que interage com o ligante é denominada sítio de ligação do ligante, o qual consiste em uma cavidade na superfície da proteína, formada pelo arranjo específico de aminoácidos que ficam próximos do ligante (SALENTIN, et al., 2014; ALBERTS, et al., 2010).

Em geral, quando uma proteína se liga de forma reversível a um determinado ligante este sistema pode ser representado pela equação de equilíbrio genérica:  $P + L \rightleftharpoons PL$ , onde (P) representa a proteína, (L) o ligante e (PL) o complexo proteína-ligante. A Figura 1 representa a formação do complexo proteína-ligante através de ligação reversível (COX; DOUDNA; O'DONNELL, 2012).

---

<sup>1</sup> O sentido do uso da palavra *ligação* no âmbito supramolecular será sempre relacionado a *interação* entre proteínas e ligantes, ou outras macromoléculas.

**Figura 1.** Exemplo de ligação reversível proteína-ligante



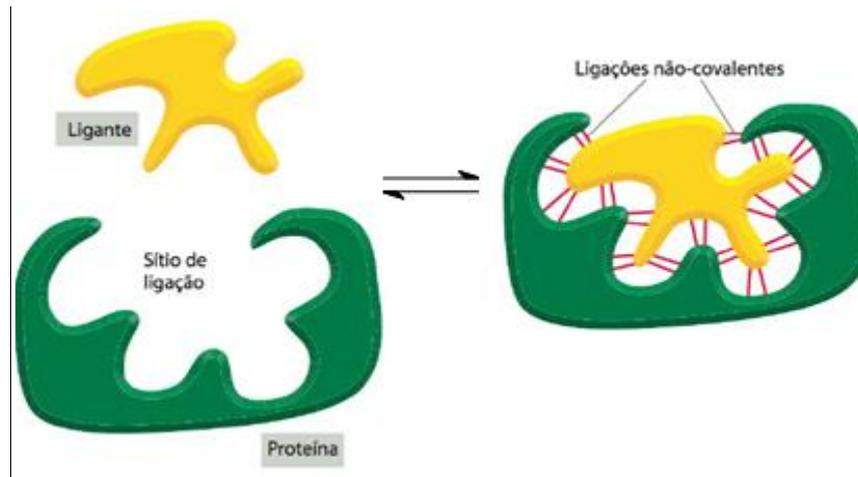
*Fonte: COX; DOUDNA; O'DONNELL, 2012.*

A habilidade de uma proteína em se ligar seletivamente e com alta afinidade a um ligante depende da formação de um conjunto de ligações fracas não-covalentes como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, interações de Van der Waals, além de interações hidrofóbicas.

As ligações de hidrogênio são responsáveis pela manutenção das conformações bioativas das  $\alpha$ -hélices das proteínas e das bases purinas-pirimidinas dos ácidos nucleicos. Essas interações são formadas entre átomos eletronegativos, como oxigênio, nitrogênio, flúor, e o átomo de hidrogênio de ligações O-H e N-H, principalmente. A energia envolvida neste processo varia de 0,24 a 2,4 kcal/mol. As interações eletrostáticas resultam da interação entre dipolos e/ou íons de cargas opostas, e sua magnitude depende diretamente da constante dielétrica do meio e da distância entre as cargas. A água apresenta constante dielétrica ( $\epsilon$ ) igual a 80, devido ao seu momento de dipolo permanente, isto pode resultar na diminuição das forças de atração e repulsão entre dois grupos carregados solvatados. A energia envolvida nessa interação varia de 1,0 a 7,0 kcal/mol. As interações do tipo Van der Waals ocorrem com a aproximação de moléculas apolares que apresentam dipolos induzidos, em função da polarização transiente de ligações carbono-hidrogênio ou carbono-carbono. Em geral, essas interações são individualmente fracas, e sua energia varia de 0,5 a 1,0 kcal/mol. As interações hidrofóbicas são individualmente fracas com energia da ordem de 1,0 kcal/mol e ocorrem em função da interação entre cadeias ou subunidades apolares. Normalmente, as cadeias ou subunidades hidrofóbicas, presentes tanto no sítio receptor como no ligante, se encontram organizadamente solvatadas por camadas de moléculas de água. Como comparativo, as ligações covalentes simples envolvem a formação de uma ligação sigma entre dois átomos que

contribuem cada qual com um elétron, estas ligações apresentam elevada energia que varia de 77 a 88 kcal/mol (BARREIRO; FRAGA, 2015). Assim, para que haja uma interação efetiva entre o ligante e a proteína é necessário que ocorra a formação de muitas ligações fracas simultaneamente entre o ligante e a proteína, de acordo com o esquema da Figura 2 (ALBERTS, et al., 2010).

**Figura 2.** Conjunto de ligações não covalentes seletivas para o sistema proteína-ligante.



Fonte: ALBERTS, et al., 2010

A interação proteína-ligante poderá em alguns casos alterar a conformação da proteína de uma forma que sua estrutura e função será diferente daquela no estado de livre, através de mudanças conformacionais induzidas pela ligação proteína-ligante (HU; LI, 2014).

O estudo da interação entre proteínas e ligantes *in vitro* através de técnicas instrumentais é importante para o entendimento das alterações estruturais, funcionais e termodinâmicas da interação proteína-ligante, visto que a identificação das interações proteína-ligante *in vivo* necessita da validação de estudos *in vitro*, uma vez que existe maior possibilidade da geração de resultados falso positivo em estudos *in vivo* (PIHLER, 2005). A partir de estudos *in vitro* por técnicas instrumentais podem ser obtidas informações acerca das mudanças que ocorrem na estrutura da proteína ao interagir com um ligante, as forças que atuam na interação proteína-ligante, mudanças no microambiente dos resíduos dos aminoácidos que interagem com o ligante, entre outras informações (HU; LI, 2014). Desta forma, neste trabalho empregou-se algumas técnicas para o estudo e avaliação da interação proteína-ligante *in vitro*.

### 1.3 Técnicas empregadas para o estudo da interação proteína-ligante *in vitro*

Para o estudo da interação entre proteína-ligante *in vitro* diversas estratégias empregando técnicas instrumentais ou não, podem ser utilizadas, tais como: equilíbrio de

diálise, fluorescência molecular, UV-visível, infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), eletroforese (em gel de poliacrilamida e capilar), espectrometria de massas, dicroísmo circular (CD), ressonância magnética nuclear (RMN), ressonância de plasma de superfície, cromatografia de afinidade, modelagem molecular, entre outras (DONG; MA; LIU, 2013).

Neste estudo, foram utilizadas as técnicas espectroscópicas de absorção no UV-Visível, fluorescência molecular, ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e eletroforese em gel de poliacrilamida (*native-PAGE* e *SDS-PAGE*) para avaliação da interação entre a proteína ovalbumina e três tetraciclinas, nomeadamente tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC) e clorotetraciclina (CTC). Esta avaliação possibilitou o cálculo dos valores das constantes de interação, número de sítios de ligação, dados termodinâmicos, além de outros parâmetros associados a estas técnicas. Desta forma, algumas técnicas empregadas nos estudos de interação macromolécula-ligante foram descritas abaixo, considerando os principais aspectos das informações que podem ser obtidas quanto a interação entre proteína e ligante *in vitro*.

### 1.3.1 Espectroscopia de absorção no UV-visível

A espectroscopia de absorção no UV-Visível é uma técnica que pode ser utilizada para avaliar as alterações estruturais da proteína, além de analisar a formação do complexo proteína-ligante (RANJBAR, et al., 2013).

Este estudo pode ser realizado através do monitoramento das alterações das propriedades de absorção da proteína livre e ligada, em que se observa um aumento na intensidade da banda de absorção quando a proteína livre é associada a um ligante, o que indica a formação de um complexo proteína-ligante (YU, et al., 2014).

Através desta técnica pode-se monitorar o ligante ou a proteína, contudo, prefere-se a avaliação da proteína, uma vez que, as mudanças na estrutura da proteína podem ser monitoradas através de alterações espectrais. Para ilustrar, as proteínas geralmente apresentam duas bandas de absorção uma em  $\sim 220$  nm que corresponde as características da estrutura  $\alpha$ -hélice, e outra banda de absorção em 280 nm que corresponde aos resíduos dos aminoácidos triptofano e tirosina (ZHANG, G., et al., 2012; YUE, et al., 2008).

Diversas alterações nos espectros de absorção UV-Vis das proteínas podem ser observadas como deslocamento ou aumento da banda de absorção. Quando há um aumento na intensidade da absorvância, ao adicionar concentrações crescentes do ligante à proteína, é um indicativo de que houve a formação de um complexo proteína-ligante (XING, et al., 2013). Uma vez que, o ligante dificulta a rotação ao redor das ligações peptídicas e altera a estrutura da proteína (KHAN, et al., 2012; CHI, et al., 2010). O deslocamento da banda de absorção traz

informações acerca da polaridade do microambiente dos resíduos dos aminoácidos triptofano e tirosina. Um deslocamento para maiores comprimentos de onda indica o microambiente tornou-se mais polar (HOUSAINDOKHT, et al., 2012).

### 1.3.2 Espectroscopia de fluorescência molecular

A espectroscopia de fluorescência molecular é uma técnica amplamente utilizada no estudo das interações entre moléculas pequenas como medicamentos, inibidores, espécies tóxicas, corantes, pesticidas entre outros, e macromoléculas como proteínas e DNA, uma vez ser relativamente simples, de fácil operação e sensível (MADRAKIAN, et al., 2014).

Para que se possa monitorar o processo de interação, o sinal (intensidade) da fluorescência deve ser alterado (aumentar ou diminuir) considerando a presença e ausência do ligante no meio proteico. Assim, nos estudos de fluorescência molecular para avaliar interação proteína-ligante podem-se empregar algumas estratégias, sendo: **i)** usar o sinal da fluorescência intrínseca da proteína; **ii)** utilizar o sinal da fluorescência do ligante (quando este for passível de fluorescer) e **iii)** empregar uma sonda que interaja com a proteína e emita em um comprimento de onda diferente da proteína e do ligante isolados (equilíbrio de competição), neste caso, quando proteína e ligante emitirem na mesma faixa espectral. Quando possível, a melhor estratégia é monitorar o sinal direto da proteína, pois permite avaliar possíveis alterações na macromolécula em função da presença do ligante.

Para as proteínas as medidas da intensidade do sinal de fluorescência podem fornecer informações sobre a interação com moléculas pequenas, como: o mecanismo de ligação se ocorre por *quenching* (dinâmico, estático ou ambos), número de sítios de ligação (estequiometria), constantes de ligação ( $K_b$ ), parâmetros termodinâmicos ( $\Delta H$ ,  $\Delta S$  e  $\Delta G$ ), tipo de forças intermoleculares envolvidas no processo de interação proteína-ligante, distâncias intermoleculares, entre outros parâmetros (KANDAGAL, et al., 2006).

Neste estudo, utilizou-se as seguintes estratégias empregando a espectrofluorimetria: medidas de fluorescência no estado estacionário, estudo do mecanismo de *quenching*, fluorescência tridimensional (fluorescência 3D), fluorescência sincronizada (*synchronous fluorescence*) e transferência de energia ressonante (FRET, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), para avaliação da interação da ovalbumina com as diferentes tetraciclinas.

#### 1.3.2.1 *Quenching de fluorescência*

*Quenching* é a redução da intensidade de fluorescência de um fluoróforo devido a uma variedade de processos moleculares tais como: rearranjos moleculares, transferência de energia,

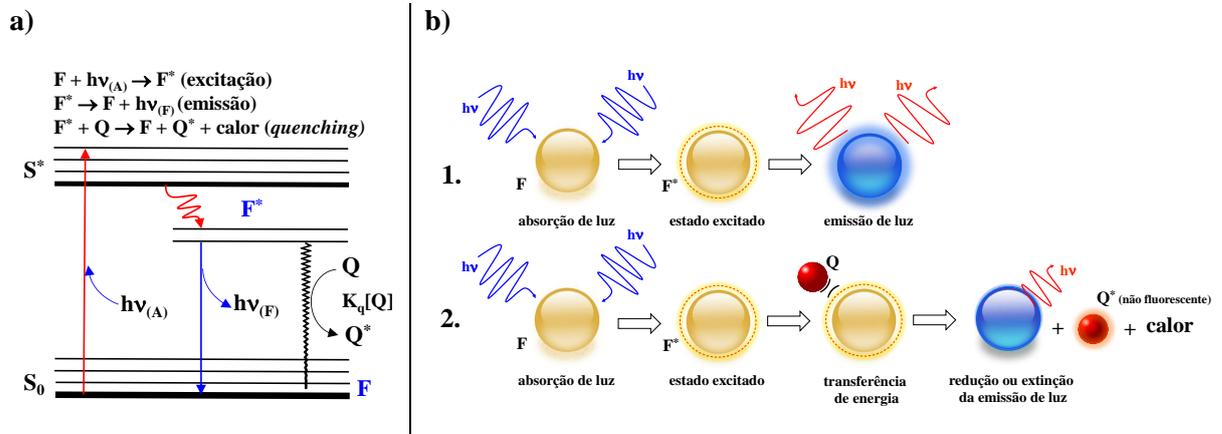
formação de complexo no estado fundamental e extinção por colisional. A molécula ou espécie que entra em contato com o fluoróforo no estado excitado e o desativa inibindo sua fluorescência, é denominada *quencher* (WANG, et al., 2015).

Em geral, a fluorescência intrínseca da proteína é relacionada aos resíduos dos aminoácidos aromáticos: triptofano, tirosina e fenilalanina, que são fluorescentes e atuam como fluoróforos. A fluorescência intrínseca de muitas proteínas é associada, principalmente, ao resíduo de triptofano. Isto se dá em função da fenilalanina apresentar baixo rendimento quântico, e a fluorescência da tirosina ser parcialmente desativada quando está ionizada e próxima de um grupo amino, carboxílico ou resíduo de triptofano (ZHANG, et al., 2008).

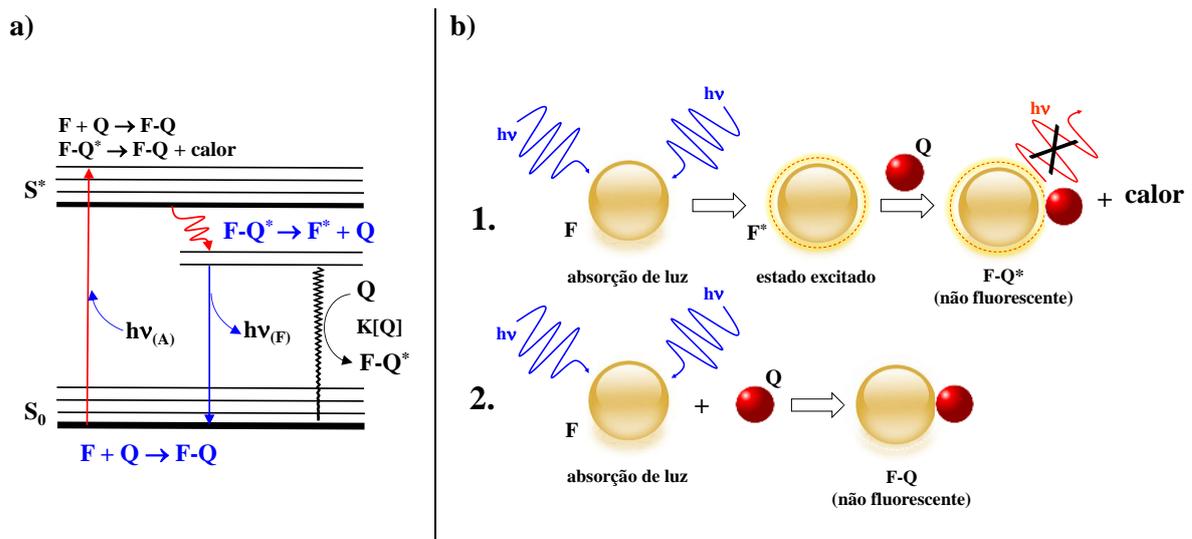
Através dos estudos de *quenching* de fluorescência pode-se inferir sobre o mecanismo de interação que ocorre entre o fluoróforo (no caso das proteínas, os resíduos dos aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina) e o *quencher* (ligante). Os diferentes mecanismos relacionados ao processo de *quenching* são geralmente classificados como *quenching* dinâmico (colisional) ou estático. Mas em alguns casos pode ocorrer os dois mecanismos de forma simultânea. O *quenching* dinâmico ocorre quando o fluoróforo no estado-excitado ( $F^*$ ) é desativado ao entrar em contato com outra molécula (Q). O contato entre ambos é momentâneo, ocorrendo apenas durante a existência do estado excitado (tempo da ordem de ns). O *quenching* estático refere-se à formação de um complexo não-fluorescente (F-Q). Este mecanismo ocorre no estado fundamental e não depende de processos de difusão ou colisões moleculares (MOLINA-BOLÍVAR, et al, 2014). Esses sistemas de desativação do fluoróforo podem ser representados esquematicamente como uma transferência de energia a partir de uma espécie excitada ( $F^*$ ) e uma espécie *quencher* (Q). As Figuras 3 e 4 representam os esquemas das duas possíveis formas de desativação do fluoróforo (F) no estado fundamental e excitado pela presença de uma espécie *quencher*.

A partir dos esquemas apresentados nas Figuras 3a e 3b observa-se que o fluoróforo na ausência do *quencher* absorve luz, passa para o estado excitado e emite radiação (fluorescência). Quando o fluoróforo no estado excitado entra em contato com o *quencher* e ocorre uma colisão entre ambos, isto resulta na desativação radioativa do fluoróforo. Após esta colisão, a transferência de energia ocorre do fluoróforo no estado excitado para o *quencher*. Como resultado, o fluoróforo não emite fluorescência e ocorre uma diminuição no sinal.

**Figura 3.** Esquemas representando o processo de quenching dinâmico ou colisional. a) Níveis de energia (diagrama de Jablonski) para o processo de quenching dinâmico. b) Representação genérica de um sistema na ausência (1) e presença de um quencher Q (2).



**Figura 4.** Esquemas representando o processo de quenching estático. a) Níveis de energia (diagrama de Jablonski) para o processo de quenching estático. b) Representação genérica de um sistema na presença de um quencher Q.



No esquema da Figura 4a verifica-se que o fluoróforo no estado excitado entra em contato com o *quencher*, e há a formação de um complexo não fluorescente (F–Q), que resulta na desativação radioativa do fluoróforo e liberação de calor. Como resultado global, há uma diminuição no sinal de fluorescência.

Para o mecanismo de *quenching* dinâmico a redução da intensidade de fluorescência é descrita pela equação de Stern-Volmer, indicada a seguir:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] \quad \text{ou} \quad \frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [Q] \quad \text{Equação (1)}$$

em que,  $F_0$  e  $F$  são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do ligante, respectivamente;  $K_q$  é a constante de velocidade de *quenching* bimolecular difusional ( $2,0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ),  $\tau_0$  é o tempo de vida médio ( $10^{-8} \text{ s}$ ),  $[Q]$  é a concentração do ligante que atua como *quencher* e  $K_{sv}$  é a constante de *quenching* dinâmico. A equação de Stern-Volmer indica a sensibilidade do fluoróforo frente a sua interação com o ligante. Esta equação é baseada no mecanismo de *quenching*, onde o sinal analítico da fluorescência diminui na presença de um supressor (LAKOWICZ, 2006).

Para o mecanismo de *quenching* estático matematicamente chega-se a uma equação igual a de Stern-Volmer. Contudo, quando o estudo é realizado com proteínas e os resíduos de triptofano podem apresentar diferença de acessibilidade pelo ligante (em função da conformação da macromolécula) e considerando-se a formação de um complexo supramolecular, a redução da intensidade de fluorescência pode ser melhor descrita pela equação de Stern-Volmer modificada, indicada a seguir:

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f K [Q]} + \frac{1}{f} \quad \text{Equação (2)}$$

em que,  $F_0$  e  $F$  são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do ligante, respectivamente;  $[Q]$  é a concentração do ligante que atua como *quencher*,  $f$  é a fração do fluoróforo que está acessível ao *quencher* e  $K$  é a constante de *quenching* estático (CARUSO, et al., 2012).

Para avaliação do mecanismo de *quenching* que está ocorrendo o experimento deve ser realizado em diferentes temperaturas, e a seguir, calcula-se os valores da constante ( $K_{sv}$  ou  $K$ ). Quando o valor da constante aumenta em função da elevação da temperatura é indicativo de *quenching* dinâmico, uma vez que temperaturas mais elevadas levam a um maior coeficiente de difusão, e por consequência um maior número de choques entre o fluoróforo (proteína) e o *quencher* (ligante). Quando os valores da constante diminuem com o aumento da temperatura é indicativo de *quenching* estático, visto que temperaturas elevadas afetam a estabilidade do complexo fluoróforo-*quencher*, ou seja proteína-ligante (ZHANG, et al., 2009).

### 1.3.2.2 Constantes de ligação ( $K_b$ )

A partir da variação do sinal de fluorescência na presença do ligante é possível calcular o valor da constante de ligação ( $K_b$ ) e determinar a estequiometria do complexo macromolecular formado entre proteína e ligante ( $n$ ). Para tanto, existem algumas equações que relacionam a variação da intensidade da fluorescência da proteína ou complexo com o aumento

da concentração do ligante. A Tabela 1 apresenta uma compilação das principais equações disponíveis na literatura com as respectivas características.

**Tabela 1.** Principais equações para calcular a constante de ligação ( $K_b$ )

Descrição matemática	Características	Equação
$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_b + n \log [Q]$	i. Usada na forma logarítmica; ii. Emprega a concentração total do ligante quando deveria usar a concentração na forma livre.	(3)
$\log \frac{F_0 - F}{F} = n \log K_b + n \log \left( \frac{1}{[Q] - \frac{F_0 - F \cdot [P]}{F_0}} \right)$	i. Usada na forma logarítmica; ii. Emprega a concentração total do ligante e da proteína.	(4)
$\frac{1}{F_0 - F} = \frac{1}{F_0} + \frac{1}{K_b F_0 [Q]}$	i. Usada na forma linear; ii. Emprega a concentração livre do ligante.	(5)
$\frac{1}{\left(1 - \frac{F_0 - F}{F_0}\right) k} = \frac{[Q]}{F_0 - F} - n[P]$	i. Usada na forma linear; ii. Emprega a concentração total da proteína e do ligante.	(6)

**Fonte:** PADAYACHEE; WHITELEY, 2011; LI, et al., 2013; WANG, et al., 2013; ZHOU; LIANG; WANG, 2008.

Nas equações listadas da Tabela 1,  $K_b$  é a constante de ligação,  $n$  o número de sítios de ligação,  $F_0$  e  $F$  são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do ligante, respectivamente,  $[Q]$  é a concentração do ligante (*quencher*) e  $[P]$  é a concentração da proteína. Estas equações apresentam algumas vantagens e desvantagens que devem ser levadas em consideração na sua escolha para calcular a constante de ligação nos estudos de interação proteína-ligante.

As equações 3 apresentam a vantagem de informar o número de sítios de ligação e como desvantagens a utilização da função logarítmica e da concentração total do ligante (e não livre). A equação 4, de forma similar a 3, tem como vantagem o emprego da concentração da proteína. A equação 5 apresenta as vantagens de utilizar a função linear e empregar a concentração livre do ligante, e a desvantagem de não informar o número de sítios de ligação. E por fim, a equação 6 apresenta como vantagens a não utilização da função logarítmica e informar a proporção do número de sítios de ligação, sua desvantagem é não levar em consideração a concentração da proteína e do ligante.

### ***1.3.2.3 Fluorescência tridimensional (fluorescência 3D)***

A fluorescência tridimensional é um método analítico que fornece informações acerca das mudanças na estrutura secundária da proteína e do microambiente do resíduo do aminoácido triptofano na presença do ligante (SHARMA; ANANDAKUMAR; ILANCHELIAN, 2014).

Este estudo pode ser realizado através do monitoramento das alterações nas intensidades dos picos de fluorescência da proteína livre e ligada, onde observa-se uma variação da intensidade do pico de fluorescência quando a proteína livre está associada a um ligante, o que indica que houve mudança no microambiente da proteína ao interagir com o ligante (GUO, et al., 2014).

Através deste método pode-se observar dois picos, um em 280 nm que corresponde as características espectrais dos resíduos dos aminoácidos triptofano e tirosina, e o segundo pico em ~220 nm que corresponde ao esqueleto do polipeptídeo da estrutura secundária da proteína (ZHANG, Y., et al., 2008). Quando ocorrer redução da fluorescência de ambos os picos, após a adição do ligante, é um indicativo de que ocorreu interação entre a proteína e o ligante, e que a estrutura da proteína foi alterada tornando-se menos enovelada com a exposição de alguns resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (XU, et al., 2012).

### ***1.3.2.4 Fluorescência sincronizada (synchronous fluorescence)***

A fluorescência convencional envolve a obtenção de um espectro de emissão pela varredura em uma determinada faixa de comprimentos de onda ( $\lambda_{em}$ ) quando uma amostra é irradiada em um comprimento de onda de excitação ( $\lambda_{exc}$ ) fixo. A fluorescência sincronizada ocorre quando os  $\lambda_{exc}$  e  $\lambda_{em}$  são variados simultaneamente mantendo-se constante a velocidade de varredura para os dois monocromadores em um intervalo de comprimento de onda ( $\Delta\lambda$ ) constante entre  $\lambda_{exc}$  e  $\lambda_{em}$  (SOTOMAYOR, et al., 2008).

A fluorescência sincronizada é um método analítico que indica mudanças no microambiente da região dos fluoróforos (triptofano e tirosina), essas mudanças estão relacionadas com a polaridade do microambiente onde está localizado o fluoróforo na proteína. Quando a diferença entre o comprimento de onda de excitação e emissão ( $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$ ) é igual a 60 nm, monitora-se o microambiente dos resíduos de triptofano, enquanto que para  $\Delta\lambda = 15$  nm, se avalia o microambiente dos resíduos de tirosina (KABOUDIN, et al., 2013).

Este estudo pode ser realizado através do monitoramento do deslocamento das bandas do espectro de fluorescência da proteína livre e ligada. Quando há um deslocamento para maiores comprimentos de onda indica que o microambiente da região do fluoróforo (ou seja, dos resíduos de aminoácido tirosina ou triptofano) tornou-se mais polar ao interagir com o

ligante. Quando há um deslocamento para menores comprimentos de onda indica que o microambiente da região do fluoróforo tornou-se mais apolar ao interagir com o ligante (SUN, et al., 2012). Desta forma, por este estudo, é possível inferir se ocorreu alterações na estrutura original da proteína após a interação com o ligante, usando os resíduos de aminoácidos aromáticos tirosina e triptofano como fluoróforos.

### 1.3.2.5 Transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET)

O processo de FRET é um fenômeno físico que ocorre com a transferência de energia de um doador (fluoróforo) no estado excitado a um receptor (ligante), podendo o ligante após absorver energia emití-la (fluorescência) em maiores comprimentos de onda ou atuar como *quencher* (Figura 5a). De acordo com a teoria de Förster acerca da transferência de energia não-radiativa (FRET), este processo entre o doador e receptor depende dos seguintes fatores: (i) orientação relativa dos dipolos dos doadores e receptores, (ii) do grau de sobreposição do espectro de fluorescência do doador com o espectro de absorção do receptor, e (iii) da distância entre o doador e o receptor ( $r_0$ ). A distância entre o doador e o receptor deve ser menor que 8-10 nm para que ocorra transferência de energia diferente de zero. Através deste método pode-se avaliar a interação proteína-ligante e calcular a distância entre o ligante e o(s) resíduo(s) de triptofano da proteína (NAVEENRAJ, et al., 2013; NASERI, et al., 2015).

A distância ( $r$ ) entre o doador e o receptor pode ser calculada através da equação:

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r_0^6} \quad \text{Equação (7)}$$

em que,  $F_0$  e  $F$  são a intensidade de fluorescência do doador na ausência e na presença do ligante, respectivamente;  $E$  é a fração de energia transferidas do doador para o receptor,  $r_0$  é a distância entre o ligante e o doador, e  $R_0$  é a distância crítica de Förster, quando 50% (0,5) da energia de emissão do doador é transferida para o receptor (Figura 5b). A equação da distância crítica ( $R_0$ ) pode ser descrita como:

$$R_0^6 = \frac{8,8 \times 10^{-25} k^2 \Phi J}{N^4} \quad \text{Equação (8)}$$

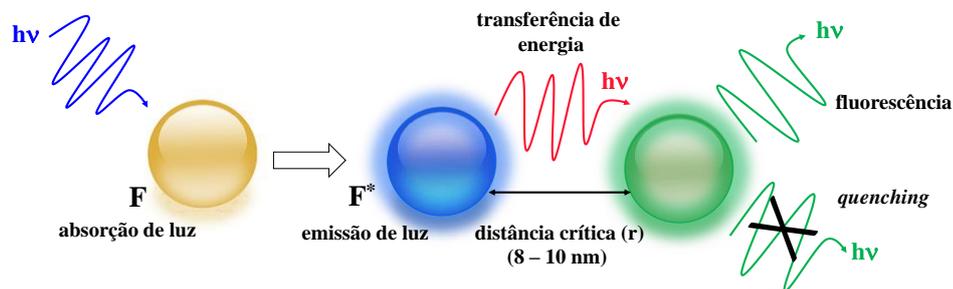
em que,  $k^2$  é o fator que descreve a orientação dos dipolos de transição do doador e do receptor,  $N$  é o índice de refração médio do meio no comprimento de onda onde a sobreposição dos espectros é significativa,  $\Phi$  é o rendimento quântico da fluorescência do doador, e se sobrepõem integrante,  $J$ , é a área de sobreposição do espectro de emissão de fluorescência normalizado do doador e em relação ao espectro de absorção do receptor (Figura 5c). A área de sobreposição ( $J$ ) pode ser calculada pela equação:

$$J = \frac{\sum F(\lambda)\varepsilon(\lambda)\lambda^4\Delta\lambda}{\sum F(\lambda)\Delta\lambda} \quad \text{Equação (9)}$$

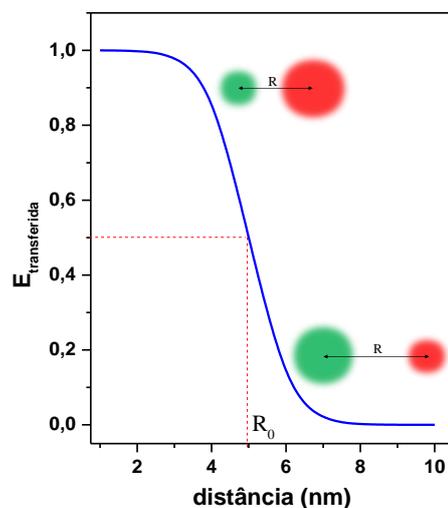
Nesta equação,  $F(\lambda)$  é a fluorescência do doador, e  $\varepsilon(\lambda)$  é o coeficiente de absorção molar do receptor, o qual pode ser obtido através da lei de Beer (MEHRANFAR, et al., 2013).

**Figura 5.** **a)** Representação genérica de um sistema com transferência de energia com e sem (re)emissão de luz; **b)** Gráfico da relação entre a transferência de energia ( $E$ ) e a distância entre doador (verde) e receptor (vermelho) com destaque para  $R_0$  ( $E = 50\%$  ou 0,5) e **c)** Sobreposição espectral (área hachurada -  $J$ ) do espectro de emissão do doador em relação ao espectro de absorção do receptor.

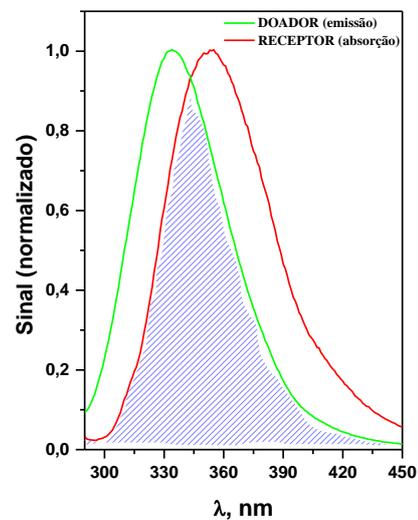
**a)**



**b)**



**c)**



Fonte: adaptado de JAMESON, 2014.

### 1.3.2.6 Estudos de competição

Os íons metálicos desempenham papel importante em muitos processos biológicos, como nutrientes, no transporte de oxigênio, como cofatores enzimáticos e participando de outras funções nos sistemas biológicos (ROY, et al., 2013). A presença de íons metálicos pode afetar a interação entre o ligante e a proteína. O parâmetro utilizado para avaliar se a interação entre o ligante e a proteína foi afetada na presença de íons metálicos é a constante de ligação  $K_b$ , uma vez que este parâmetro pode sofrer alterações (XIAO, et al., 2007). Este estudo é

realizado por fluorescência molecular, onde avalia-se a constante de ligação ( $K_b$ ) entre a proteína e o ligante na ausência e na presença do íon metálico.

### 1.3.3 Ressonância magnética nuclear (RMN)

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica espectroscópica que permite a determinação das propriedades estruturais e dinâmicas de macromoléculas biológicas como proteínas, DNA e RNA, lipídios, entre outras. Além do mapeamento da interação dessas macromoléculas com íons metálicos, medicamentos, complexos, e outras moléculas pequenas (DE RICCO, et al., 2014).

Diversos parâmetros físicos da RMN podem ser utilizados para determinar a interação entre o ligante e a proteína tais como: as alterações do deslocamento químico ( $\delta$ ), as diferenças dos tempos de relaxação ( $T_1$ ), as variações das constantes de difusão ( $D$ ), as mudanças do efeito Overhauser nuclear (NOE), e a diferença de transferência de saturação (STD), entre outras (MEYER; PETERS, 2003).

#### 1.3.3.1 Deslocamento químico ( $\delta$ )

O deslocamento químico ( $\delta$ ) é um parâmetro físico da RMN empregado para avaliação das alterações estruturais ocorridas na proteína quando um ligante é adicionado ou para monitorar as variações dos sinais do ligante na presença da proteína. Através deste parâmetro pode-se determinar a localização do sítio de ligação, a afinidade do ligante e a possível estrutura do complexo proteína-ligante. Este estudo pode ser efetuado através da medida dos deslocamentos químicos em cada ponto de uma titulação, e da medida da variação da posição dos picos. O deslocamento químico é expresso em *ppm* e corresponde à medida da diferença entre a frequência de ressonância entre a amostra ( $\nu$ ) e um padrão interno ( $\nu^0$ ).

Para estudos de interação empregando RMN de  $^1\text{H}$  o padrão interno mais utilizado em meio aquoso é o ácido trimetilsilil propanóico (TPS,  $(\text{CH}_3)_3\text{Si}(\text{CD})_2\text{CO}_2\text{Na}$ ). Este composto é inerte, não volátil e possui uma constante de blindagem muito elevada (ROUESSAC; ROUESSAC, 2007).

#### 1.3.3.2 Tempos de relaxação longitudinal ( $T_1$ )

O processo de relaxação longitudinal  $T_1$  é conduzido através de um campo magnético flutuante, associado ao movimento molecular. A relaxação longitudinal ou relaxação *spin* rede, corresponde à troca de energia entre os *spins* excitados e a vizinhança (rede), e restabelece o equilíbrio térmico dos *spins*, correspondendo assim a um processo entálpico. A medida de  $T_1$

do ligante na presença e ausência da macromolécula consiste no método denominado de inversão-recuperação (IR). O valor de  $T_1$  é então calculado a partir da intensidade do sinal de RMN em função do tempo pela aplicação de um pulso de rádio frequência (*rf*) de  $180^\circ$  (na qual o sentido da magnetização  $M_0$  é invertido), seguido de um tempo e de um pulso de  $90^\circ$ , antes da aquisição do sinal de RMN (VENÂNCIO, et al., 2005).

#### 1.3.4 Eletroforese em gel

A eletroforese é uma técnica que permite a análise do perfil de migração de moléculas carregadas num campo elétrico. Através desta técnica é possível analisar e purificar diferentes tipos de biomoléculas, especialmente as proteínas. Nesta técnica, uma matriz de gel polimerizado (poliacrilamida para proteínas e agarose para DNA), pode ser utilizado como o meio suporte. A migração das moléculas pode ser influenciada através dos seguintes parâmetros: aplicação de campo elétrico, matriz do gel, tamanho, carga e forma química das moléculas a serem separadas. Para o estudo da interação entre proteínas e ligantes dentre os métodos de eletroforese em gel de poliacrilamida empregados estão a eletroforese em gel de poliacrilamida nativa (*native*-PAGE) e a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (ROY; KUMAR; GURUSUBRAMANIAN, 2012).

Tanto a *native*-PAGE como a SDS-PAGE são empregados para o estudo das mudanças na carga molecular da proteína na ausência e após a com a adição de agentes desnaturantes, respectivamente, ou seja, na ausência e na presença do ligante. Na *native*-PAGE, as proteínas presentes na amostra são separadas de acordo com sua carga líquida nativa e seu peso molecular. A SDS-PAGE ocorre na presença do detergente aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS) que forma interações hidrofóbicas com as proteínas, adiciona carga negativa e atua como agente desnaturante, onde desfaz parcialmente a estrutura tridimensional da mesma. Além disto, a adição de agentes redutores como ditioneitol ou  $\beta$ -mercaptoetanol reduzem as ligações dissulfeto, e desenovelam as estruturas terciárias e eventuais estruturas quaternárias antes da separação eletroforética (MORAES, et al., 2013).

Quando há um aumento ou uma diminuição na mobilidade eletroforética da proteína na presença do ligante em comparação com a proteína livre (controle), é um indicativo de que houve interação entre a proteína e o ligante (TRNKOVÁ, et al., 2011).

#### 1.3.5 Dicroísmo circular (CD)

O dicroísmo circular (CD) é uma técnica empregada para monitorar alterações na estrutura secundária da proteína, após sua interação com o ligante. As proteínas apresentam

duas bandas negativas na região do ultravioleta (UV) em 208 e 222 nm, que são características da estrutura  $\alpha$ -hélice das proteínas. O conteúdo de  $\alpha$ -hélice da proteína na ausência e na presença do ligante pode ser calculado a partir da elipicidade molar do resíduo (MRE) representada na (equação 10), pode ser expressa em  $\text{deg cm}^2 \text{ d mol}^{-1}$ , utilizando a equação 11:

$$\theta_{\text{MRE}} = \frac{\theta_{\text{m}}}{10} \left[ \frac{\text{grau.cm}^2}{\text{dmol.resíduo}} \right] \quad \text{Equação (10)}$$

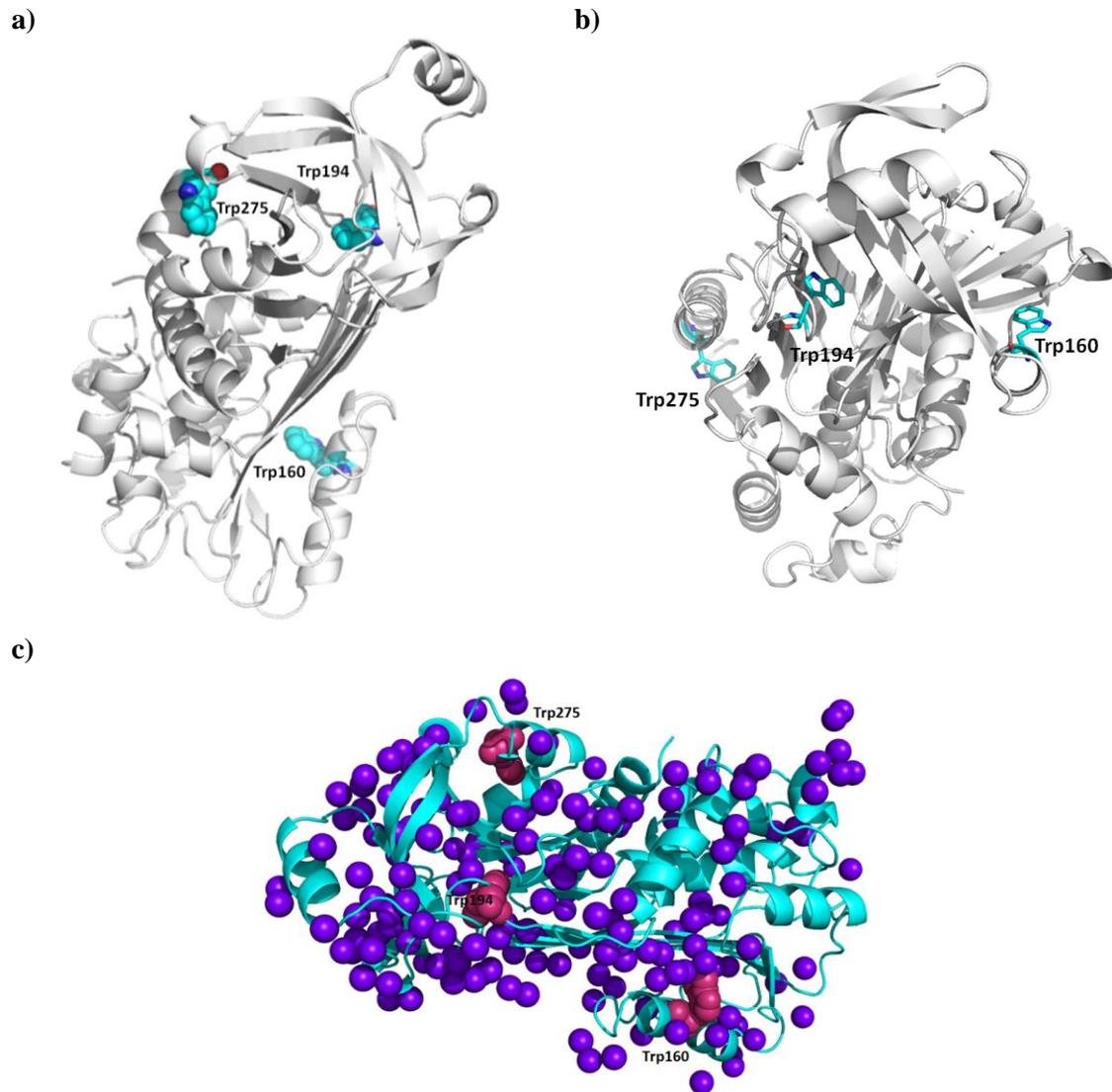
$$\text{MRE} = \frac{\text{CD(mdeg)}}{C_p \cdot n \cdot l \cdot 10} = \text{grau.} \frac{\text{cm}^2}{\text{dmol}^{-1}} \quad \text{Equação (11)}$$

em que,  $C_p$  é a concentração molar da proteína,  $n$  é o número de resíduos de aminoácidos na proteína,  $l$  é o comprimento do caminho da célula (DORRAJI; AZAR; RASOULIFARD, 2014; SHI, et al., 2014). Com o emprego de programas computacionais a partir do conjunto de experimentos da proteína na presença de concentrações variadas do ligante e na ausência do mesmo é possível inferir sobre o percentual de contribuição de outras estruturas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e *random coil*) que compõe a proteína e as respectivas alterações (TIAN, et al., 2015; TAI, et al., 2014).

#### 1.4 Ovalbumina: características gerais

A ovalbumina (OVAL) é classificada como uma fosfoglicoproteína por possuir carboidrato e grupos fosfato ligados à sua cadeia polipeptídica. Pode ser encontrada sob três formas: A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> e A<sub>3</sub>, a qual apresenta a distribuição percentual média de 85:12:3, respectivamente. A diferença entre essas formas está no teor de fósforo das suas moléculas. A ovalbumina A<sub>1</sub> tem dois grupos fosfato por molécula, e estão localizados nos resíduos Ser<sup>69</sup> e Ser<sup>345</sup>, A<sub>2</sub> possui um grupo fosfato e localiza-se no resíduo Ser<sup>68</sup>, e A<sub>3</sub> não possui grupo fosfato. Esta proteína possui massa molar de 45 KDa, 386 resíduos de aminoácidos sendo 50% hidrofóbicos, possui 6 resíduos de cisteína, 1 ponte dissulfeto localizada entre os resíduos Cys<sup>74</sup> e Cys<sup>121</sup> e 4 grupos sulfidrilas livres (SGARBIERI, 1996; HUNTINGTON; STEIN, 2001). A ovalbumina possui três resíduos de triptofano, os resíduos Trp<sup>160</sup> e Trp<sup>275</sup> estão localizados em região de  $\alpha$ -hélice e o resíduo Trp<sup>194</sup> que está localizado próximo ao terminal carboxílico (C-terminal) (KAMILYA; PAL; TALAPATRA, 2007). A estrutura tridimensional da ovalbumina está representada na Figura 6.

**Figura 6.** Estrutura cristalina da ovalbumina gerada empregando o programa Pymol (Delano Scientific LLC, CA) a partir do Protein Data Bank (PDB: 1OVA) evidenciando os resíduos de triptofano (Trp<sup>160</sup>, Trp<sup>194</sup> e Trp<sup>275</sup>). **a)** Vista lateral, **b)** Vista do topo e **c)** Na presença das moléculas de água.



Fonte: Protein Data Bank (PDB) em <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do>

Dentre os aminoácidos que compõem a ovalbumina, a quantidade de resíduos, o percentual de contribuição de cada resíduo, bem como suas cargas em condições de pH do meio fisiológico (pH = 7,4) estão apresentados na Tabela 2.

Em condições do meio fisiológico (7,4) os aminoácidos arginina, histidina e lisina apresentam carga positiva (+), enquanto que, ácido aspártico e ácido glutâmico, carga negativa (-), e os demais aminoácidos não apresentam carga em relação ao grupo R, não envolvido na ligação peptídica. Triptofano, tirosina e fenilalanina são os aminoácidos responsáveis pela fluorescência intrínseca da ovalbumina.

**Tabela 2.** *Relação dos aminoácidos que compõem a ovalbumina.*

Aminoácido	Resíduos	% (m/m)	Função do grupo R	pKa do grupo R	Carga grupo R (pH fisiológico)
Alanina	34	8,81	-	-	0
Arginina	19	4,92	Guanidina	12,4	+
Ácido aspártico	31	8,03	Ácido carboxílico	3,9	-
Cisteína	6	1,55	Tiol	8,4	0
Ácido glutâmico	50	12,95	Ácido carboxílico	4,1	-
Glicina	18	4,66	-	-	0
Histidina	8	2,07	Imidazol	6,0	+
Isoleucina	24	6,22	-	-	0
Leucina	32	8,29	-	-	0
Lisina	20	5,18	Amino	10,5	+
Metionina	15	3,89	-	-	0
Fenilalanina	20	5,18	-	-	0
Prolina	16	4,15	-	-	0
Serina	36	9,33	-	-	0
Treonina	15	3,89	-	-	0
Triptofano	3	0,78	-	-	0
Tirosina	9	2,33	Fenol	10,5	0
Valina	30	7,77	-	-	0
N-terminal	Acetilglicina		-	-	0
C-terminal	Prolina	0,26	-	-	0

Fonte: adaptado de SGARBIERI, 1996.

#### 1.4.1 Ovalbumina: alimento

A ovalbumina constitui a proteína majoritária da clara do ovo, representando 54% (m/m) do conteúdo proteico total, estando presente outras proteínas como a ovotransferrina, a ovomucóide, lisozima, entre outras. As quantidades relativas e algumas propriedades físicas e químicas das principais proteínas da clara do ovo estão apresentadas na Tabela 3.

O ovo de galinha é um dos alimentos mais consumidos no mundo devido ao seu baixo custo, alto valor nutricional oferecendo aos seus consumidores um balanço quase completo de nutrientes essenciais com proteínas de alto valor biológico (apresentam os aminoácidos essenciais em proporções adequadas às necessidades do ser humano), vitaminas, minerais e ácidos graxos, além da sua facilidade de acesso e ampla distribuição em todas as faixas da sociedade. Possui uma importante relevância industrial devido as diversas propriedades funcionais, neste caso a ovalbumina tem capacidade de: gelificação, formação de espuma, emulsificação, modificação da textura, entre outras. Estas propriedades são úteis na preparação de alimentos como: pães, bolos, biscoitos, macarrão, maioneses, molhos para saladas, entre outros (ROJAS, et al., 2006; JIMÉNEZ-SAIZ, 2012).

**Tabela 3.** Características das principais proteínas da clara do ovo.

Proteína	% (m/m) (clara)	Massa molecular (kDa)	pI	Atividade biológica
Ovalbumina	54	45	4,6	Antibacteriana
Ovotransferrina	12	77,7	6,0	Transportadora de Fe(III)
Ovomucóide	11	28	4,1	Inibidor de tripsina
Ovomucina	3,5	220	4,7	Antimicrobiana
Lisozima	3,4	14,3	10,7	Antibacteriana
Ovoinibidor	1,5	47	5,0	Inibidor de tripsina e quimotripsina
Ovoglicoproteína	1,0	50	4,8	-
Ovoflavoproteína	0,8	32	4,0	Forma complexos com a riboflavina
Ovomacroglobulina	0,5	760	4,5	Inibidor de serina
Avidina	0,5	68,3	10	Forma complexos com a biotina

Fonte: adaptado de PHILIPPI, 2008; SGARBIERI, 1996.

O Brasil constitui o sétimo maior produtor mundial de ovos de galinha com cerca de 41 bilhões de unidades, atrás da China (483)<sup>2</sup>, Estados Unidos (92), México (48) e Japão (42), conforme dados da organização de alimentos e agricultura dos Estados Unidos (FAO).

Em função de sua distribuição natural no ambiente e ampla presença nos alimentos as pessoas (consumidores) podem absorver diferentes espécies (orgânicas ou inorgânicas) de forma indireta em função da interação destas com a ovalbumina. A grande distribuição desta proteína evidencia a importância de estudos de interação de espécies variadas com a ovalbumina.

### 1.5 Tetraciclina

As tetraciclina (TCs) constituem um grupo de antibióticos de actinomicetos (grupo de bactérias importantes na degradação da matéria orgânica) com amplo espectro de ação, abrangendo desde bactérias gram-negativas e gram-positivas, *rickettsia*, alguns vírus e certas amebas intestinais. Pertencem a este grupo: tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC), clortetraciclina (CTC), demeclociclina (DMC), doxociclina (DC), metaciclina (MTC) e minociclina (MINO). São empregadas tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária. Na medicina humana é aplicada para o tratamento de doenças como: brucelose, cólera e infecções causadas por *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Yersinia* e *rickettsia* (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Na medicina veterinária são empregadas na criação de animais produtores de alimentos como gado e aves, incluindo galinhas, para a prevenção e tratamento de doenças como infecções bacterianas, e também para promover o crescimento destes animais, devido ao seu amplo espectro de ação contra bactérias (gram-positivas e negativas) e seu baixo custo.

<sup>2</sup> Números entre parênteses estão relacionados a produção em bilhões de unidades de ovos por ano.

Dentre as tetraciclinas mais utilizados para a criação de animais destinados à alimentação humana estão a TC, OTC, CTC e DC (NEBOT, et al., 2014).

O uso abundante e indiscriminado das tetraciclinas em animais produtores de alimentos pode resultar na presença dos seus resíduos em alimentos como: leite, ovos e carne. A exposição humana a esses resíduos presentes nos alimentos pode causar efeitos adversos, desde reações alérgicas em indivíduos hipersensíveis e câncer. Além disso, a exposição aos resíduos de TCs pode provocar o desenvolvimento de microrganismos resistentes, que pode dificultar a ação terapêutica destes medicamentos naquelas pessoas que consumiram alimentos de animais tratados com estes medicamentos (SHALABY, et al., 2011).

No Brasil não há uma regulamentação que estabeleça o limite máximo de resíduos (LMR) para medicamentos veterinários em alimentos, sendo adotado os limites recomendados pelo Mercosul, Codex Alimentarius, União Europeia e Estados Unidos. Os dois programas nacionais que monitoram a presença de resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal são o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), coordenado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) na qual são analisados carne, leite, ovos, mel e pescado. E o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos (PAMVet), da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na qual são analisados leite UHT, leite em pó e leite pasteurizado (SILVA; SOUZA; CALDAS, 2014).

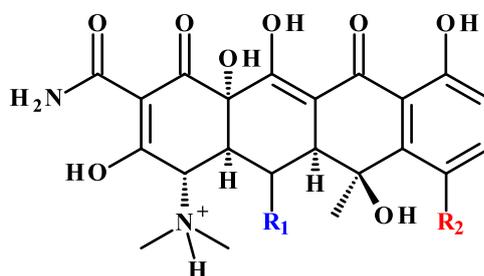
O LMR para a presença de resíduos de TCs em ovos estabelecido pela Comissão do Codex Alimentarius é de  $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$  (ou  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) de acordo com o Joint FAO / WHO Expert Committee on Food Additives em 2013. O valor fixado pela União Europeia é de  $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$  (ou  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) de acordo com a Commission Regulation (EU) nº 37/2010. Para este estudo foram selecionadas como moléculas modelos avaliar a interação com a ovalbumina a tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC) e clorotetraciclina (CTC), uma vez que são as TCs mais utilizadas na criação de aves (BOGIALLI, et al., 2006). As estruturas químicas das TCs selecionadas estão apresentadas na Figura 7.

Diversos estudos têm sido desenvolvidos e reportados na literatura para a determinação de resíduos tetraciclinas em diversos alimentos derivados da galinha como ovos, carne, fígado, entre outros. Liu e colaboradores (2013) determinaram resíduos de clorotetraciclina e minociclina em ovos de galinha, peixe e camarão utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os valores encontrados para os resíduos de clorotetraciclina e minociclina em ovos foi 0,05 a  $0,22 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente. Não foi detectado resíduos de tetraciclinas nas amostras de camarão e de peixe. O valor de CTC estava acima do limite

máximo de resíduo estabelecido pela união europeia ( $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Alfredsson e colaboradores (2005) analisaram resíduos de tetraciclina, oxitetraciclina e clorotetraciclina em ovos utilizando cromatografia líquida acoplada a massas (LC-MS/MS). Realizaram ensaios de recuperação utilizando  $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$  para cada tetraciclina e obtiveram recuperação máxima de 71,4% para a tetraciclina, 67,5% para a oxitetraciclina e 60,4% para a clorotetraciclina. Miranda e colaboradores (2009) realizaram a determinação de resíduos de tetraciclina e oxitetraciclina em carne de galinha de granja utilizando a técnica de eletroforese capilar. Para a TC os resíduos variaram de  $0,20$  a  $2,56 \mu\text{g g}^{-1}$ , e para os resíduos de OTC os valores variaram de  $0,08$  a  $2,05 \mu\text{g g}^{-1}$ , na qual estavam acima do limite máximo de resíduo estabelecido pela união europeia ( $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ ).

As tetraciclinas apresentam diferentes funções químicas em sua estrutura, e a depender do pH do meio estas podem está na forma protonada ou desprotonada. Logo, a carga global da molécula será diferente em função do pH e desta forma, a interação com macromoléculas como proteínas pode apresentar diferenças em função da concentração hidrogeniônica do meio.

**Figura 7.** Estrutura química das tetraciclinas (totalmente associadas) avaliadas neste estudo.



Composto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Tetraciclina (TC)	H	H
Oxitetraciclina (OTC)	OH	H
Clorotetraciclina (CTC)	H	Cl

Fonte: RIVERA-UTRILLA, 2013.

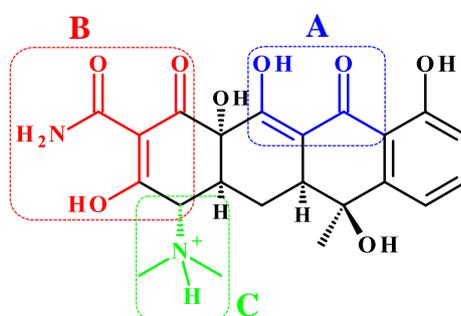
A Tabela 4 apresenta os valores de  $pK_a$  relativos aos três primeiros prótons para as moléculas avaliadas baseado em alguns trabalhos da literatura. Em alguns trabalhos são indicados os valores de  $pK_{a4}$  em relação ao grupo fenólico ( $\sim 12$ ), contudo nas condições do estudo ou fisiológicas este grupo sempre estará associado, desta forma, não foi considerado na Tabela 4. De acordo com estes dados abaixo percebe-se uma pequena variação entre os valores, indicando concordância quanto ao valor do  $pK_a$  para as três primeiras ionizações independente da molécula avaliada.

**Tabela 4.** Constantes de acidez das moléculas de tetraciclina avaliadas.

Composto	pK <sub>n</sub>			Técnica	Meio	Referência
	n = 1	n = 2	n = 3			
TC	3,30	7,68	9,69	Potenciometria	Aquoso	Leeson; Krueger; Nash (1963)
OTC	3,27	7,32	9,11			
CTC	3,30	7,44	9,27			
TC	3,42	7,50	9,18	Uv-Vis	Aquoso	Martin, (1979)
OTC	3,26	7,35	8,89			
CTC	3,26	7,35	8,77			
TC	3,32	7,78	9,58	Potenciometria	Aquoso	Qiang; Adams (2004)
OTC	3,22	7,46	8,94			
CTC	3,33	7,55	9,33			
TC	3,30	7,60	9,30	-	-	Zhou e colaboradores (2014)
OTC	3,30	7,30	9,10			
CTC	3,30	7,80	9,60			

Fonte: elaborado pela autora, 2015.

Com base nos três diferentes valores de pK<sub>a</sub> associados a molécula de TC (como modelo) é possível que em solução existam até quatro espécies diferentes em função do pH do meio, com distintos graus de protonação, sendo: H<sub>3</sub>T<sup>+</sup>, H<sub>2</sub>T, HT<sup>-</sup> e T<sup>2-</sup>. A distribuição destas espécies em função do pH está representada na Figura 8.

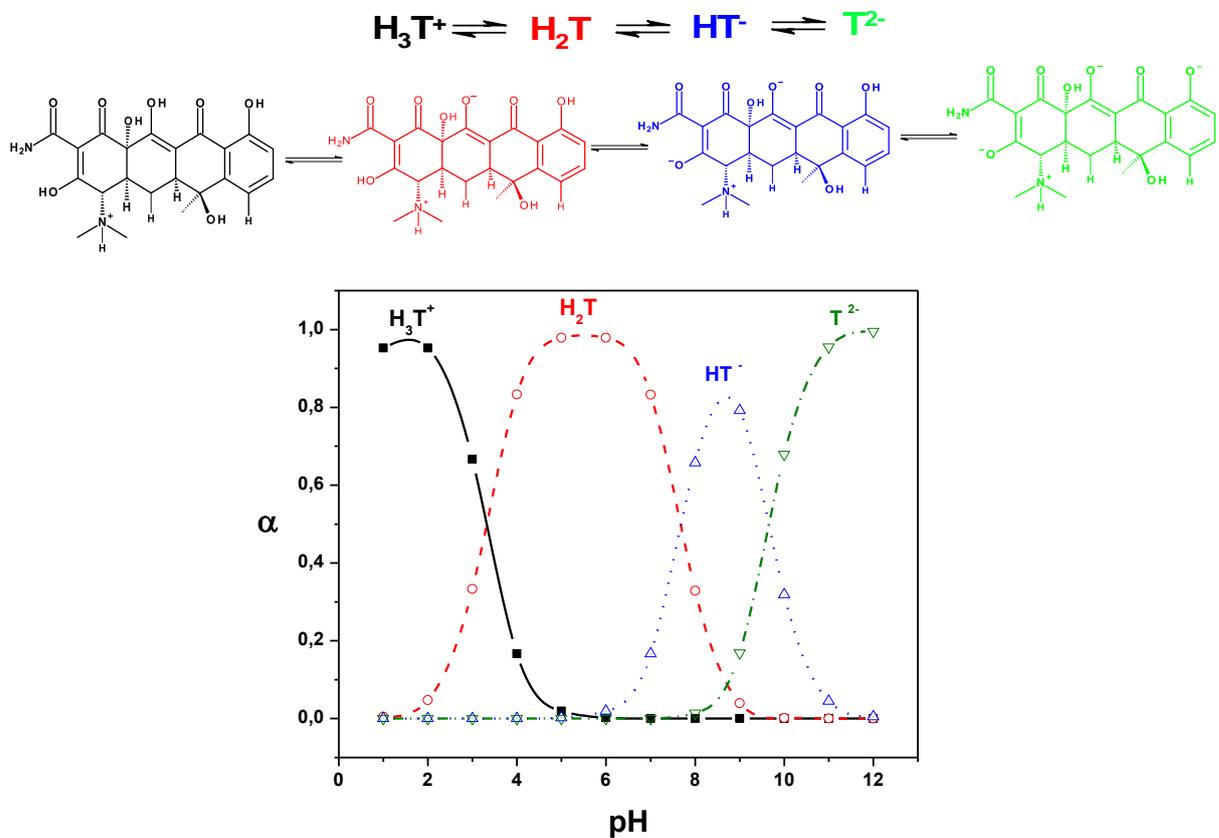
**Tabela 5.** Associação dos valores de pK<sub>a</sub> da tetraciclina (TC, como modelo) em função dos seus grupos.

Grupo			Referência
A	B	C	
pK <sub>a1</sub>	pK <sub>a2</sub>	pK <sub>a3</sub>	Sithole e Guy (1987)
pK <sub>a1</sub>	pK <sub>a2</sub>	pK <sub>a3</sub>	Couto, Montenegro e Reis (1999)
pK <sub>a1</sub>	pK <sub>a2</sub>	pK <sub>a3</sub>	Sanli, Sanli e Alsancak, (2009)
pK <sub>a1</sub>	pK <sub>a2</sub>	pK <sub>a3</sub>	Parolo e col. (2013)
pK <sub>a1</sub>	pK <sub>a2</sub>	pK <sub>a3</sub>	Li e col. (2010)
pK <sub>a1</sub>	pK <sub>a2</sub>	pK <sub>a3</sub>	Wang e col. (2015)
pK <sub>a1</sub>	pK <sub>a3</sub>	pK <sub>a2</sub>	Bhatt e Jee (1985)
pK <sub>a1</sub>	pK <sub>a3</sub>	pK <sub>a2</sub>	Leeson, Krueger e Nash (1963)
pK <sub>a1</sub>	pK <sub>a3</sub>	pK <sub>a2</sub>	Jin e col. (2007)
pK <sub>a1</sub>	pK <sub>a3</sub>	pK <sub>a2</sub>	Stephens e col. (1956)
pK <sub>a2</sub>	pK <sub>a1</sub>	pK <sub>a3</sub>	Havainas e Sandow (2006)

Fonte: elaborado pela autora, 2015.

Cada uma destas espécies tem um comportamento e uma carga diferente em solução. Desta forma, é importante em estudos de interação entre macromolécula e ligante saber qual o comportamento ácido-base da molécula derivado de um ácido e sua respectiva carga em um determinado valor de pH. Assim, a forma totalmente associada da TC ( $H_3T^+$ ) será predominante em valores de pH < 3, com carga positiva e atuando como ácido de Bronsted-Lowry. A forma neutra ( $H_2T$ ) será predominante entre o pH 3,5 e 6,5; enquanto a forma aniônica ( $HT^-$ ) será predominante na faixa de pH 8–9, sendo ambas,  $H_2T$  e  $HT^-$ , espécies anfipróticas, comportando-se como ácido ou bases em solução.

**Figura 8.** Distribuição das espécies de tetraciclina (TC) em função do pH.



Fonte: elaborado pela autora, 2015.

Por fim, a espécie dianiônica ( $T^{2-}$ ) será predominante acima de pH 10 e atuará como base de Bronsted-Lowry no meio. Esta mesma lógica pode ser estendida para a OTC e CTC em função do pH do meio, com pequenas variações em função das diferenças de  $pK_a$ . Logo, a interação das tetraciclina com diversas (macro) moléculas depende do seu estado de protonação (KULSHRESTHA; GIESE; AGA, 2004).

## **1.6 Justificativa do estudo proposto**

As tetraciclina constituem uma classe de antibióticos amplamente utilizadas como medicamento veterinário para animais produtores de alimentos, como galinhas de granja, devido a seu amplo espectro de ação e seu baixo custo. Desta forma, seu uso indiscriminado pode resultar na presença de resíduos deste medicamento nos alimentos derivados da galinha como ovos e carne, e ser potencialmente tóxico para o ser humano, e em função da ampla distribuição e utilização da ovalbumina na preparação de alimentos, torna-se necessário o estudo da interação entre a ovalbumina e as tetraciclina, visto que na literatura há uma escassez de estudos de interação com proteínas alimentares e medicamentos de uso veterinário, como as tetraciclina.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliação da interação entre ovalbumina com medicamentos de uso veterinário e humano da classe das tetraciclinas (tetraciclina, oxitetraciclina e clorotetraciclina), visando investigar os principais aspectos que regem este processo de interação intermolecular *in vitro* em diferentes condições.

### 2.2 Específicos

- a) Avaliar e otimizar as condições experimentais para estudo por espectrofluorimetria e espectrometria no UV-Vis
- b) Avaliação da interação das tetraciclinas com a ovalbumina simulando as condições do estômago (pH = 1,5), do ponto isoeletrônico da proteína (pH = 4,6) e do alimento (ovo) *in natura* (pH = 7,4) em diferentes temperaturas;
- c) Empregar técnicas de fluorescência molecular para avaliar alterações estruturais da proteína e obter parâmetros como: mecanismo de *quenching*, constantes de ligação, estequiometria proteína-ligante, dados termodinâmicos e distâncias intermoleculares;
- d) Explorar a técnica UV-Vis visando avaliar o processo de interação intermolecular (proteína-ligante);
- e) Aplicar técnicas de RMN de  $^1\text{H}$  para avaliar o deslocamento químico e T1 para a molécula de tetraciclina frente a ovalbumina;
- f) Avaliar o efeito da interação entre proteína-ligante através do perfil de migração eletroforética (native-PAGE e SDS-PAGE).

### 3 EXPERIMENTAL

#### 3.1 Reagentes e preparo das soluções

Os reagentes utilizados nos ensaios foram de grau analítico de pureza. As soluções foram preparadas com água ultrapura com resistividade específica de 18,2 M $\Omega$  cm, a partir de um sistema de purificação Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore, Bedford, MA, USA).

Tetraciclina (TC, Sigma), oxitetraciclina (OTC, Sigma) e clorotetraciclina (CTC, Sigma) foram empregadas para os estudos de interação com a ovalbumina. Para o preparo da solução estoque pesou-se 10 mg de cada tetraciclina, e solubilizou-se em 20 mL de água ultrapura. A concentração final destas soluções foi 1,13 mM para TC, 1,09 mM para OTC e 1,04 mM para CTC. Em seguida, as soluções estoque resultantes foram armazenadas em frascos âmbar e armazenadas sob refrigeração a 4°C.

A proteína ovalbumina (*albumin from chicken egg white*, Sigma) foi empregada para os estudos de interação com as tetraciclinas. Para o preparo da solução estoque da ovalbumina pesou-se 20 mg da proteína e solubilizou-se em 10 mL de solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH ajustado para 1,50), seguido da adição de solução de NaCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> para ajuste da força iônica. De forma, semelhante foram preparadas soluções estoque em solução tampão ácido acético/acetato 50 mM (pH = 4,60) e solução tampão Tris 50 mM (pH = 7,40). Ambas contendo NaCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> para ajuste da força iônica. Estas soluções foram empregadas para garantir a condição de pH dos diferentes meios avaliados.

A solução de NaCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> empregada para ajuste da força iônica foi preparada a partir da dissolução de 2,9223 g de cloreto de sódio (Vetec) em água ultrapura. Em seguida, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL completando-se o volume com água ultrapura.

Para o preparo da solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH = 1,50) adicionou-se uma alíquota de 2,08 mL de HCl 12,40 mol L<sup>-1</sup> (Merck), e solubilizou-se em água ultrapura. Em seguida, retirou-se uma alíquota de 25 mL da solução de NaCl (1,0 mol L<sup>-1</sup>), e adicionou-se à solução de HCl. O ajuste do pH para 1,50 foi realizado com solução de NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup>. Por fim, transferiu-se a mistura para um balão volumétrico de 250 mL, completando-se o volume com água ultrapura.

Para o preparo da solução tampão ácido acético/acetato (50 mM, pH = 4,60) adicionou-se uma alíquota de ácido acético 17,40 mol L<sup>-1</sup> (Vetec) e solubilizou-se em água ultrapura. Em seguida, adicionou-se uma alíquota de 25 mL da solução de NaCl (1,0 mol L<sup>-1</sup>) à solução tampão. O ajuste do pH para 4,60 foi realizado com a solução de NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup>. Finalmente,

transferiu-se a mistura para um balão volumétrico de 250 mL, completando-se o volume com água ultrapura.

Para o preparo da solução tampão Tris (50 mM, pH = 7,40) pesou-se 1,5120 g de Tris.HCl (Vetec) e solubilizou-se em água ultrapura. Em seguida, retirou-se uma alíquota de 5,0 mL da solução de NaCl (1,0 mol L<sup>-1</sup>) e adicionou-se à solução tampão. O ajuste do pH para 7,40 foi realizado com a solução de HCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>. Em seguida, transferiu-se a mistura para um balão volumétrico de 250 mL, completando-se o volume com água ultrapura.

Os reagentes cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>, Merck), acetato de magnésio (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg.4H<sub>2</sub>O, Merck), acetato de zinco (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Zn.H<sub>2</sub>O, Merck), acetato de cobre (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Cu.H<sub>2</sub>O, Vetec) e cloreto de ferro(III) (FeCl<sub>3</sub>, Vetec) foram empregados para os estudos de competição. Para o preparo das soluções, as respectivas massas dos sais, a saber: 0,0225 g de CaCl<sub>2</sub>; 0,0432 g de (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg.4H<sub>2</sub>O; 0,0441 g de (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Zn.H<sub>2</sub>O; 0,0407 g de (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Cu.H<sub>2</sub>O, foram solubilizadas em 20 mL de água ultrapura. Para o preparo da solução estoque do íon Fe(III) pesou-se 0,0328 g de FeCl<sub>3</sub> e solubilizou-se em 20 mL de solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. A concentração final destas soluções foi de 10 mM para todos os íons metálicos.

Para o preparo da solução de ovalbumina *in natura* empregou-se ovo branco, tipo grande, comercial (Carnaúba). A solução estoque da proteína *in natura* foi preparada da seguinte maneira: separou-se a clara da gema do ovo, reservou-se a clara em um béquer de vidro, e com o auxílio de um bastão de vidro homogenizou-se a clara, em seguida, pesou-se 0,7292 g e solubilizou-se em 10 mL da solução tampão Tris 50 mM, (pH 7,40) com NaCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> para ajuste da força iônica.

Para os ensaios de RMN <sup>1</sup>H empregou-se tampão fosfato 10 mM (pH=7,4). Para o preparo desta solução pesou-se 2,67 mg de fosfato de sódio monobásico monohidratado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, Vetec); 4,30 mg de fosfato de sódio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Dinâmica); 1,0 mg de cloreto de sódio (NaCl, Vetec) para ajuste da força iônica e 2,2 mg de trimetilsililpropionato de sódio (TMSPP, Sigma) utilizado como referência interna, e solubilizou-se em 5,0 mL de água deuterada 99,9% (D<sub>2</sub>O, Sigma). Para o preparo da solução estoque das tetraciclinas pesou-se 1,0 mg de cada tetraciclina e solubilizou-se em 1,0 mL de tampão fosfato 10 mM (pH=7,4) preparado em 99,9% de D<sub>2</sub>O. Para o preparo da solução da ovalbumina pesou-se 1,4 mg da proteína e solubilizou-se em 700 µL da solução de tetraciclina preparada em tampão fosfato 10 mM (pH = 7,4).

Para os ensaios de eletroforese empregou-se soluções da ovalbumina comercial e *in natura*. Para o preparo da solução estoque da ovalbumina comercial pesou-se 20 mg da proteína

e 183 mg da clara do ovo *in natura* solubilizando-se em 5,0 mL de solução tampão Tris 50 mM (pH 7,4) com NaCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> para ajuste da força iônica, em ambos os casos. Para o preparo da solução estoque das tetraciclinas utilizadas neste ensaio pesou-se 10 mg de cada tetraciclina, e solubilizou-se em 1,0 mL de água ultra pura. A concentração final destas soluções foi 22,5 mM (TC), 20,9 mM (OTC) e 21,7 mM (CTC).

### 3.2 Equipamentos utilizados

As medidas espectrofluorimétricas foram realizadas em um espectrofluorímetro Shimadzu RF (modelo 5301PC, Japão) com cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico ou espectrofluorímetro leitor de microplacas (EnSpire<sup>®</sup>, Perkin Elmer, Alemanha) equipado com lâmpada de xenônio, empregando microplacas de 96 poços. Os ensaios de competição foram realizados em um leitor de microplacas (Flexstation<sup>®</sup> 3, Molecular Devices, Estado Unidos) equipado com lâmpada de xenônio, empregando microplaca de 96 poços. As medidas espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro de varredura com feixe duplo Micronal (modelo AJX-6100PC, Brasil) equipado com cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico.

Para as medidas de pH utilizou-se um eletrodo combinado de vidro associado ao potenciômetro Gehaka (modelo PG 1800, Brasil). As massas dos reagentes foram medidas em balança analítica eletrônica Gehaka (AG 200, Brasil) com precisão de 0,1 mg. Nos experimentos de eletroforese as amostras foram previamente centrifugadas em centrífuga digital Micro Spin (modelo MS-43, Taiwan) com capacidade para 18 microtubos de (1,5-2,0 ml), e rotação programável de até 14.000 rpm. Para a corrida eletroforética utilizou-se sistema Mini-protean<sup>®</sup> (Tetra cell, Bio Rad). O gel de poliacrilamida empregado após revelação nos estudos de eletroforese foi escaneado utilizando a impressora multifuncional LaserJet Pro (modelo M1132, HP). Para os estudos por ressonância magnética nuclear de hidrogênio empregou-se o espectrômetro de RMN Bruker 400 ( $B_0=9,4$  T), operando a 400,35 MHz para <sup>1</sup>H e equipado com sondas de 5,0 mm para detecção indireta, instalado no Laboratório de pesquisa em Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (IQB).

### 3.3 Procedimentos

#### 3.3.1 Determinação da concentração da ovalbumina

A concentração da solução estoque de ovalbumina preparada a partir da proteína comercial ou *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), após diluição da solução na proporção de 1:5.

### 3.3.2 Estudo da abertura das fendas (*slit*) de excitação e emissão

Neste estudo avaliou-se a influência das larguras das fendas de excitação e emissão sobre a emissão de fluorescência da ovalbumina para obtenção dos espectros. Visto que, as larguras das fendas de excitação e emissão são variáveis que interferem diretamente na intensidade do sinal do fluoróforo. O sinal de fluorescência é proporcional ao quadrado das larguras das fendas de excitação e de emissão, e o uso de fendas estreitas resultam uma maior resolução e menor ruído espectral, enquanto que o uso de fendas largas produz o efeito oposto (LAKOWICZ, 2006).

Neste estudo foram realizadas curvas analíticas da ovalbumina empregando fluorescência molecular ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{em}} = 337 \text{ nm}$ ) e variou-se os valores da abertura das fendas (*slits*) para os comprimentos de onda de excitação e emissão de 1,5 a 5,0 nm. A velocidade de varredura de todos os experimentos foi fixada em  $400 \text{ nm min}^{-1}$ . Através deste estudo a largura da fenda de excitação e emissão de 3,0 e 5,0 nm foi escolhida como sendo a melhor condição para os estudos posteriores.

### 3.3.3 Estudo cinético e efeito do pH

A avaliação cinética quanto ao tempo de interação foi investigada no intervalo de 0 a 60 min, fixando-se a concentração da proteína em  $0,5 \mu\text{M}$  e da tetraciclina igual a  $10 \mu\text{M}$  (excesso de vinte vezes). Este estudo foi realizado nos valores de pH (1,5; 4,6 e 7,4), e empregou-se a técnica de fluorescência molecular visando garantir sensibilidade e menor interferência espectral. As medidas espectrofluorimétricas foram realizadas nas seguintes condições:  $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ , abertura da fenda de excitação de 3,0 nm e emissão de 5,0 nm.

### 3.3.4 Fluorescência 3D

Neste estudo avaliou-se o efeito da adição das tetraciclinas frente a proteína do ovo comercial e a proteína do ovo *in natura*. As concentrações da proteína em ambas soluções foram fixadas em  $0,5 \mu\text{M}$  e para as tetraciclinas em  $20 \mu\text{M}$  (excesso de 40 vezes). Este estudo foi realizado em pH 7,4. As medidas espectrofluorimétricas foram realizadas nas seguintes condições:  $\lambda_{\text{exc}} = 220 \text{ à } 320 \text{ nm}$  (variando de 5 em 5 nm),  $\lambda_{\text{em}} = 250 \text{ a } 450 \text{ nm}$ , abertura da fenda de excitação de 3 nm e emissão de 5 nm. Após a aquisição dos dados, estes foram tratados empregando Origin 8.1 e a partir dos resultados, plotaram-se gráficos em 3D.

### 3.3.5 Interação proteína-ligante: titulações empregando fluorescência e UV-Vis

Nos estudos por fluorescência a concentração da ovalbumina foi 0,5  $\mu\text{M}$ , e nos estudos por UV-Vis a concentração da ovalbumina utilizada foi de 0,35  $\mu\text{M}$ . A titulação foi realizada adicionando-se quantidades crescentes das tetraciclinas. O intervalo de concentração máximo utilizado para as tetraciclinas foi de 1,25 a 80  $\mu\text{M}$  (550 a 35600  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) para as medidas por fluorescência, enquanto que se utilizou de 0,35 a 17,5  $\mu\text{M}$  (150 a 7780  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) por UV-Vis.

### 3.3.6 Estudo de competição

A avaliação da competição pelo sítio de ligação da proteína foi realizada em fluorímetro com leitor de microplaca (96 poços) em pH 7,4, sendo o volume final de 200  $\mu\text{L}$ . Os íons competidores utilizados foram: Ca(II), Mg(II), Zn(II), Cu(II) e Fe(III), visto que estes íons encontram-se naturalmente presentes no ovo. A concentração da proteína e dos íons foi fixada na proporção de 1:1, a concentração utilizada da proteína neste estudo foi de 2,0  $\mu\text{M}$ . Este estudo foi realizado na ausência e na presença de concentrações crescentes das tetraciclinas (5 a 80  $\mu\text{M}$ ). Após a aquisição dos dados, estes foram tratados empregando Origin 8.1 e a partir dos resultados, calcularam-se as constantes na ausência e na presença dos íons metálicos.

### 3.3.7 Fluorescência sincronizada

Neste estudo, foram realizadas medidas de fluorescência molecular, na presença e na ausência das tetraciclinas, mantendo-se constante a concentração da ovalbumina (0,25  $\mu\text{M}$ ) e variando a concentração das tetraciclinas (0,625 a 80  $\mu\text{M}$ ). As condições utilizadas nas medidas espectrofluorimétricas para monitorar os resíduos de tirosina foram:  $\lambda_{\text{exc}} = 265 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{em}} = 280$  a 450 nm (estabelecendo um  $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ ), abertura da fenda de excitação e emissão igual a 5 nm. As condições utilizadas nas medidas espectrofluorimétricas para monitorar os resíduos de triptofano foram:  $\lambda_{\text{exc}} = 220 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{em}} = 280$  a 450 nm (estabelecendo um  $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ ), abertura da fenda de excitação de 5 nm e emissão em 3 nm.

### 3.3.8 Transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET)

Neste estudo, foram realizadas medidas de fluorescência molecular e de absorção molecular, mantendo-se a proporção da concentração da ovalbumina e das tetraciclinas em 1:1. A concentração utilizada para ambos foi de 1,0  $\mu\text{M}$  nos valores de pH (1,5; 4,6 e 7,4). Para as tetraciclinas realizaram-se medidas de absorção molecular no UV-Vis e para a proteína realizou-se medidas de fluorescência molecular (na presença e ausência das tetraciclinas).

### 3.3.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Empregou-se a técnica de eletroforese para avaliar o efeito da migração eletroforética da proteína do ovo comercial e *in natura* na ausência e na presença das tetraciclinas. O gel de empilhamento e de separação foi preparado com acrilamida a 6 e 10% (m/m), respectivamente.

O gel desnaturante ou redutor (SDS-PAGE) foi preparada de acordo com o seguinte procedimento: as amostras de proteína foram adicionadas ao agente redutor 2-mercaptoetanol a 5,0% (v/v), seguido da adição de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 2,0% (m/v), e da solução de azul de bromofenol a 0,001% (m/v), em seguida foram fervidas por 5 min em um béquer com água quente a 100 °C, centrifugadas rapidamente a 10.000 rpm utilizando centrífuga digital Micro Spin (modelo MS-43) e aplicadas no gel. O gel sem o desnaturante (*native* PAGE) foi realizado na ausência de agentes redutores, sem aquecimento das amostras e sem adição de SDS. Neste estudo o pH de 7,4 para as amostras foi fixado, assim como ovalbumina a 18 µM e tetraciclinas a 9,0 mM. A corrida eletroforética foi realizada sob voltagem constante de 85 V, utilizando-se o sistema Mini-protean<sup>®</sup>. Após a corrida os géis foram corados com solução de azul de coomassie a 0,2% (m/v). Posteriormente os géis foram descorados com solução de metanol a 50% (v/v) e ácido acético a 10% (v/v), logo após os géis foram escaneados utilizando a impressora multifuncional LaserJet Pro (modelo M1132, HP).

### 3.3.10 Interação proteína-ligante por RMN <sup>1</sup>H

Neste estudo inicialmente avaliou-se a interação entre as tetraciclinas e a ovalbumina através do espectro RMN de <sup>1</sup>H observando a variação dos deslocamentos químicos ( $\delta$ ) das tetraciclinas na ausência e na presença da ovalbumina. Para tanto, utilizou-se 1,4 mg da proteína e 10 mM para as tetraciclinas em 500 µL de tampão fosfato 10 mM (pH = 7,4) com adição de trimetilsililpropionato de sódio (TMSP) a 2,5 mM (padrão interno), em 99,9% de água deuterada (D<sub>2</sub>O).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Otimização dos parâmetros químicos e instrumentais

As proteínas em geral apresentam em sua composição resíduos de aminoácidos que possuem cadeia lateral aromática, sendo fenilalanina, triptofano e tirosina, que apresentam absorção molecular na região de 280 nm do espectro eletromagnético. Além dos aminoácidos citados, as proteínas apresentam outros resíduos de aminoácidos, onde a depender do grupo presente contribuem com diferentes características, como: carga positiva ou negativa (a depender do pH), ser apolar, ter comportamento básico ou ácido, entre outras. Estes aminoácidos na estrutura proteica são unidos através da ligação peptídica, na qual apresenta absorção em ~220 nm. Desta forma, a técnica de espectroscopia de absorção molecular UV-Vis pode ser empregada para a determinação direta da concentração de diversas proteínas, desde que as mesmas estejam puras ou que outras espécies não absorvam na mesma região. A espectrofotometria é fundamentada na lei de Lambert-Beer, que é a base matemática para as medidas de absorção de radiação por amostras nas regiões ultravioleta e visível do espectro eletromagnético. Para medidas de absorção de radiação em determinado comprimento de onda ( $\lambda$ ), tem-se que:  $A_\lambda = \log(I_0/I) = \epsilon_\lambda bc$ , onde  $A_\lambda$  é a absorvância em um dado comprimento de onda,  $I_0$  é a intensidade da radiação monocromática que incide na amostra e  $I$  é a intensidade da radiação que emerge da amostra (SKOOG, et al., 2006). A absorvidade molar ( $\epsilon_\lambda$ ) é uma grandeza característica da espécie absorvente, e sua magnitude depende do comprimento de onda da radiação incidente. O termo  $c$  é a concentração da espécie absorvente e  $b$ , é o caminho óptico percorrido pelo feixe de radiação através da amostra. Através desta técnica a concentração de uma determinada proteína pode ser quantificada relacionando-se a sua absorvância em 280 nm com seu coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998; ROCHA; TEIXEIRA, 2004).

Neste estudo, foi realizada uma curva analítica visando estabelecer a faixa linear para a ovalbumina empregando-se a técnica de espectroscopia de absorção molecular (em 280 nm) no intervalo de 0,06 a 8,24  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (2,7 a 371  $\text{mg L}^{-1}$ ), em pH 7,4; sendo as soluções preparadas nas condições já descritas. A curva analítica para relação o intervalo de concentração foi  $A_{280\text{ nm}} = 0,297(\pm 0,001)C_{\text{OVAL}} - 0,001(\pm 0,001)$ ,  $r = 1,000$ . Valores de concentração superiores a 8,24  $\mu\text{mol L}^{-1}$  da proteína levaram a precipitação da mesma. Este estudo permitiu avaliar em qual faixa de concentração existiu uma relação linear entre concentração e sinal analítico (absorvância), visto que nos estudos futuros trabalhou-se dentro desta faixa de concentração.

Após avaliação da faixa de concentração da proteína por espectrofotometria, realizou-se procedimento similar para as medidas por fluorescência molecular, visando determinar a faixa linear de concentração. Desta forma, para iniciar os estudos por fluorescência molecular, um dos primeiros parâmetros a serem avaliados são as aberturas das fendas (*slits*) de excitação e de emissão, uma vez que o sinal de fluorescência é proporcional ao quadrado das larguras das fendas de excitação e de emissão (LAKOWICZ, 2006), como já mencionado anteriormente. Neste estudo avaliou-se os *slits* de 1,5 a 5,0 nm e a faixa linear avaliada foi de 0,062 a 1,55  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (2,80 a 70  $\text{mg L}^{-1}$ ). Os resultados deste estudo estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Estudo da abertura da fenda de emissão e excitação em função da faixa linear da ovalbumina.

Condição	Abertura de fenda, nm		Faixa linear, $\mu\text{M}$	$F = aC_{\text{oval}} + b$		
	Exc.	Em.		a	b	r
1	1,5	3,0	0,062 – 1,6 ( $n = 8$ )	290 ( $\pm 3$ )	7,8 ( $\pm 2,2$ )	0,9998
2	1,5	5,0	0,062 – 0,62 ( $n = 6$ )	1168 ( $\pm 18$ )	7,3 ( $\pm 5,5$ )	0,9997
3	3,0	3,0	0,062 – 1,6 ( $n = 8$ )	498 ( $\pm 9$ )	12,2 ( $\pm 6,7$ )	0,9995
4	3,0	5,0	0,062 – 0,31 ( $n = 5$ )	2084 ( $\pm 65$ )	4,8 ( $\pm 12,1$ )	0,9993
5	5,0	1,5	0,062 – 1,6 ( $n = 8$ )	319 ( $\pm 6$ )	7,1 ( $\pm 4,4$ )	0,9999
6	5,0	3,0	0,062 – 0,31 ( $n = 5$ )	2009 ( $\pm 56$ )	7,1 ( $\pm 10,5$ )	0,9994
7	5,0	5,0	0,062 – 0,12 ( $n = 4$ )	7189 ( $\pm 150$ )	52 ( $\pm 12$ )	0,9998

Fonte: elaborada pela autora, 2015.

A partir da análise dos resultados (Tabela 6), selecionou-se a condição 4 para os estudos posteriores, visto que esta condição apresentou elevado coeficiente angular e considerável faixa linear, garantindo boa sensibilidade analítica e menor erro instrumental nos estudos efetuados.

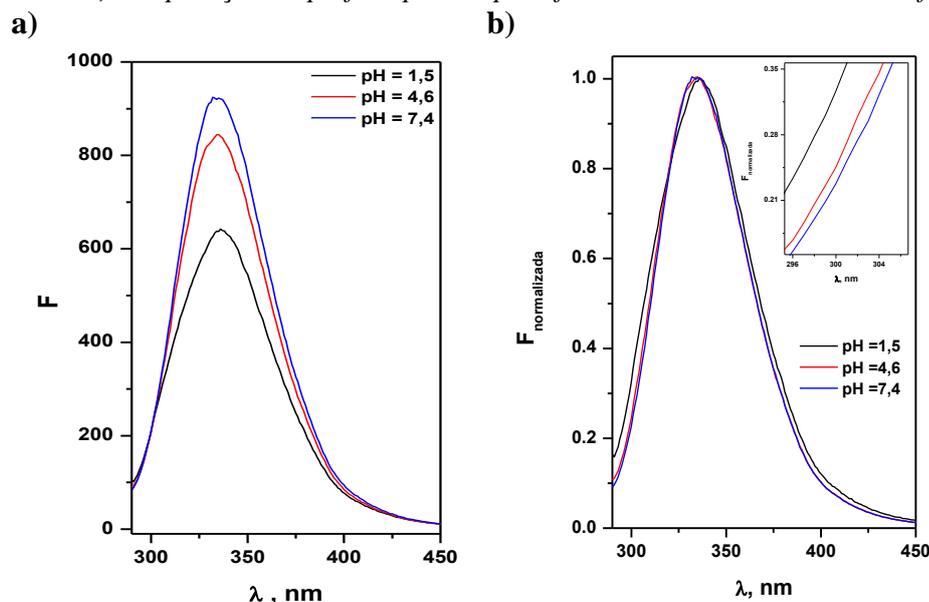
## 4.2 Avaliação de pH e temperatura

Após a otimização das fendas de emissão e de excitação o passo seguinte foi avaliar se a variação de pH e temperatura poderiam conduzir a alterações conformacionais na estrutura da proteína. As proteínas são macromoléculas formadas por aminoácidos, e estes têm a propriedade de atuar como moléculas (anfóteras) capazes de doar ou receber prótons, podendo atuar como ácido ou base a depender do pH do meio. Em geral, alterações no pH podem induzir a mudanças na estrutura das proteínas, tornando-as menos enoveladas, visto que esta alteração pode modificar as cargas dos resíduos laterais dos aminoácidos da proteína podendo torná-los mais expostos ou mais protegidos. O aquecimento provoca o desdobramento parcial da macromolécula expondo as regiões hidrofóbicas tornando a macromolécula menos protegida,

quando comparada com a condição original (BHATTACHARYA; MUKHOPADHYAY, 2012; WEIJERS, et al., 2002; KANG, et al., 2014).

Neste sentido diferentes condições de pH e temperatura do meio foram avaliadas para monitorar possíveis alterações na estrutura da ovalbumina. Neste estudo avaliaram-se diferentes condições de pH (1,5; 4,6 e 7,4). O primeiro valor de pH a ser avaliado foi 1,5 que simula as condições do estômago, e neste valor de pH a proteína encontra-se preferencialmente com carga positiva. Em seguida, avaliou-se o pH 4,6 que corresponde ao ponto isoeletrônico, e neste valor de pH ela encontra-se com carga neutra. Por fim, avaliou-se o pH 7,4 que simula as condições do alimento *in natura*, neste pH a proteína encontra-se com carga preferencialmente negativa (NELSON; COX, 2011). Em seguida avaliou-se o efeito da temperatura no desdobramento da estrutura da ovalbumina nos valores de pH mencionados. As temperaturas avaliadas foram 22, 30 e 38°C. Os resultados desses estudos são apresentados nas Figuras 9 e 10, respectivamente.

**Figura 9.** Efeito do pH no espectro da ovalbumina (0,5  $\mu$ M). **a)** Comparação da intensidade do sinal de fluorescência e **b)** comparação do perfil espectral para fluorescência normalizada em função do pH

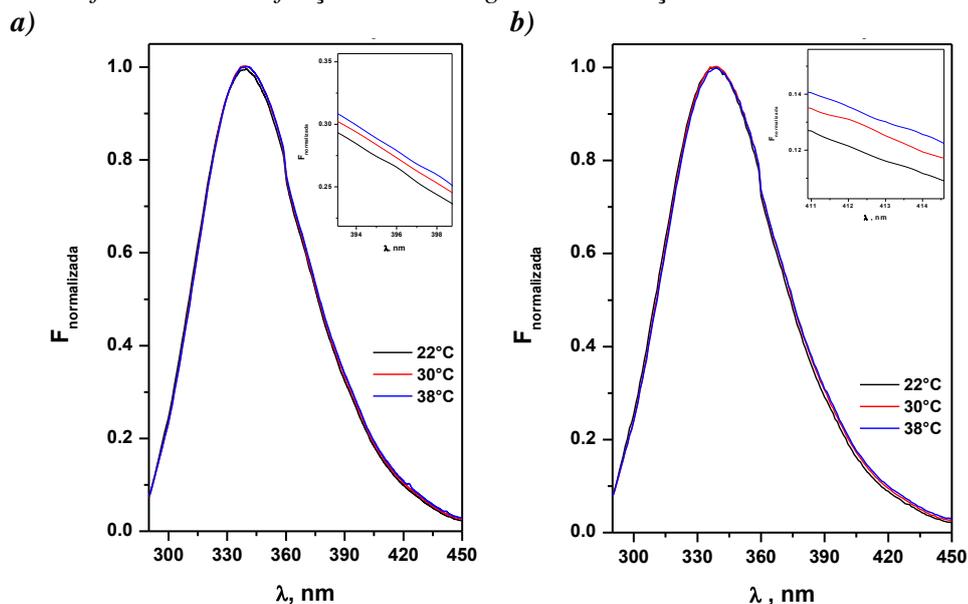


Fonte: elaborado pela autora, 2015.

A partir dos resultados obtidos na Figura 9a observou-se que de meio básico (pH = 7,4) para meio ácido (pH = 1,5) ocorreu um aumento da intensidade de fluorescência da ovalbumina em solução. No pH ótimo a proteína tem sua identidade estrutural e funcional preservada, no caso da ovalbumina o pH ótimo é próximo da neutralidade ( $pH_{\text{ótimo oval.}} = 7,0$ ). Desta forma, em pH=7,4 a estrutura da ovalbumina apresenta-se intacta e, portanto, a fluorescência é máxima. Com a variação de pHs para a faixa ácida, em especial, pH=1,5

ocorrerá perda de integridade estrutural da ovalbumina que pode ser observado através da diminuição da fluorescência. Essa última análise é corroborada por Bhattacharya e Mukhopadhyay (2011), que apontam que em meio ácido (pH ~ 2,0) a ovalbumina perde parte de sua estrutura terciária resultando em um desenovelamento parcial levando os resíduos de triptofano a sofrerem processo de *quenching* pelas moléculas de águas, ou a depender da concentração da proteína (em meio ácido) ocorrer a formação de agregados proteicos, levando a redução da fluorescência. Quando se compara o perfil espectral para fluorescência normalizada (Figura 9b), observa-se que com a redução do pH o espectral apresenta um alargamento, o qual é também constitui um indicativo de que a estrutura da proteína nesta condição está menos enovelada havendo uma exposição dos resíduos de aminoácidos ao meio (ALBANI, 2007). Assim, para cada valor de pH avaliado neste estudo a proteína provavelmente estava em uma condição conformacional diferente.

**Figura 10.** Efeito da temperatura nos espectros normalizados de fluorescência da ovalbumina (0,5  $\mu$ M) em função do pH da temperatura. a) pH = 4,6 e b) pH = 7,4. O espectro para pH = 1,5 em função da temperatura não foi incluído em função do menor grau de resolução.



Fonte: elaborado pela autora, 2015.

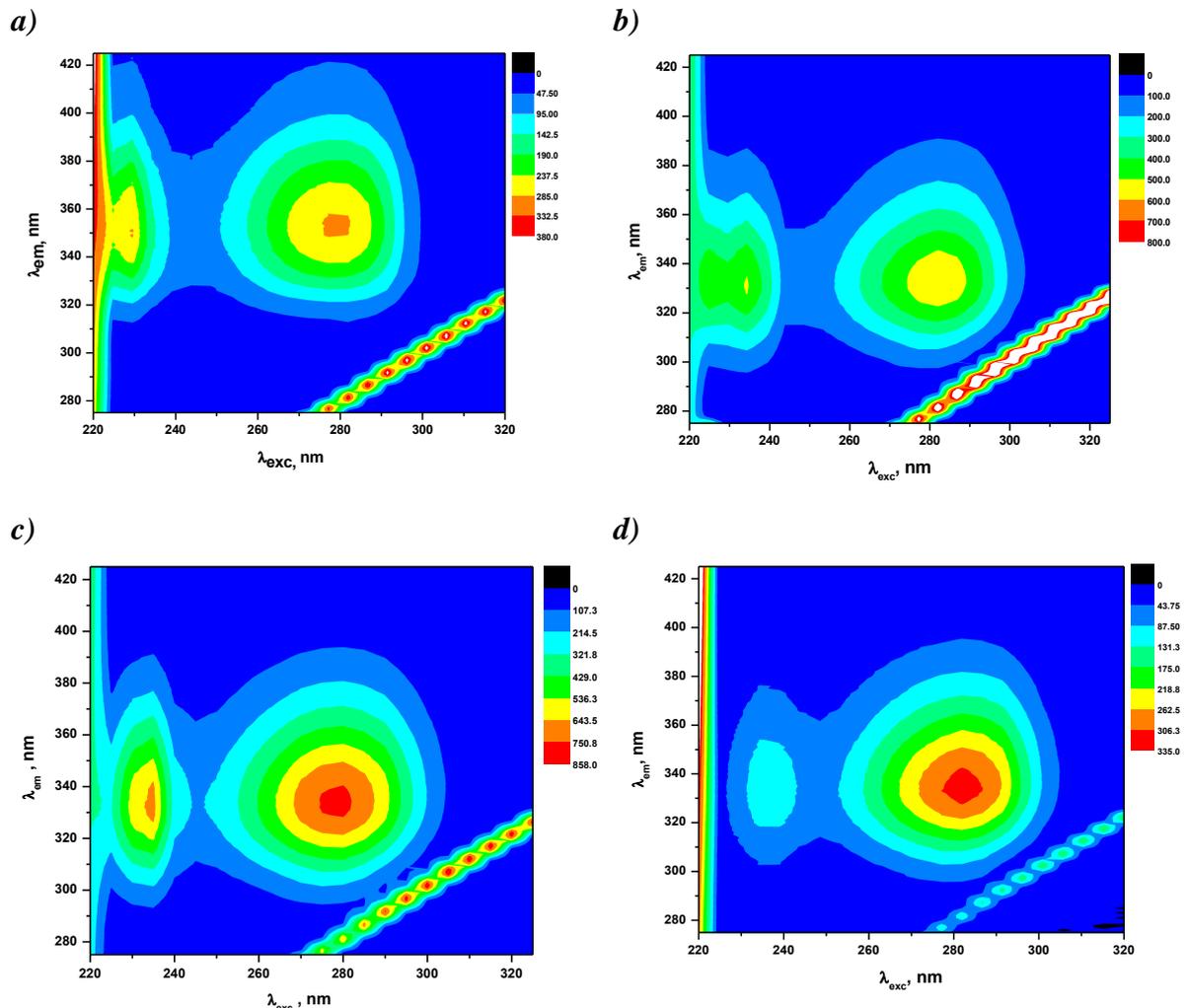
Ao analisar a Figura 10 observou-se que o aumento da temperatura independente do pH conduziu a uma tendência no alargamento dos espectros. Isto se deve ao desdobramento da estrutura terciária da proteína em temperaturas maiores, visto que nestas condições a estrutura da proteína nativa é alterada tornando-se menos enovelada, e por consequência expondo alguns resíduos de aminoácidos (CHANG, 2010).

Após demonstrar que o pH e a temperatura do meio alteram a estrutura nativa da ovalbumina o passo seguinte foi avaliar o ambiente dos resíduos de triptofano e tirosina na

proteína comercial *in natura*, devido a sensibilidade ao microambiente que este resíduo de aminoácido é vulnerável. A ovalbumina contém nove resíduos de tirosina (Tyr<sup>29</sup>, Tyr<sup>42</sup>, Tyr<sup>97</sup>, Tyr<sup>106</sup>, Tyr<sup>117</sup>, Tyr<sup>125</sup>, Tyr<sup>212</sup>, Tyr<sup>281</sup> e Tyr<sup>291</sup>) e três resíduos de triptofano (Trp<sup>160</sup>, Trp<sup>194</sup> e Trp<sup>275</sup>). Estes aminoácidos são sensíveis às alterações da polaridade do seu microambiente. Assim, a análise das perturbações no microambiente destes resíduos pode ser usada para monitorar alterações na estrutura terciária da proteína (NIU, et al., 2015). Num ambiente com baixa polaridade o triptofano emite fluorescência em um máximo de 320 nm. Em um ambiente polar ou quando há perda da estrutura terciária da proteína (desnaturação completa) este aminoácido emite fluorescência em 355 nm (ALBANI, 2007). Salienta-se que as perturbações nos resíduos de triptofano são muito mais sensíveis quando comparada aos resíduos de tirosina, desta forma, o triptofano é empregado como sonda preferencial para avaliação dos processos de interação com proteínas (KUMARAN; RAMAMURTHY, 2014). Assim, usou-se como comparativo os espectros dos aminoácidos tirosina e triptofano livres em relação aos espectros das proteínas ovalbumina comercial e ovalbumina *in natura* no pH = 7,4 por fluorescência molecular. Os resultados estão apresentados nas Figuras 11 e 12.

Ao compararmos os gráficos de contorno (Figura 11) do triptofano e tirosina livres (11a e 11b) com as proteínas de diferentes origens (comercial e *in natura*) percebeu-se que o triptofano emitia em torno de 354 nm ( $\lambda_{em}$ ), enquanto a tirosina em 338 nm. Contudo, como parte da energia emitida pelo resíduo de tirosina é transferida para o triptofano ou ocorre processo de *quenching* por outros aminoácidos, desta forma, preferencialmente observa-se a emissão do resíduo de triptofano nas medidas de fluorescência no estado estacionário (NEELAM, et al., 2010). De acordo com os espectros (em 3D) da ovalbumina (11c e 11d) a proteína independente da origem emitiu em 336 nm, existindo uma diferença da ordem de 18 nm para menores comprimentos de onda. Este fato indicou que os resíduos de triptofano na proteína (comercial ou *in natura*) estão em um microambiente mais protegido (da água ou de outras espécies que possam atuar como *quencher*) quando comparados com o espectro do triptofano livre. Isto se deve ao fato desta proteína apresentar dois resíduos deste aminoácido (Trp<sup>160</sup> e Trp<sup>275</sup>) localizados em região de  $\alpha$ -hélice, e desta forma estar menos exposto, visto estar em uma região de menor polaridade. Desta forma, à medida em que o resíduo de triptofano torna-se mais exposto à água o máximo do espectro de emissão ( $\lambda_{em}$ ) desloca-se para comprimentos de onda maiores, sendo válida a consideração contrária (HALDER, et al., 2012).

**Figura 11.** Avaliação espectral do microambiente dos resíduos de triptofano e tirosina ( $\text{pH} = 7,4$ ) por gráficos de contorno para: **a)** Triptofano ( $5,0 \mu\text{M}$ ), **b)** Tirosina ( $5,0 \mu\text{M}$ ) **c)** Ovalbumina comercial ( $0,5 \mu\text{M}$ ) **d)** Ovalbumina in natura ( $0,5 \mu\text{M}$ ).



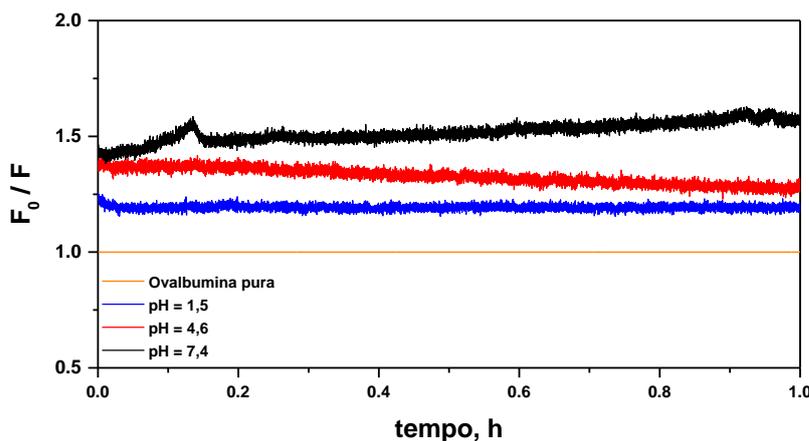
Fonte: elaborado pela autora, 2015.

### 4.3 Estudo cinético

Para obter medidas sob condições favoráveis da interação entre a ovalbumina e os antibióticos tetraciclina, oxitetraciclina e clorotetraciclina em diferentes valores de pH foi necessário um conhecimento prévio da evolução da interação destes compostos ao longo do tempo. Desta forma, avaliou-se o efeito do tempo de interação entre a ovalbumina e a tetraciclina (selecionada como modelo) nos valores de pH 1,5; 4,6 e 7,4 empregando-se como parâmetro analítico a razão entre a fluorescência antes e após a adição da tetraciclina no meio. Assim, foi definido como o tempo em que se atingiu uma estabilidade quanto a variação da relação da intensidade de fluorescência ( $F_0/F$ , sendo  $F$  = fluorescência após a adição de tetraciclina em um determinado tempo e  $F_0$  = fluorescência da ovalbumina na ausência da tetraciclina). A Figura 12 mostra os resultados desta avaliação.

A partir dos resultados obtidos observou-se que a interação entre a ovalbumina e a tetraciclina independente do pH ocorreu de forma imediata, mantendo-se praticamente constante de acordo com o perfil da fluorescência normalizada em função do intervalo de tempo avaliado. Portanto, a cinética de interação mostrou-se favorável e apresentou boa estabilidade para o intervalo de tempo investigado (60 min).

**Figura 12.** Avaliação da cinética de interação em diferentes valores de pH entre a ovalbumina (0,5  $\mu\text{M}$ ) e tetraciclina (10  $\mu\text{M}$ ) durante 60 min.



Fonte: elaborado pela autora, 2015

#### 4.4 Avaliação da acessibilidade dos resíduos de triptofano na ovalbumina

Visando avaliar a acessibilidade dos resíduos de triptofano na ovalbumina em função das moléculas utilizadas neste trabalho (TC, OTC e CTC) realizou-se titulações espectrofluorimétricas com este aminoácido livre e com a proteína nas condições que simulam o ovo (pH = 7,4), monitorando o decaimento da fluorescência. Assim, realizou-se os experimentos de *quenching* para cada sistema (aminoácido e proteína) na presença de concentrações crescentes dos ligantes, e os parâmetros para as equações de Stern-Volmer e Stern-Volmer modificada foram calculados (Tabela 7).

**Tabela 7.** Constantes de *quenching* para o triptofano livre e ovalbumina frente a tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC) e clorotetraciclina (CTC) em pH 7,4 a 30 °C.

Sistema	Stern-Volmer (equação 1)		Stern-Volmer modificada (equação 2)		
	$K_{sv}$ ( $10^4 \text{ L mol}^{-1}$ )	R	K ( $10^4 \text{ L mol}^{-1}$ )	f	r
L-triptofano + TC	13,1 ± 0,2	0,9671	17,7 ± 0,1	0,95	0,9683
L-triptofano + OTC	11,2 ± 0,1	0,9902	12,2 ± 0,2	0,92	0,9607
L-triptofano + CTC	6,70 ± 0,02	0,9974	6,68 ± 0,01	0,90	0,9956
Ovalbumina + TC	2,93 ± 0,02	0,9961	1,73 ± 0,01	0,69	0,9993
Ovalbumina + OTC	4,15 ± 0,01	0,9884	2,64 ± 0,02	0,79	0,9946
Ovalbumina + CTC	3,23 ± 0,02	0,9935	1,82 ± 0,01	0,71	0,9978

Fonte: elaborado pela autora, 2015.

De acordo com a Tabela 7 percebeu-se que na presença do triptofano livre a TC foi mais eficiente no processo de *quenching*, seguido pela OTC e CTC, respectivamente. A fração do fluoróforo acessível ao *quencher* foi próximo a unidade (valor máximo – 100% do fluoróforo acessível) e seguiu a mesma tendência dos valores das constantes calculados ( $K_{SV}$  e  $K$ ). Estes valores indicam um elevado grau de acessibilidade ao fluoróforo o que já seria esperado em função de se empregar a molécula livre. Contudo, a diferença dos valores encontrados em relação a máxima acessibilidade (100%) estaria relacionada a eficiência do processo de transferência de energia doador–ligante, solvente (o triptofano é sensível a solventes polares) e a presença de impurezas (ALBANI, 2007).

Para os sistemas empregando a ovalbumina observou-se uma redução acentuada nos valores das constantes, visto o fluoróforo não está tão acessível como na situação anterior (vide valores de  $f$ ). Na avaliação da interação com a proteína observou-se que a ordem quanto aos valores de  $K_{SV}$  e  $K$  foi OCT, CTC e TC, respectivamente. Esta ordem seguiu o valor da fração do fluoróforo disponível para interagir com o ligante ( $f$ ), visto que a OTC apresentou as maiores constantes, e por consequência o maior valor de  $f$  (79%). Vale ressaltar que na ovalbumina existem três resíduos de triptofano (Trp<sup>160</sup>, Trp<sup>194</sup> e Trp<sup>275</sup>), contudo esta estratégia de avaliação é limitada em identificar com qual(is) resíduo(s) a interação foi mais efetiva, assim, levando a uma informação global. Para tanto, estudos de modelagem molecular seriam necessários para estabelecer de forma mais precisa qual resíduo seria mais próximo ao ligante. Além disto, na proteína outros aminoácidos como a tirosina e fenilalanina, mesmos que de forma menos eficiente podem contribuir com a emissão de fluorescência, e desta forma, sofrer o processo de *quenching* dos ligantes investigados.

Assim, este estudo possibilitou inferir sobre a acessibilidade dos ligantes avaliados ao fluoróforo, sem identifica-lo na estrutura da proteína. Mas apresentou informações relevantes, visto que quanto maior o grau de acessibilidade do ligante, maior o efeito de *quenching* e por fim, maior será a constante de ligação (interação).

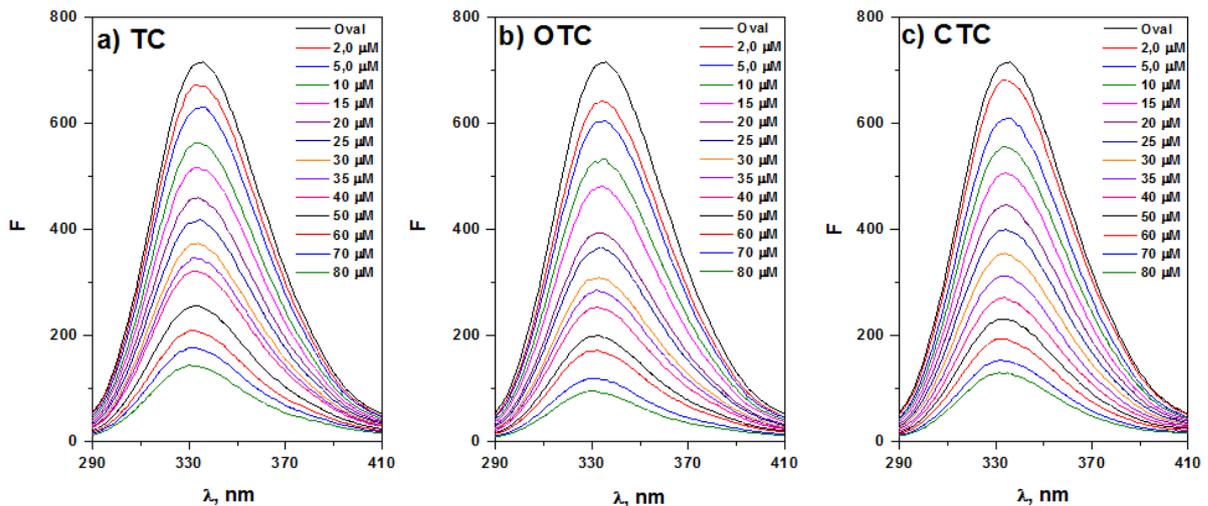
#### **4.5 *Quenching* de fluorescência**

*Quenching* de fluorescência é a redução do rendimento quântico da fluorescência de um fluoróforo induzido por uma variedade de interações moleculares com o *quencher* (ligante), como rearranjo molecular, transferência de energia, entre outras, como já mencionado neste trabalho no item 1.3.2.1. O *quenching* pode ser classificado em *quenching* dinâmico ou *quenching* estático. O *quenching* dinâmico ocorre com a colisão entre o inibidor (ligante) e fluoróforo durante o tempo de vida no estado excitado, o *quenching* estático ocorre com a

formação de um complexo não-fluorescente no estado fundamental (BI, et al., 2014; GE, et al., 2010).

Realizou-se titulação espectrofluorimétrica da ovalbumina com as três tetraciclina avaliadas (TC, OTC e CTC). Através deste estudo observou-se que a ovalbumina apresentou uma banda intensa e larga, centrada em 335 nm, quando excitada em 280 nm, e a adição de alíquotas de solução das tetraciclina (TC, OTC e CTC), levou a uma diminuição e deslocamento da intensidade dessa banda de 335 a 331 nm, conforme ilustrado na Figura 13 (apenas para pH = 7,4). Esta variação de intensidade e deslocamento do máximo de emissão foi atribuída às mudanças conformacionais dos microambientes protéicos próximos aos resíduos de aminoácidos, em especial, aos fragmentos de triptofano, associado ao processo de transferência de energia (MOREIRA, et al., 2014).

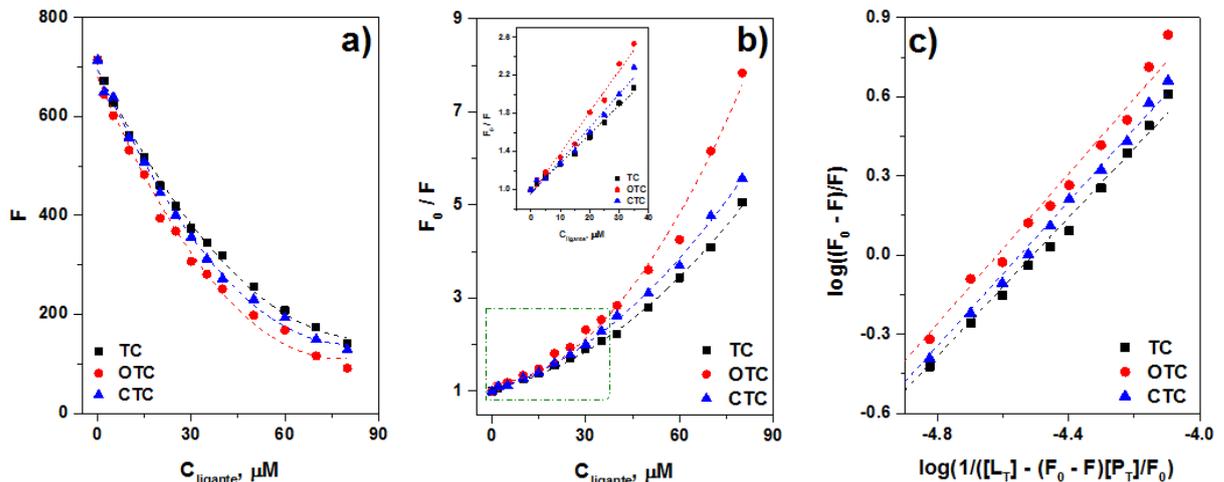
**Figura 13.** Titulação espectrofluorimétrica da ovalbumina (2,0  $\mu\text{M}$ ) em pH 7,4 (30 °C) para os seguintes ligantes: **a)** tetraciclina (TC), **b)** oxitetraciclina (OTC) e **c)** clorotetraciclina (CTC).



Fonte: elaborado pela autora, 2015.

A interação entre as três tetraciclina (TC, OTC e CTC) com a ovalbumina resulta na redução da fluorescência intrínseca desta biomolécula. Assim, fez-se necessário determinar por qual mecanismo esse processo ocorreu: *quenching* estático ou dinâmico. Para inferir o mecanismo de interação entre as tetraciclina e a ovalbumina analisou-se a dependência da constante de *quenching* dinâmico ( $K_{SV}$ ) em função da temperatura. A Figura 14 apresenta o perfil de decaimento do sinal, assim como o tratamento matemático para calcular as constantes de *quenching* e ligação. Desta forma, avaliou-se o efeito das três tetraciclina (TC, OTC e CTC) frente a ovalbumina comercial em diferentes valores de pH (1,5; 4,6 e 7,4) e temperatura (22, 30 e 38 °C). Os resultados para este estudo estão apresentados na Tabela 8.

**Figura 14.** Tratamento matemático das titulações espectrofluorimétricas em pH 7,4 (30 °C). **a)** Perfil de decaimento do sinal de fluorescência (335 nm) em função da concentração de tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC) e clorotetraciclina (CTC). **b)** Gráficos para avaliação do quenching pela equação de Stern-Volmer (gráfico interno – expansão da faixa de concentração indicada no retângulo com tendência linear). **c)** Perfil gráfico para cálculo da constante de ligação (equação 4) em função da concentração do ligante e da proteína.



Fonte: elaborado pela autora, 2015.

Como mencionado anteriormente, quando o valor da constante aumenta em função da elevação da temperatura é indicativo de *quenching* dinâmico, uma vez que temperaturas mais elevadas levam a um maior coeficiente de difusão, e por consequência um maior número de choques entre o fluoróforo (proteína) e o *quencher* (ligante). Quando os valores das constantes diminuem com o aumento da temperatura é indicativo de *quenching* estático, visto que temperaturas elevadas afetam a estabilidade do complexo fluoróforo-*quencher*, ou seja proteína-ligante (ZHANG, et al., 2009).

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 8) podemos observar que os valores das constantes de *quenching* ( $K_{SV}$  e  $K_q$ ) diminuíram com o aumento da temperatura, independente da tetraciclina e do pH do meio. Assim, o processo de interação entre as três tetraciclinas e a ovalbumina ocorreu predominantemente através do mecanismo de *quenching* estático com formação de um complexo não-fluorescente (WANG, et al., 2015).

**Tabela 8.** Parâmetros relativos a equação de Stern-Volmer quanto a avaliação do tipo de quenching para TC, OTC e CTC em diferentes condições de pH e temperatura.

Composto	pH	Temperatura (°C)	Constante de Stern-Volmer		
			$K_{SV}$ ( $\times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ )	r	$K_q$ ( $\times 10^{12} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )
Tetraciclina (TC)	1,5	22	$5,69 \pm 0,02$	0,9995	5,69
		30	$5,41 \pm 0,04$	0,9997	5,41
		38	$5,10 \pm 0,05$	0,9895	5,10
	4,6	22	$4,85 \pm 0,31$	0,9987	4,85
		30	$4,36 \pm 0,10$	0,9988	4,36
		38	$3,93 \pm 0,15$	0,9995	3,93
	7,4	22	$1,76 \pm 0,05$	0,9969	1,76
		30	$1,56 \pm 0,03$	0,9975	1,56
		38	$1,34 \pm 0,09$	0,9964	1,34
Oxitetraciclina (OTC)	1,5	22	$3,51 \pm 0,06$	0,9925	3,51
		30	$3,47 \pm 0,02$	0,9920	3,47
		38	$3,40 \pm 0,03$	0,9910	3,40
	4,6	22	$2,45 \pm 0,12$	0,9945	2,45
		30	$2,33 \pm 0,09$	0,9944	2,33
		38	$2,16 \pm 0,06$	0,9951	2,16
	7,4	22	$2,26 \pm 0,10$	0,9939	2,26
		30	$2,12 \pm 0,11$	0,9935	2,12
		38	$2,04 \pm 0,06$	0,9936	2,04
Clorotetraciclina (CTC)	1,5	22	$2,03 \pm 0,08$	0,9928	2,03
		30	$1,93 \pm 0,03$	0,9930	1,93
		38	$1,87 \pm 0,02$	0,9920	1,87
	4,6	22	$1,96 \pm 0,05$	0,9934	1,96
		30	$1,83 \pm 0,02$	0,9956	1,83
		38	$1,71 \pm 0,01$	0,9948	1,71
	7,4	22	$1,78 \pm 0,07$	0,9982	1,78
		30	$1,59 \pm 0,13$	0,9984	1,59
		38	$1,37 \pm 0,04$	0,9992	1,37

Fonte: elaborado pela autora, 2015.

De acordo com Shu e colaboradores (2015), quando o  $K_q$  (constante de velocidade de quenching bimolecular difusional) for menor que  $2,0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , ocorre mecanismo de quenching dinâmico, enquanto que para valores de  $K_q$  superiores é indicativo de mecanismo de quenching estático. Os valores de  $K_q$  obtidos no estudo de quenching (Tabela 8) variaram de 1,37 a  $5,69 \times 10^{12} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , este fator reforça que o processo de interação entre (TC, OTC e CTC) e a ovalbumina ocorreu através do mecanismo de quenching estático. Por fim, observou-se de forma geral que os valores da constante  $K_{SV}$  diminuíram com o aumento do pH, este fato pode estar relacionado com a maior exposição dos resíduos do triptofano em meio mais ácido.

#### 4.6 Constantes de ligação e parâmetros termodinâmicos

Uma vez definido o mecanismo de *quenching*, faz-se necessário avaliar o grau de interação entre as diferentes tetraciclinas (TC, OTC e CTC) e a ovalbumina comercial e *in natura*. Para a ovalbumina comercial as constantes e os dados termodinâmicos foram calculados nos valores de pH (1,5; 4,6 e 7,4), e para a ovalbumina *in natura* este estudo foi realizado em pH 7,4. Utilizou-se a equação (4) para calcular a constante de ligação ( $K_b$ ) e o número de sítios de interação ( $n$ ). O estudo de fluorescência em diferentes temperaturas permitiu calcular os parâmetros termodinâmicos envolvidos na interação das tetraciclinas com a macromolécula. De acordo com Wang e colaboradores (2015), a partir dos parâmetros termodinâmicos é possível inferir a natureza das ligações envolvidas no processo de interação proteína-ligante, bem como a descrição da espontaneidade deste processo.

Os parâmetros termodinâmicos ( $\Delta H$  e  $\Delta S$ ) apresentados na Tabela 9 foram calculados de acordo com a linearização da equação de Van't Hoff considerando que o calor da reação não se altera com temperatura (AO, et al., 2015), assim:

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{R} \cdot \left[ \frac{1}{T} \right] + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{Equação (12)}$$

Onde,  $K_b$  representa a constante de ligação,  $T$  a temperatura em Kelvin (K) e  $R$  a constante do gás ideal (8,314472 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>). Enquanto que o valor da energia livre de Gibbs foi calculada pela equação (13):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Equação (13)}$$

Considerando o valor negativo de  $\Delta G$ , percebeu-se que para as três tetraciclinas (TC, OTC e CTC) o processo de interação avaliado foi termodinamicamente espontâneo. Sabe-se que a relação entre o tipo de força envolvida no processo de interação e os valores de entalpia e entropia seguem a seguinte relação:  $\Delta H > 0$  e  $\Delta S > 0$ : forças hidrofóbicas;  $\Delta H < 0$  e  $\Delta S > 0$ : forças eletrostáticas e  $\Delta H < 0$  e  $\Delta S < 0$ : ligação de hidrogênio e forças de Van der Waals (ZHANG, Y., et al, 2009). Os resultados para os estudos da constante de ligação e dos parâmetros termodinâmicos estão sumarizados na Tabela 9.

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 9) observa-se que os valores de  $K_b$  para os complexos proteína-ligante formados são da ordem de grandeza de 10<sup>4</sup>. De modo geral, observou-se que a OTC em pH 1,5 apresenta maiores valores das constantes de ligação (58,4 - 27,3x10<sup>4</sup> L mol<sup>-1</sup>), o que indica que ocorreu uma maior interação entre OTC em pH 1,5 e a proteína. A TC em pH 7,4 apresentou os menores valores de constantes de ligação (3,16 - 2,11x10<sup>4</sup> L mol<sup>-1</sup>), indicativo de que ocorreu uma interação menos efetiva entre a TC neste

valor de pH e a ovalbumina. As constantes de ligação para as três tetraciclinas diminuem em função do aumento do pH e da temperatura, como já esperado em função do mecanismo de quenching dominante ser estático (BI, et al., 2014).

Para os três valores de pH avaliados (1,5; 4,6 e 7,4) a magnitude da interação seguiu a seguinte ordem: TC < CTC < OTC. Verificou-se que a OTC foi a tetraciclina que interagiu de forma mais efetiva com a ovalbumina, enquanto que a TC foi a que apresentou menor grau de interação com esta proteína. Uma vez que maiores valores de  $K_b$ , indicam uma maior ligação (interação) entre o ligante e a macromolécula. Após a avaliação das constantes de ligação, calculou-se os valores quanto ao número de sítios de ligação ( $n$ ), onde observou-se que para as tetraciclinas (TC, OTC e CTC) variou-se de 0,95 a 1,29 o que indica que as interações entre estas moléculas e a macromolécula ocorrem na proporção de 1:1.

Com relação aos parâmetros termodinâmicos verificou-se que os valores de energia livre de Gibbs e entalpia foram menores que zero, o que indica que o processo de interação foi espontâneo e exotérmico para todas as tetraciclinas. Em pH 1,5 as interações ocorreram preferencialmente por ligação de hidrogênio e forças de Van der Waals, enquanto em pH 4,6 e 7,4 por forças eletrostáticas para as três tetraciclinas (TC, OTC e CTC). Em pH 1,5 a proteína e as tetraciclinas estão com carga positiva (Figura 8), logo as interações eletrostáticas são menos efetivas, visto nenhum grupamento nas moléculas dos ligantes estava com carga negativa. Em relação aos valores de pH 4,6 e 7,4 onde a interação eletrostática prevalece (moléculas com carga negativa) em virtude possivelmente do deslocamento de moléculas de água associadas a estrutura da proteína. Uma vez que a interação ligante e proteína se estabelece, as moléculas de água associadas (ou solvente) são deslocadas devido a interação proteína-ligante. O grande número de moléculas do solvente é responsável por uma mudança de entropia positiva do sistema durante a interação (ANAND, et al., 2011).

Para a ovalbumina *in natura* obteve-se  $K_b$  igual a  $6,56(\pm 0,12) \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$  ( $r = 0,9993$ ) e  $n = 1,49 (\pm 0,10)$  em pH 7,4 a 30°C somente em estudos com a TC. De acordo com este resultado foi possível observar que o valor da constante de ligação  $K_b$  para a ovalbumina *in natura* quando comparado com o da ovalbumina comercial nas mesmas condições para TC foi superior (~24 vezes maior). Este comportamento pode estar associado ao fato da clara do ovo ser um sistema mais complexo, tendo a presença de outras proteínas.

**Tabela 9.** Parâmetros relativos a constante de ligação e parâmetros termodinâmicos para TC, OTC e CTC em diferentes condições de pH e temperatura.

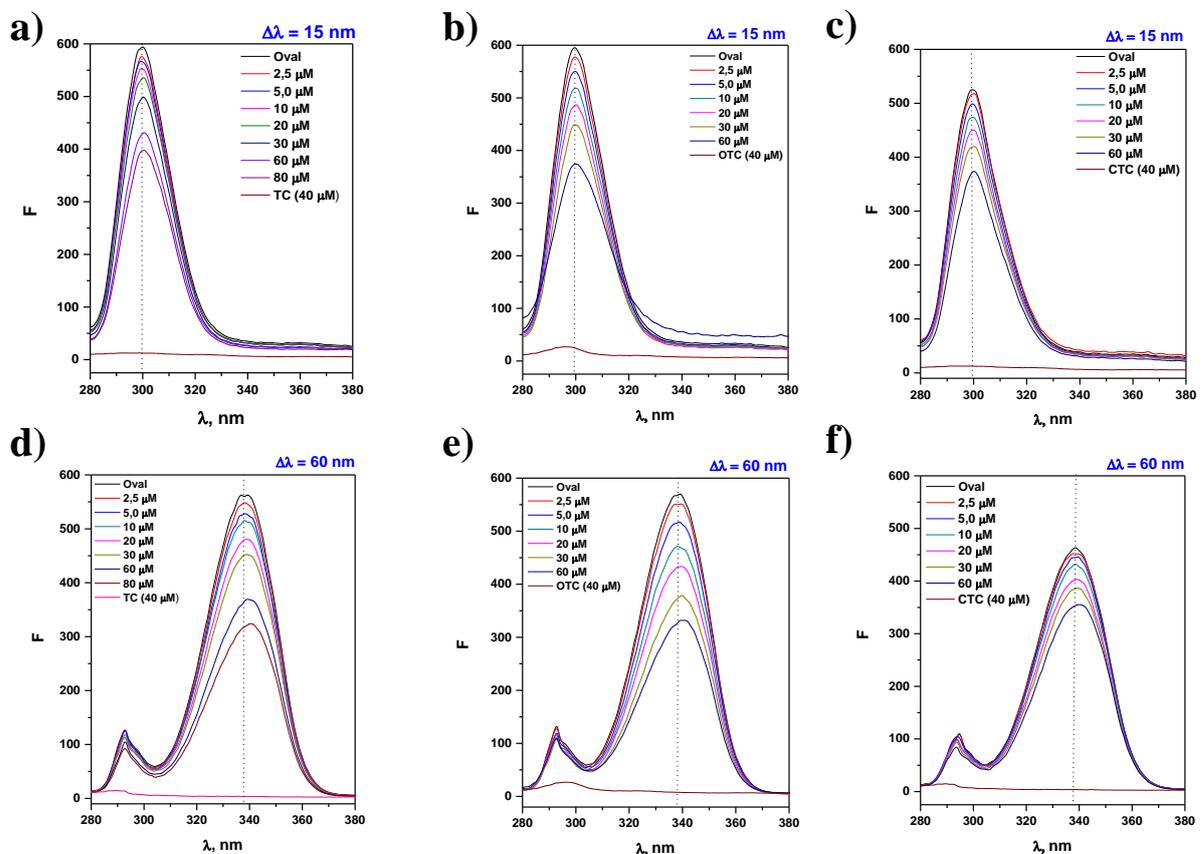
Composto	pH	Temperatura (°C)	Constante de ligação			Parâmetros termodinâmicos			Interações preferenciais
			$K_b$ ( $\times 10^4 \text{L mol}^{-1}$ )	$n$	$r$	$\Delta G$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )	$\Delta H$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )	$\Delta S$ ( $\text{J mol}^{-1}$ )	
TC	1,5	22	$25,8 \pm 0,3$	$1,10 \pm 0,11$	0,9876	- 30,59			Ligações de hidrogênio Forças de Van der Waals
		30	$16,9 \pm 0,6$	$1,06 \pm 0,02$	0,9885	- 30,32	- 40,24	- 32,71	
		38	$11,1 \pm 0,2$	$1,29 \pm 0,06$	0,9864	- 30,06			
	4,6	22	$4,68 \pm 0,11$	$1,14 \pm 0,06$	0,9964	- 26,30			Forças eletrostáticas
		30	$3,53 \pm 0,16$	$1,12 \pm 0,07$	0,9945	- 26,36	- 23,85	+ 8,31	
		38	$2,84 \pm 0,10$	$1,02 \pm 0,05$	0,9956	- 26,43			
	7,4	22	$3,16 \pm 0,19$	$1,13 \pm 0,12$	0,9912	- 25,47			Forças eletrostáticas
		30	$2,74 \pm 0,23$	$1,14 \pm 0,13$	0,9878	- 25,64	- 19,22	+ 21,20	
		38	$2,11 \pm 0,21$	$1,16 \pm 0,14$	0,9854	- 25,81			
OTC	1,5	22	$58,4 \pm 0,5$	$1,23 \pm 0,09$	0,9920	- 32,63			Ligações de hidrogênio Forças de Van der Waals
		30	$41,7 \pm 0,3$	$1,25 \pm 0,11$	0,9898	- 32,53	- 36,24	- 12,22	
		38	$27,3 \pm 0,2$	$1,26 \pm 0,10$	0,9894	- 32,44			
	4,6	22	$5,85 \pm 0,30$	$1,07 \pm 0,05$	0,9954	- 26,92			Forças eletrostáticas
		30	$4,89 \pm 0,33$	$1,11 \pm 0,04$	0,9964	- 27,19	- 16,84	+ 34,17	
		38	$4,11 \pm 0,24$	$1,15 \pm 0,05$	0,9938	- 27,46			
	7,4	22	$5,32 \pm 0,09$	$0,95 \pm 0,04$	0,9956	- 26,56			Forças eletrostáticas
		30	$4,26 \pm 0,11$	$0,97 \pm 0,05$	0,9952	- 26,90	- 14,15	+ 42,07	
		38	$3,96 \pm 0,07$	$1,01 \pm 0,04$	0,9970	- 27,23			
CTC	1,5	22	$32,4 \pm 0,4$	$1,26 \pm 0,14$	0,9985	- 31,31			Ligações de hidrogênio Forças de Van der Waals
		30	$24,3 \pm 0,5$	$1,18 \pm 0,13$	0,9991	- 30,89	- 46,83	- 52,60	
		38	$12,1 \pm 0,3$	$1,15 \pm 0,10$	0,9986	- 30,47			
	4,6	22	$5,08 \pm 0,28$	$1,16 \pm 0,04$	0,9980	- 26,61			Forças eletrostáticas
		30	$4,59 \pm 0,21$	$1,15 \pm 0,03$	0,9987	- 26,93	- 14,94	+ 39,58	
		38	$3,71 \pm 0,22$	$1,25 \pm 0,07$	0,9957	- 27,25			
	7,4	22	$3,71 \pm 0,08$	$1,02 \pm 0,02$	0,9987	- 25,78			Forças eletrostáticas
		30	$2,89 \pm 0,11$	$1,01 \pm 0,02$	0,9983	- 25,94	- 19,83	+ 20,18	
		38	$2,45 \pm 0,13$	$1,05 \pm 0,01$	0,9994	- 26,10			

Fonte: elaborado pela autora, 2015.

#### 4.7 Estudos por fluorescência sincronizada

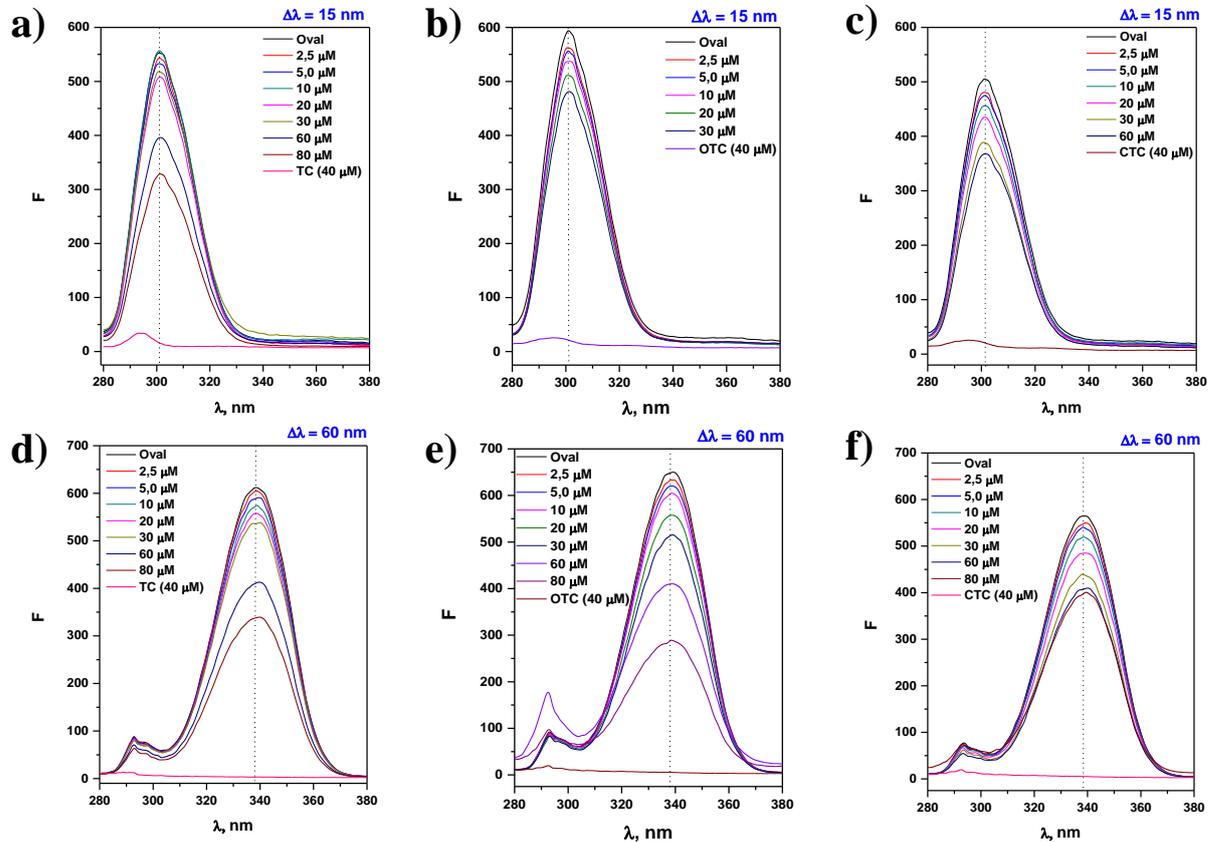
Para observar possíveis alterações na polaridade do microambiente relacionado aos resíduos de aminoácidos tirosina e triptofano da ovalbumina de diferentes origens (comercial e *in natura*) na presença de diferentes tetraciclinas realizou-se estudos por fluorescência sincronizada. Neste estudo, avaliou-se o efeito da adição de concentrações crescentes de três tetraciclinas (TC, OTC e CTC) a ovalbumina comercial em três valores de pH (1,5; 4,6 e 7,4), e para a ovalbumina *in natura* este estudo foi realizado de forma similar em valor de pH fixo (pH = 7,4) considerando as condições do alimento. Os resultados para este estudo estão apresentados nas Figuras 15, 16 e 17 e Tabela 11. Por apresentar perfil similar, os resultados para avaliação da interação das diferentes tetraciclinas estudadas foram apresentados somente na Tabela 11 quando avaliou-se a ovalbumina *in natura* no pH 7,4; o mesmo do alimento.

**Figura 15.** Espectros de fluorescência sincronizada após adição de concentrações crescentes de tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC) e clorotetraciclina (CTC) a ovalbumina comercial (pH = 1,5). **a)** tetraciclina ( $\Delta\lambda = 15$  nm), **b)** oxitetraciclina ( $\Delta\lambda = 15$  nm), **c)** clorotetraciclina ( $\Delta\lambda = 15$  nm), **d)** tetraciclina ( $\Delta\lambda = 60$  nm), **e)** oxitetraciclina ( $\Delta\lambda = 60$  nm) e **f)** clorotetraciclina ( $\Delta\lambda = 60$  nm). As concentrações avaliadas para cada composto encontram-se na parte interna de cada gráfico.



Fonte: elaborado pela autora, 2015.

**Figura 16.** Espectros de fluorescência sincronizada após adição de concentrações crescentes de TC, OTC e CTC a ovalbumina comercial ( $pH = 4,6$ ). **a)** tetraciclina ( $\Delta\lambda = 15$  nm), **b)** oxitetraciclina ( $\Delta\lambda = 15$  nm), **c)** clorotetraciclina ( $\Delta\lambda = 15$  nm), **d)** tetraciclina ( $\Delta\lambda = 60$  nm), **e)** oxitetraciclina ( $\Delta\lambda = 60$  nm) e **f)** clorotetraciclina ( $\Delta\lambda = 60$  nm). As concentrações avaliadas para cada composto encontram-se na parte interna de cada gráfico.

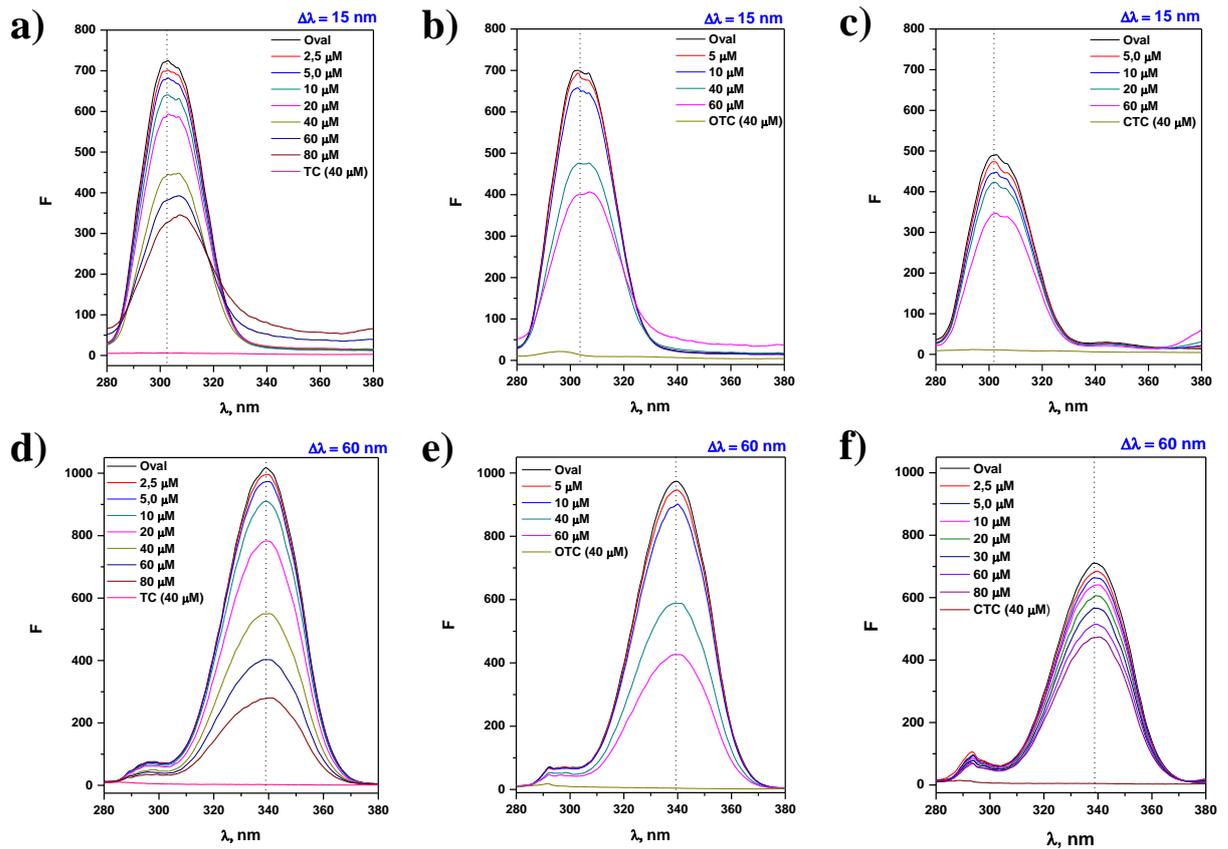


Fonte: elaborado pela autora, 2015.

Nos estudos de fluorescência sincronizada pretende-se observar variações no comprimento de onda de emissão dos resíduos de tirosina ( $\Delta\lambda = 15$  nm) e triptofano ( $\Delta\lambda = 60$  nm) presentes na proteína e como o microambiente destes será afetado após adição das diferentes moléculas de tetraciclina (FU, et al., 2014). Quando ocorrem deslocamentos para maiores comprimentos de onda em relação ao espectro de emissão da proteína, implica que houve alteração na estrutura original da mesma, e assim, o resíduo de aminoácido monitorado está exposto a um ambiente mais polar (com maior presença de água, por exemplo). O contrário, com redução do comprimento de onda de emissão da proteína com adição de concentrações crescentes da molécula em estudo, é um indicativo de um maior grau de compactação da estrutura proteica, protegendo os resíduos de tirosina e triptofano, e desta forma, tornando o microambiente mais apolar (com menor exposição a moléculas de água, por exemplo) (WANG, R., et al, 2014). Além disto, foi possível avaliar qual das moléculas alterou de forma mais significativa o microambiente da proteína. Esta avaliação pôde ser realizada através do cálculo

da constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) frente aos espectros de fluorescência sincronizada em função do  $\Delta\lambda$  (15 ou 60 nm), pH, molécula de tetraciclina avaliada e origem da proteína

**Figura 17.** Espectros de fluorescência sincronizada após adição de concentrações crescentes de TC, OTC e CTC a ovalbumina comercial (pH = 7,4). **a)** tetraciclina ( $\Delta\lambda = 15$  nm), **b)** oxitetraciclina ( $\Delta\lambda = 15$  nm), **c)** clorotetraciclina ( $\Delta\lambda = 15$  nm), **d)** tetraciclina ( $\Delta\lambda = 60$  nm), **e)** oxitetraciclina ( $\Delta\lambda = 60$  nm) e **f)** clorotetraciclina ( $\Delta\lambda = 60$  nm). As concentrações avaliadas para cada composto encontram-se na parte interna de cada gráfico.



Fonte: elaborado pela autora, 2015.

De acordo com os resultados obtidos (Figuras 15, 16 e 17 e Tabela 11) podemos observar para o resíduo de tirosina não houve deslocamento do máximo de emissão nos valores de pH 1,5 e 4,6; independente da molécula avaliada frente a ovalbumina. Contudo, em pH 7,4 ocorreu deslocamento do máximo de emissão da proteína (de 1 a 4 nm) para todas as tetraciclina avaliadas, assim como, para ovalbumina comercial e *in natura* (Tabela 10). Possivelmente este comportamento se deu em função de que em menores valores de pH a estrutura da proteína não estava organizada (enovelada) como no pH do alimento (ALBERTS, et al., 2010).

**Tabela 10.** Parâmetros relacionados aos estudos de fluorescência sincronizada na avaliação do microambiente dos resíduos de aminoácidos tirosina e triptofano quanto a interação da ovalbumina com TC, OTC e CTC.

pH	$\Delta\lambda$ (nm)	TC			OTC			CTC		
		Ksv ( $\times 10^3$ , L mol <sup>-1</sup> )	r	Varição* (nm)	Ksv ( $\times 10^3$ , L mol <sup>-1</sup> )	r	Varição (nm)	Ksv ( $\times 10^3$ , L mol <sup>-1</sup> )	r	Varição (nm)
<b>Proteína comercial</b>										
1,5	15	6,09 ± 0,16	0,9978	0	9,63 ± 0,40	0,9956	0	7,07 ± 0,41	0,9920	0
	60	9,23 ± 0,27	0,9973	3	17,76 ± 0,89	0,9951	3	6,52 ± 0,31	0,9958	2
4,6	15	6,53 ± 0,47	0,9922	0	7,58 ± 0,12	0,9778	0	5,88 ± 0,46	0,9943	0
	60	4,65 ± 0,28	0,9929	2	9,61 ± 0,33	0,9970	2	6,63 ± 0,73	0,9945	2
7,4	15	11,60 ± 0,57	0,9977	4	13,02 ± 0,62	0,9966	4	8,40 ± 0,46	0,9970	1
	60	12,09 ± 0,87	0,9948	2	17,09 ± 0,62	0,9934	2	8,09 ± 0,59	0,9912	2
<b>Proteína in natura</b>										
7,4		6,99 ± 0,25	0,9980	1	9,77 ± 0,53	0,9923	1	4,26 ± 0,35	0,9867	1
		7,89 ± 0,34	0,9966	2	8,46 ± 0,27	0,9957	2	4,98 ± 0,26	0,9958	2

\* refere-se ao máximo deslocamento em função dos resíduos de tirosina para triptofano para uma dada concentração do composto.

*Fonte: elaborado pela autora, 2015.*

Logo, a interação com os ligantes avaliados não influenciou em uma maior exposição dos resíduos de tirosina, visto que os mesmos provavelmente já estavam expostos ao solvente (água), situação oposta em relação a conformação da ovalbumina em pH 7,4. Adicionalmente, os resíduos de tirosina, são menos sensíveis as alterações da polaridade do meio, em comparação ao triptofano (SUN, et al., 2010). Neste sentido, o triptofano funciona como uma sonda mais sensível que a tirosina para avaliar alterações na conformação de proteínas em função da alteração da polaridade na presença de determinado ligante.

Quanto aos resíduos de triptofano observou-se que estes por serem mais sensíveis ao efeito de alterações no meio (aumento ou diminuição da polaridade) foram afetados em todos os valores de pH independente do ligante e da origem da ovalbumina. Foram observados deslocamentos de 1 a 2 nm quanto ao máximo de emissão da proteína (Tabela 10). Estes resultados indicam que as três tetraciclina avaliadas alteraram a estrutura da ovalbumina para uma conformação menos enovelada quando comparada com a estrutura nativa e desta forma, os resíduos dos aminoácidos de tirosina (pH = 7,4) e triptofano (todos os valores de pH) da ovalbumina tornaram-se expostos a um microambiente mais polar.

Os resultados para o pH 7,4 corroboram com os trabalhos da literatura, onde Chi e colaboradores (2010), realizaram o estudo de interação entre a OTC e a hemoglobina bovina (em pH 7,4) e pelo estudo de fluorescência sincronizada observaram deslocamento de 1 nm para maiores comprimentos de onda para os resíduos de tirosina, o que indica que o microambiente deste resíduo na hemoglobina bovina foi alterado para um microambiente mais polar. Para os resíduos de triptofano não houve deslocamento, o que indicou que a OTC não influenciou no microambiente do resíduo deste aminoácido.

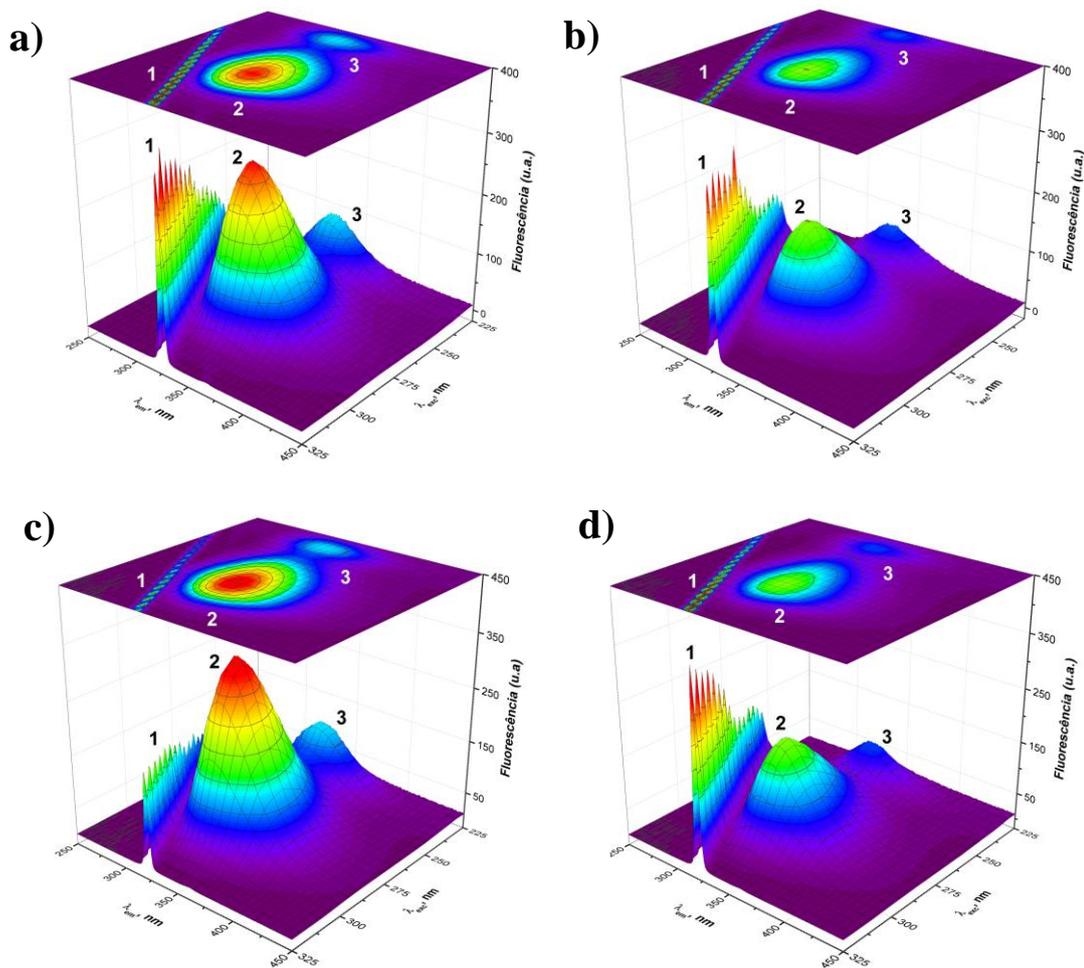
Chi e Liu (2011) realizaram estudos de interação entre a tetraciclina e a albumina do soro humano (HSA, em pH 7,4) e para os resíduos de tirosina não houve deslocamento, o que indicou que a TC tem pouco efeito sobre o microambiente dos resíduos de tirosina da HSA. Observou-se deslocamento para menores comprimentos de onda para os resíduos de triptofano de 2 nm, o que indicou que o microambiente do resíduo de triptofano na HSA foi alterado e tornou-se menos polar, ou seja, mais protegido do solvente.

Por fim, de acordo com a Tabela 10 foi observada pelos valores de  $K_{SV}$  que a OTC apresentou os maiores valores. Isto indica que a oxitetraciclina altera a conformação da ovalbumina de uma forma mais efetiva que as outras moléculas. Este fato pode estar associado ao grupo hidroxila adicional (em relação a TC), o que aumenta a possibilidade de formação de ligações de hidrogênio, e por consequência o grau de interação com a proteína, levando a mudanças em sua estrutura, e expondo os resíduos de aminoácidos ao meio.

#### 4.8 Estudos por fluorescência tridimensional (3D)

Para obter informações de possíveis alterações na estrutura secundária da ovalbumina e do microambiente do resíduo do fluoróforo (aminoácidos triptofano e tirosina) na presença das três tetraciclinas realizou-se estudos por fluorescência 3D. Neste estudo avaliou-se o efeito da adição das tetraciclinas (TC, OTC e CTC) a proteínas de diferentes origens (comercial e *in natura*), em valor de pH fixado em 7,4. As Figuras 18 e 19 apresentam os resultados para estas avaliações.

**Figura 18.** Avaliação do efeito da adição de tetraciclina a ovalbumina comercial e *in natura* em pH 7,4 por fluorescência 3D (gráfico com projeção). **a)** Ovalbumina comercial (0,5  $\mu\text{M}$ ), **b)** ovalbumina comercial (0,5  $\mu\text{M}$ ) + tetraciclina (20  $\mu\text{M}$ ), **c)** ovalbumina *in natura* (0,5  $\mu\text{M}$ ) e **d)** ovalbumina *in natura* (0,5  $\mu\text{M}$ ) + tetraciclina (20  $\mu\text{M}$ ). Os números em cada gráfico indicam os picos relativos ao espalhamento e emissão de radiação.



Fonte: elaborado pela autora, 2015.

Ao compararmos os gráficos em 3D da ovalbumina comercial livre (Figura 18a) com o da proteína comercial e tetraciclina (Figura 18b) podemos observar três picos (1, 2 e 3). O pico 1

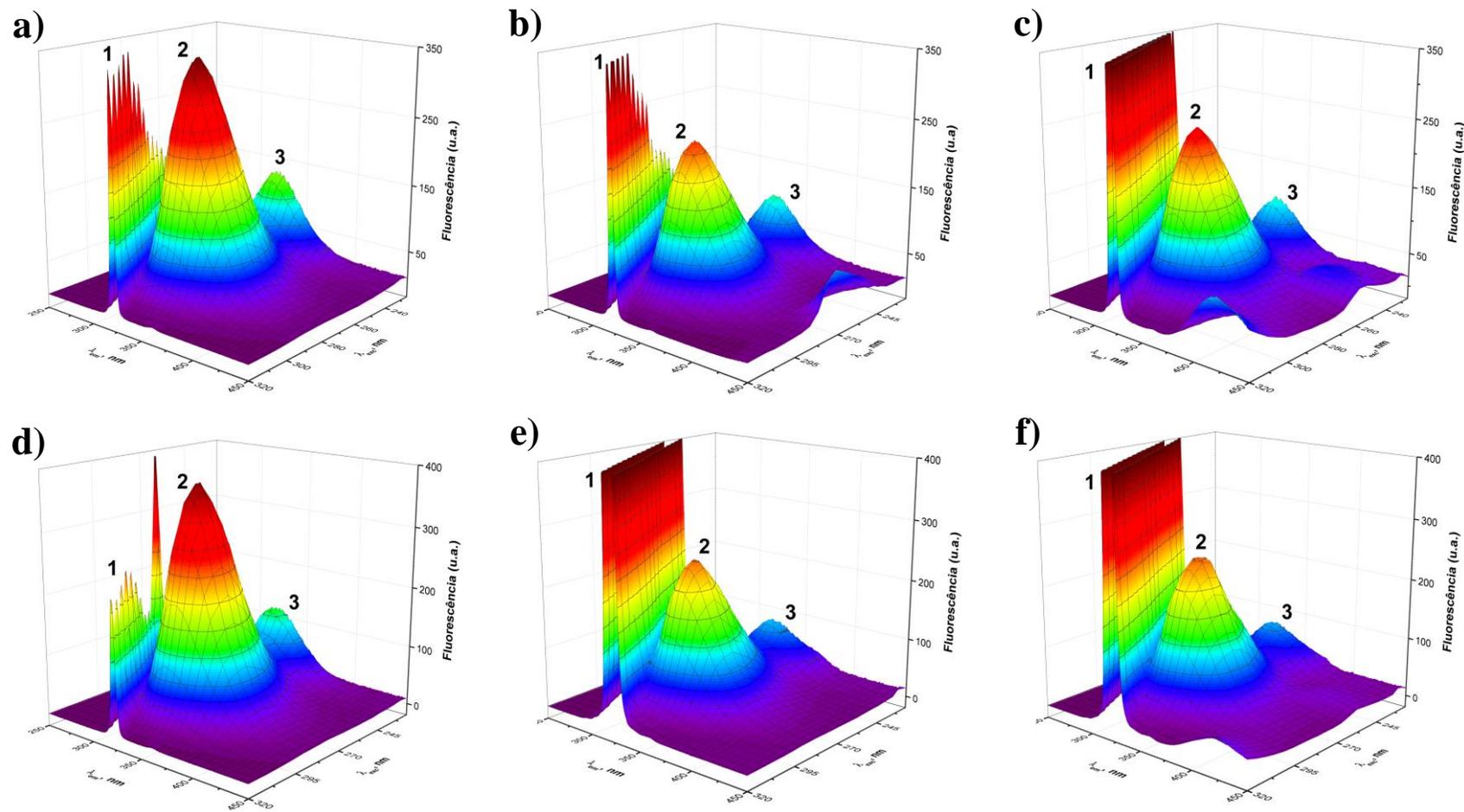
corresponde ao espalhamento Rayleigh, o qual caracteriza-se pela re-emissão de radiação pelo solvente onde o composto está dissolvido, desta forma uma pequena fração da radiação absorvida ( $\lambda_{exc}$ ) é espalhada em todas as direções no mesmo comprimento de onda (LAKOWICZ, 2006). O pico 2 corresponde aos resíduos de triptofano e tirosina e o pico 3 corresponde ao esqueleto do polipeptídeo da estrutura da ovalbumina (SHARMA; ANANDAKUMAR; ILANCHELIA, 2014). Verificou-se que após a adição da tetraciclina houve redução do sinal de fluorescência referentes aos picos 2 e 3. Ao compararmos os gráficos 3D (Figura 18c) da ovalbumina *in natura* com o da ovalbumina *in natura* na presença de tetraciclina (Figura 18d) podemos observar perfil e comportamento semelhante ao da ovalbumina comercial. De acordo com Zhang e colaboradores (2008), quando o ligante e a proteína estão no mesmo sistema químico e observa-se mudança no comprimento de onda de excitação ( $\lambda_{exc}$ ) ou emissão ( $\lambda_{em}$ ) em relação aos picos de fluorescência; ou redução, surgimento ou desaparecimento dos picos, indicam que a estrutura da proteína foi alterada ao interagir com o ligante.

Ao compararmos os gráficos 3D da ovalbumina comercial e tetraciclina (Figura 18b) com o gráfico da ovalbumina *in natura* (Figura 18d), verificou-se uma redução aproximada da fluorescência de 60 e 78% para os picos 2 e 3, respectivamente, da ovalbumina comercial (Figura 18b). Enquanto para a ovalbumina *in natura* observou-se uma redução aproximada da fluorescência de 53 e 65% para os picos 2 e 3, respectivamente (Figura 18d). Desta forma, a redução da fluorescência foi mais acentuada na ovalbumina *in natura*. Visto que, nesta condição possivelmente houve uma maior interação da tetraciclina com esta proteína. Este fato, pode estar associado a presença de outras espécies no meio, influenciando de forma favorável a formação do complexo supramolecular proteína e tetraciclina com ovalbumina da *in natura*.

De acordo com o perfil espectral dos gráficos em três dimensões da ovalbumina comercial livre na presença da oxitetraciclina e clorotetraciclina (Figura 19a, 19b e 19c) em comparação com os gráficos 3D da ovalbumina *in natura* livre e na presença da OTC e CTC (Figura 19c, 19d e 19e) observamos um perfil similar e observou-se redução significativa nos picos de fluorescência 2 e 3 para as duas condições, o que nos indica que ocorreu interação da oxitetraciclina e cloro tetraciclina com a proteína (comercial e *in natura*).

As Tabelas 11 e 12 apresentam uma compilação em relação aos estudos de fluorescência em três dimensões da ovalbumina (comercial e *in natura*) na presença dos três ligantes avaliados (TC, OTC e CTC) em pH fixado a 7,4.

**Figura 19.** Avaliação do efeito da adição de oxitetraciclina ( $20\ \mu\text{M}$ ) e clorotetraciclina ( $20\ \mu\text{M}$ ) a ovalbumina comercial ( $0,5\ \mu\text{M}$ ) e in natura ( $0,5\ \mu\text{M}$ ) a pH 7,4 através de gráficos de fluorescência 3D. **a)** Ovalbumina comercial, **b)** ovalbumina comercial + oxitetraciclina, **c)** ovalbumina comercial + clorotetraciclina, **d)** ovalbumina in natura, **e)** ovalbumina in natura + oxitetraciclina e **f)** ovalbumina in natura + clorotetraciclina. Os números em cada gráfico indicam os picos relativos ao espalhamento e emissão de radiação.



Fonte: elaborado pela autora, 2015.

**Tabela 11.** Características do perfil espectral dos gráficos de fluorescência em três dimensões (3D) para os sistemas ovalbumina e ovalbumina-TC, sendo avaliadas a ovalbumina comercial (C) e in natura (OVO). Indicações entre parêntesis são relativas ao percentual do sinal de emissão de fluorescência da proteína na ausência (100%) e presença do ligante.

Pico	Ovalbumina (C)			Ovalbumina (C) – TC		
	Posição ( $\lambda_{exc} / \lambda_{em}$ )	Stokes <sup>1</sup> $\Delta\lambda$ (nm)	<sup>2</sup> F	Posição ( $\lambda_{exc} / \lambda_{em}$ )	Stokes $\Delta\lambda$ (nm)	F
1	$\lambda_{exc} = \lambda_{em}$	0	332	$\lambda_{exc} = \lambda_{em}$	0	292
2	282 / 337	55	265 (100%)	281 / 338	57	158 (59,6%)
3	237 / 338	101	95 (100%)	237 / 335	98	74 (77,9%)

Pico	Ovalbumina (OVO)			Ovalbumina (OVO) – TC		
	Posição ( $\lambda_{exc} / \lambda_{em}$ )	Stokes $\Delta\lambda$ (nm)	F	Posição ( $\lambda_{exc} / \lambda_{em}$ )	Stokes $\Delta\lambda$ (nm)	F
1	$\lambda_{exc} = \lambda_{em}$	0	170	$\lambda_{exc} = \lambda_{em}$	0	332
2	285 / 336	51	325 (100%)	286 / 335	49	173 (53,2%)
3	237 / 335	98	115 (100%)	238 / 334	96	75 (65,2%)

<sup>1</sup>Stokes  $\Delta\lambda$  (nm) = relativo ao deslocamento Stokes, sendo  $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{exc}$  // <sup>2</sup>F = intensidade de fluorescência.

Fonte: elaborado pela autora, 2015.

**Tabela 12.** Características do perfil espectral dos gráficos de fluorescência em três dimensões (3D) para os sistemas ovalbumina, ovalbumina-OTC e ovalbumina-CTC. Foram avaliadas a ovalbumina comercial (C) e in natura (OVO). Indicações entre parêntesis são relativas ao percentual do sinal de emissão de fluorescência da proteína na ausência (100%) e presença do ligante.

Pico	Ovalbumina (C)			Ovalbumina (C) – OTC			Ovalbumina (C) – CTC		
	Posição ( $\lambda_{exc} / \lambda_{em}$ )	Stokes <sup>1</sup> $\Delta\lambda$ (nm)	<sup>2</sup> F	Posição ( $\lambda_{exc} / \lambda_{em}$ )	Stokes $\Delta\lambda$ (nm)	F	Posição ( $\lambda_{exc} / \lambda_{em}$ )	Stokes $\Delta\lambda$ (nm)	F
1	$\lambda_{exc} = \lambda_{em}$	0	356	$\lambda_{exc} = \lambda_{em}$	0	402	$\lambda_{exc} = \lambda_{em}$	0	1008
2	282 / 337	55	341 (100%)	282 / 334	52	224 (65,7%)	281 / 337	56	237 (69,5%)
3	237 / 338	101	132 (100%)	237 / 335	98	95 (71,9%)	234 / 332	98	101 (76,5%)

Pico	Ovalbumina (OVO)			Ovalbumina (OVO) – OTC			Ovalbumina (OVO) – CTC		
	Posição ( $\lambda_{exc} / \lambda_{em}$ )	Stokes $\Delta\lambda$ (nm)	F	Posição ( $\lambda_{exc} / \lambda_{em}$ )	Stokes $\Delta\lambda$ (nm)	F	Posição ( $\lambda_{exc} / \lambda_{em}$ )	Stokes $\Delta\lambda$ (nm)	F
1	$\lambda_{exc} = \lambda_{em}$	0	247	$\lambda_{exc} = \lambda_{em}$	0	1015	$\lambda_{exc} = \lambda_{em}$	0	1018
2	285 / 336	51	378 (100%)	281 / 337	56	237 (62,7%)	279 / 333	54	234 (61,9%)
3	237 / 335	98	126 (100%)	237 / 334	97	88 (69,8%)	234 / 329	95	86 (68,3%)

<sup>1</sup>Stokes  $\Delta\lambda$  (nm) = relativo ao deslocamento Stokes, sendo  $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{exc}$  // <sup>2</sup>F = intensidade de fluorescência.

Fonte: elaborado pela autora, 2015.

Ao compararmos os resultados das Tabelas 11 e 12 observou-se que a adição das três tetraciclina (TC, OTC e CTC) levou a uma redução na intensidade de fluorescência dos picos 2 e 3 para as proteínas comercial e in natura. Para a TC os picos 2 e 3 da OVAL comercial apresentou redução da intensidade do sinal de 265 para 158, correspondente a 59,6% e, de 95 para 74 o que correspondeu a 77,9%, respectivamente. Para a ovalbumina in natura os picos 2 e 3 apresentaram redução do sinal de 325 para 173 representando uma redução de 53,2% e de 115 para 75, correspondendo a uma redução de 65,2%, respectivamente.

Para a OTC foi observada redução do sinal de fluorescência de 341 para 224 e 132 para 95 para os picos 2 e 3, respectivamente para ovalbumina comercial, o que correspondeu a uma redução da fluorescência de 65,7 e 71,9%, respectivamente. Para a ovalbumina *in natura* observou-se redução do sinal de fluorescência de 378 para 237 e 126 para 88 referentes aos picos 2 e 3, respectivamente da proteína *in natura*, que representou uma redução da fluorescência de 62,7 e 69,8%, respectivamente.

A adição de CTC levou a redução da fluorescência dos picos 2 e 3 da ovalbumina comercial na qual apresentaram redução de fluorescência de 341 para 237 (69,5%) e 132 para 101 (76,5%) respectivamente. Para a ovalbumina *in natura* os picos 2 e 3 apresentaram redução de 378 para 234 (61,9%) e 126 para 86 (68,3%), respectivamente.

Estes resultados indicam que ocorreu interação entre as três tetraciclinas avaliadas (TC, OTC e CTC) e a ovalbumina de diferentes origens (comercial e *in natura*). A redução do pico 2 indicou que o microambiente dos resíduos dos aminoácidos tirosina e triptofano da proteína foram alterados, e a redução do pico 3 indica que a estrutura das proteínas foi modificada. Possivelmente este comportamento ocorreu em função do desdobramento das cadeia polipeptídicas da proteína ao interagir com as três tetraciclinas (TC, OTC e CTC), o que alterou o microambiente a estrutura e grau de enovelamento original (WANG, Q., et al., 2015).

#### **4.9 Transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET)**

Para avaliar a distância na qual ocorre a transferência de energia entre os resíduos de triptofano da ovalbumina e as tetraciclinas (TC, OTC e CTC) realizou-se estudos de transferência de energia não-radiativa. Neste estudo, a condição básica é que exista algum grau de sobreposição espectral entre o espectro de emissão da ovalbumina (doador – D) e o espectro de absorção molecular do ligante (acceptor – A). Assim, podem ocorrer duas situações: se o ligante atuar como fluoróforo a absorção da energia pelo doador pode levar a re-emissão ou, somente ocorrer absorção sem nova emissão de radiação, assim tem-se *quenching*, o que foi observado neste trabalho. Para tanto avaliou-se a área de sobreposição dos espectros de fluorescência da ovalbumina livre e de absorção molecular da TC, OTC e CTC em três valores de pH (1,5; 4,6 e 7,4). Os resultados estão apresentados na Tabela 13 e Figura 20.

**Tabela 13.** Parâmetros calculados relacionados ao processo de FRET e comparação com os dados da literatura.

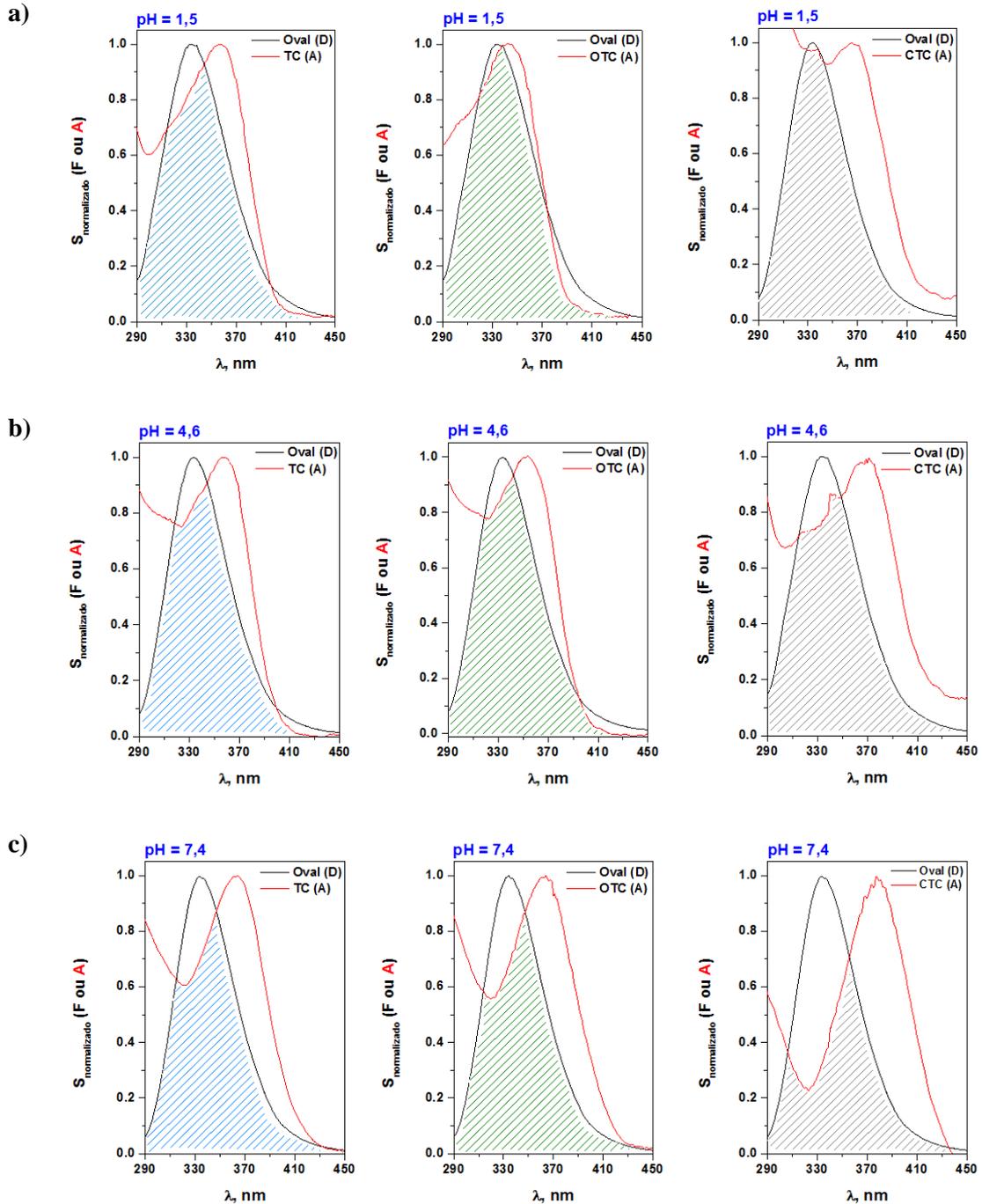
Composto	pH	J ( $10^{-15} \text{ cm}^3 \text{ L mol}^{-1}$ )	E	R <sub>0</sub> (nm)	r <sub>0</sub> (nm)
Tetraciclina	1,5	8,90	0,13	2,38	3,26
	4,6	7,17	0,17	2,29	2,98
	7,4	8,53	0,16	2,36	3,11
Oxitetraclina	1,5	9,58	0,10	2,41	3,47
	4,6	7,72	0,19	2,32	2,95
	7,4	8,71	0,14	2,37	3,20
Clorotetraciclina	1,5	9,34	0,09	2,39	3,52
	4,6	8,93	0,21	2,38	2,96
	7,4	6,40	0,15	2,25	3,00
Dados da literatura					
Proteína	Composto	pH	r <sub>0</sub> (nm)	Referência	
OVAL	Quercetina	7,4	5,71	LU, et al., 2009.	
HSA	TC	7,4	2,25	BI, et al., 2005.	
HSA	OTC	7,4	2,09		
HSA	CTC	7,4	2,19		
BSA	TC	7,4	2,19		
BSA	OTC	7,4	2,13		
BSA	CTC	7,4	2,22		
BSA	TC	7,4	1,89	ANAND, et al., 2011.	
HSA	TC	7,4	1,91		
Lisozima	TC	7,4	1,93		

Fonte: elaborado pela autora, 2015.

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 13) verificou-se que a energia transferida (E) variou de 0,09 a 0,21, indicando que houve transferência de energia menor que 50%, o que implica que  $R_0 < r_0$ . Os valores das distâncias  $r_0$  para as tetraciclina (TC, OTC e CTC) variaram de 2,95 a 3,52 nm. Assim, a distância crítica  $r_0$  entre as tetraciclina e o resíduo de triptofano da ovalbumina foi inferior a 8-10 nm. Estes resultados indicaram que houve transferência de energia não-radioativa entre as tetraciclina avaliadas neste trabalho e a ovalbumina independente do pH (SHU, et al., 2015).

Ao compararmos os resultados obtidos com os dados da literatura (Tabela 13) foi possível observar que estão concordantes com outros trabalhos da literatura. Indicando coerência entre os resultados encontrados e a literatura.

**Figura 20.** Sobreposição dos espectros normalizados de fluorescência da ovalbumina ( $1,0 \mu\text{M}$ ) que atua como doador (D) de radiação e absorção molecular da tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC) e clorotetraciclina (CTC) que atuam como aceptores (A) em **a)** pH 1,5; **b)** pH 4,6 e **c)** pH 7,4. Todas as tetraciclinas foram avaliadas a  $1,0 \mu\text{M}$ .



Fonte: elaborado pela autora, 2015.

#### 4.10 Estudo de competição

Neste estudo avaliou-se o efeito da influência de alguns íons competidores (Ca(II), Mg(II), Zn(II), Cu(II) e Fe(III)) na interação das diferentes tetraciclinas com a ovalbumina em pH 7,4. Neste processo podem ocorrer as seguintes possibilidades: *i*) a espécie avaliada competir

pelo mesmo sítio de interação na proteína; *ii*) ocorrer a formação de um complexo competidor-ligante que interage menos ou mais com a proteína que o ligante isolado; e *iii*) ocorrer os dois processos de forma simultânea. Estes cátions foram selecionados em função de sua presença e concentração no alimento (ovo). Os resultados deste estudo são apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14.** Efeito de diversos íons metálicos nas constantes de ligação ( $K_b$ ) e número de sítios de ligação ( $n$ ) no processo de interação entre a ovalbumina e as três tetraciclinas.

Composto	Competidor	$K_b$ ( $\times 10^4$ L mol <sup>-1</sup> )	$n$	$r$
TC	Sem competidor	0,17 ± 0,03	0,80 ± 0,06	0,9839
	Ca(II)	0,22 ± 0,04	0,81 ± 0,07	0,9822
	Mg(II)	0,14 ± 0,02	0,77 ± 0,05	0,9880
	Zn(II)	9,20 ± 0,13	1,23 ± 0,03	0,9988
	Cu(II)	2,07 ± 0,22	1,06 ± 0,05	0,9939
	Fe(III)	125 ± 1,0	1,52 ± 0,07	0,9958
OTC	Sem competidor	3,6 ± 0,18	1,13 ± 0,04	0,9967
	Ca(II)	0,51 ± 0,05	0,93 ± 0,04	0,9966
	Mg(II)	0,08 ± 0,02	0,74 ± 0,04	0,9905
	Zn(II)	0,05 ± 0,02	0,66 ± 0,04	0,9929
	Cu(II)	0,17 ± 0,01	0,83 ± 0,03	0,9954
	Fe(III)	0,20 ± 0,01	0,83 ± 0,03	0,9963
CTC	Sem competidor	0,38 ± 0,03	0,94 ± 0,07	0,9883
	Ca(II)	0,19 ± 0,04	0,84 ± 0,02	0,9979
	Mg(II)	0,13 ± 0,02	0,82 ± 0,05	0,9911
	Zn(II)	4,80 ± 0,03	1,19 ± 0,06	0,9941
	Cu(II)	0,11 ± 0,02	0,80 ± 0,04	0,9919
	Fe(III)	4,92 ± 0,31	1,20 ± 0,10	0,9842

Fonte: elaborada pela autora, 2015.

Uma vez que a presença destes íons pode afetar a interação entre a ovalbumina e as tetraciclinas as constantes de ligação ( $K_b$ ) quanto a interação com a ovalbumina foi empregada como parâmetro de resposta na ausência e presença de vários íons. A partir da análise dos resultados (Tabela 14), pôde-se observar que a adição dos íons Ca(II), Zn(II), Cu(II) e Fe(III) aumentaram os valores da constante de ligação ( $K_b$ ) e o valor de  $n$  para a tetraciclina e a ovalbumina. Em contraste, a adição do íon Mg(II) diminuiu a constante ( $K_b$ ) e  $n$ .

Para a oxitetraciclina, a adição dos íons Ca(II), Mg(II), Zn(II), Cu(II) e Fe(III) diminuíram a constante ( $K_b$ ) e o número de sítios ( $n$ ) em comparação com a formação do complexo na ausência dos íons metálicos.

Para clorotetraciclina, a adição dos íons Ca(II), Mg(II) e Cu(II) conduziu a diminuição do valor da constante do complexo ovalbumina-CTC ao comparar com os parâmetros  $K_b$  e  $n$  na ausência destes íons. Por outro lado, a adição dos íons Zn(II) e Fe(III) levaram ao aumento da

constante do complexo. Quando a adição de um íon aumenta a constante de ligação e o número de sítios de ligação, isto pode implicar que a adição deste íon alterou a estrutura da proteína tornando-a mais favorável a interação da proteína com o ligante. Quando ocorre o contrário, a adição do íon resulta na diminuição da constante de ligação e do número de sítios de ligação, indica que houve competição entre o íon e o ligante pelo mesmo sítio de ligação da OVAL (YANG; LI; XU, 2015).

Desta forma, podemos sugerir que para TC os íons Ca(II), Zn(II), Cu(II) e Fe(III) alteraram a estrutura da ovalbumina, havendo uma maior interação da TC com a proteína. Por outro lado, houve competição pelo sítio de ligação da ovalbumina apenas para o íon Mg(II) e a TC. No caso da OTC, houve competição pelo sítio de ligação da proteína entre todos os íons avaliados, diminuindo a ligação da OTC a ovalbumina. Por fim, para CTC, a adição dos íons Ca(II), Mg(II) e Cu(II) provocou competição entre estes íons e a CTC pela proteína, diminuindo o grau de interação entre CTC e a macromolécula. A adição dos íons Zn(II) e Fe(III) alteraram a estrutura da proteína, aumentando a ligação da CTC a ovalbumina.

#### 4.11 Comparações dos resultados obtidos com os valores da literatura

Foi realizada a comparação dos resultados por fluorescência molecular obtidos neste trabalho com os resultados de diversos trabalhos da literatura, e observou-se que os resultados obtidos como constante de ligação ( $K_b$ ), número de sítios de ligação ( $n$ ) e distância entre o ligante e o doador ( $r_0$ ) foram concordantes com a literatura, como descrito na Tabela 16.

**Tabela 15.** Comparação dos resultados obtidos com trabalhos da literatura para tetraciclina.

Condição	pH	Proteína	pI	Trp	T (°C)	$K_b$ ( $10^4 \text{ L M}^{-1}$ )	$n$	$r_0$ (nm)	Referência
Tris.HCl 50 mM e NaCl 100 mM	7,4	HSA	4,7	1	37	5,59	1,20	2,25	Bi, et al (2005)
		BSA	4,9	2	37	6,21	1,08	2,19	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> e Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 200 mM	7,6	HSA	4,7	1	35	0,31	0,97	4,98	Chi e Liu (2011)
		HSA	4,7	1	35	4,20	1,01	3,35	
Tris.HCl 50 mM	7,5	BSA	4,9	2	35	5,22	1,43	3,46	Anand, et al (2011)
		Lisozima	9,3	6	35	5,56	1,17	3,08	
Tris.HCl 10 mM	8,0	BSA	4,9	2	25	460	3,6	-	Khan, et al (2002)
Tris.HCl 50 mM e NaCl 10 mM	7,4	Oval	4,6	3	30	2,74	1,14	3,11	Este trabalho

Fonte: elaborado pela autora, 2015.

A diferenças entre os valores podem ser associadas às diferentes proteínas e as condições reacionais empregadas em cada trabalho. Com exceção do trabalho de Khan e colaboradores (2002) os valores das constantes de ligação ( $K_b$ ) forma na mesma ordem de grandeza.

#### 4.12 Estudos por UV-Vis

A técnica de espectroscopia de absorção UV-Vis pode ser utilizada para explorar alterações na estrutura  $\alpha$ -hélice da proteína, detectar a formação de complexos proteína – ligante, além de poder determinar o mecanismo de *quenching* (WU, et al., 2011; CHI, et al., 2010). Desta forma, para observar possíveis alterações na estrutura da ovalbumina na presença de diferentes tetraciclinas, e a formação de complexos ovalbumina-tetraciclinas realizou-se estudos por UV-Vis. Nestes estudos, avaliou-se o efeito da adição de três tetraciclinas (TC, OTC e CTC) a ovalbumina comercial em três valores de pH (1,5; 4,6 e 7,4). Os resultados estão apresentados nas Figura 21.

Nos estudos por absorção molecular pôde-se observar duas bandas de absorção das proteínas, uma em ~220 nm (não apresentada nas figuras por questões de escala) que representa a estrutura  $\alpha$ -hélice da proteína, e outra banda em 280 nm que representa os aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina. (CHI, et al., 2010).

Alterações no espectro de absorção da proteína podem ser observadas após adição de concentrações crescentes do ligante como aumento da absorvância e deslocamentos. Quando ocorre aumento progressivo da absorvância ao adicionar-se concentrações crescentes do ligante, é um indicativo de que houve a formação de um complexo proteína-ligante (KHAN, et al., 2012). Para tanto o sinal do complexo formado deve ser diferente (maior ou menor) do que o somatório dos sinais da solução contendo somente a proteína e o ligante, nas mesmas concentrações da mistura. Se o sinal do somatório das soluções isoladas for igual a mistura, seria apenas um efeito aditivo, não evidenciado a formação de um complexo supramolecular.

O estudo por UV-Vis pode dá subsídios para classificação do tipo de *quenching*, sendo que sejam necessários experimentos com variação de temperatura, como os realizados anteriormente. Contudo, os estudos com variação de temperatura, além da possibilidade de indicar o tipo dominante de *quenching* possibilita o cálculo dos parâmetros termodinâmicos, o que permite inferir sobre as forças envolvidas no processo de interação. O *quenching* estático ocorre com a formação do complexo proteína-ligante, resultando em alterações no espectro de absorção molecular da proteína. Em contraste, quando não há alterações no espectro de absorção molecular da proteína após adição do ligante é um indicativo de que o mecanismo de

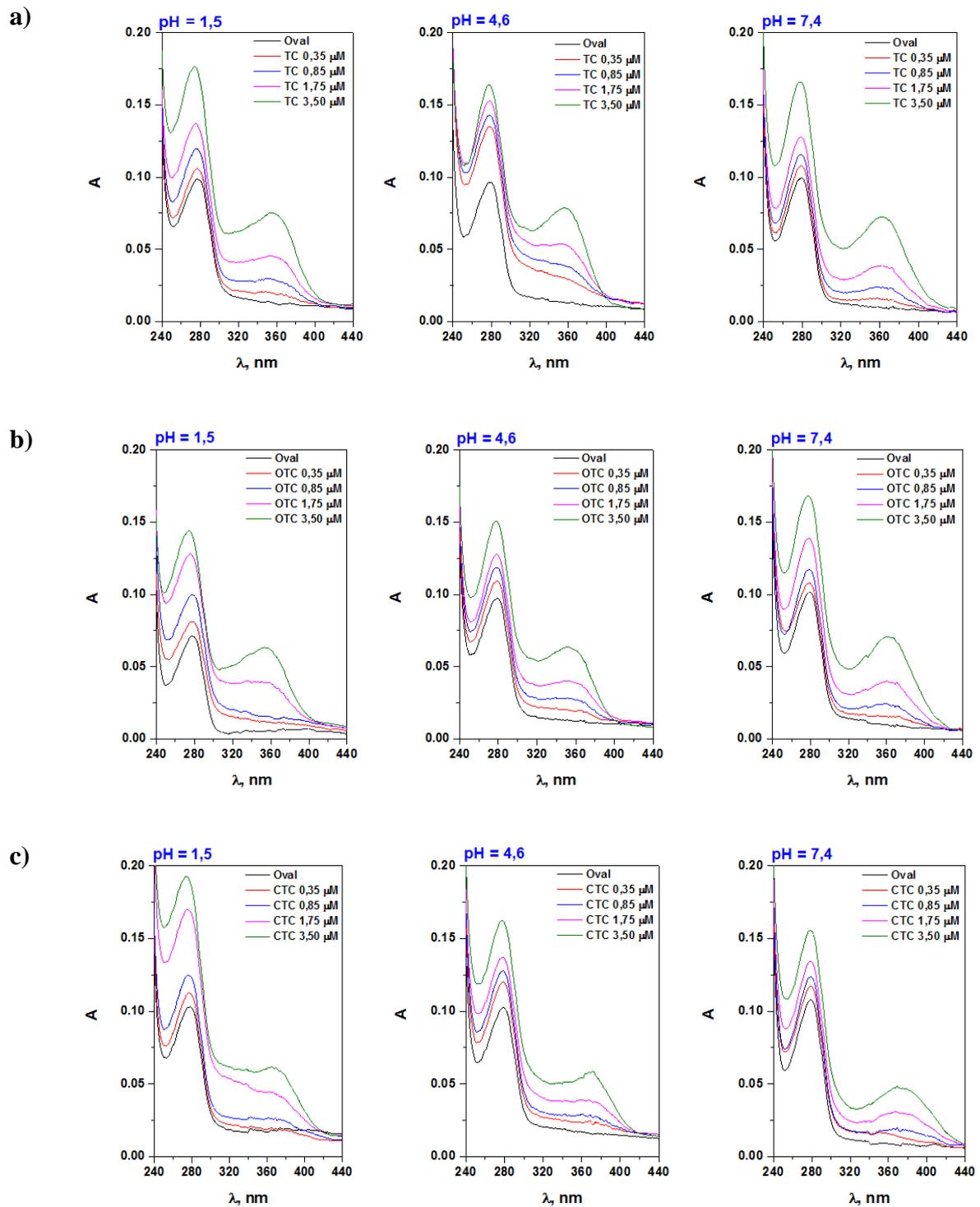
*quenching* é dinâmico, uma vez que o mecanismo de *quenching* dinâmico ocorre através de colisão e transferência de energia entre proteína e ligante, e portanto, não deve alterar o espectro de absorção molecular (TIAN, F., et al., 2010).

O deslocamento do espectro de absorção da proteína em 280 nm para maiores comprimentos de onda (*red shift*) indica que ocorreu alterações no microambiente dos resíduos do aminoácido triptofano, com aumento da hidrofobicidade, efeito contrário é observado quando ocorre deslocamento do espectro de absorção da proteína para menores comprimentos de onda (*blue shift*). Visto que, o triptofano é altamente sensível ao microambiente e a posição do espectro de absorção ( $\lambda_{\max}$ ) depende das propriedades do microambiente dos resíduos deste aminoácido (HU, Y., et al., 2006).

De acordo com os resultados obtidos (Figura 21) podemos observar que a adição de concentrações crescentes das três tetraciclinas (TC, OTC e CTC) resultou no aumento na absorvância da ovalbumina em 280 nm, com aumento simultâneo na absorvância do ligante (TCs) em ~ 374 nm, independente do pH do meio. Estas alterações no espectro de absorção da ovalbumina ocorreram em função da formação de complexos entre a OVAL e as diferentes tetraciclinas (OJHA; DAS, 2010; WU, et al., 2011).

Deslocamento para menores comprimentos de onda da proteína (de 278 para 274 nm) foi observado com a adição de concentrações crescentes das três tetraciclinas (TC, OTC e CTC), e o aumento de pH levou a redução deste deslocamento (de 278 para 277 nm). Possivelmente este comportamento se deu em função da alteração na estrutura da ovalbumina após adição das diferentes tetraciclinas, em virtude do menor grau de enovelada, alterando a polaridade em torno do resíduo de triptofano e tornando o microambiente do resíduo deste mais polar (KATRAHALLI; JALDAPPAGARI; KALANUR, 2010; LU, et al., 2009).

**Figura 21.** Espectros de absorção molecular da ovalbumina ( $3,5 \mu\text{M}$ ) com concentrações crescentes de a) TC, b) OTC e c) CTC.

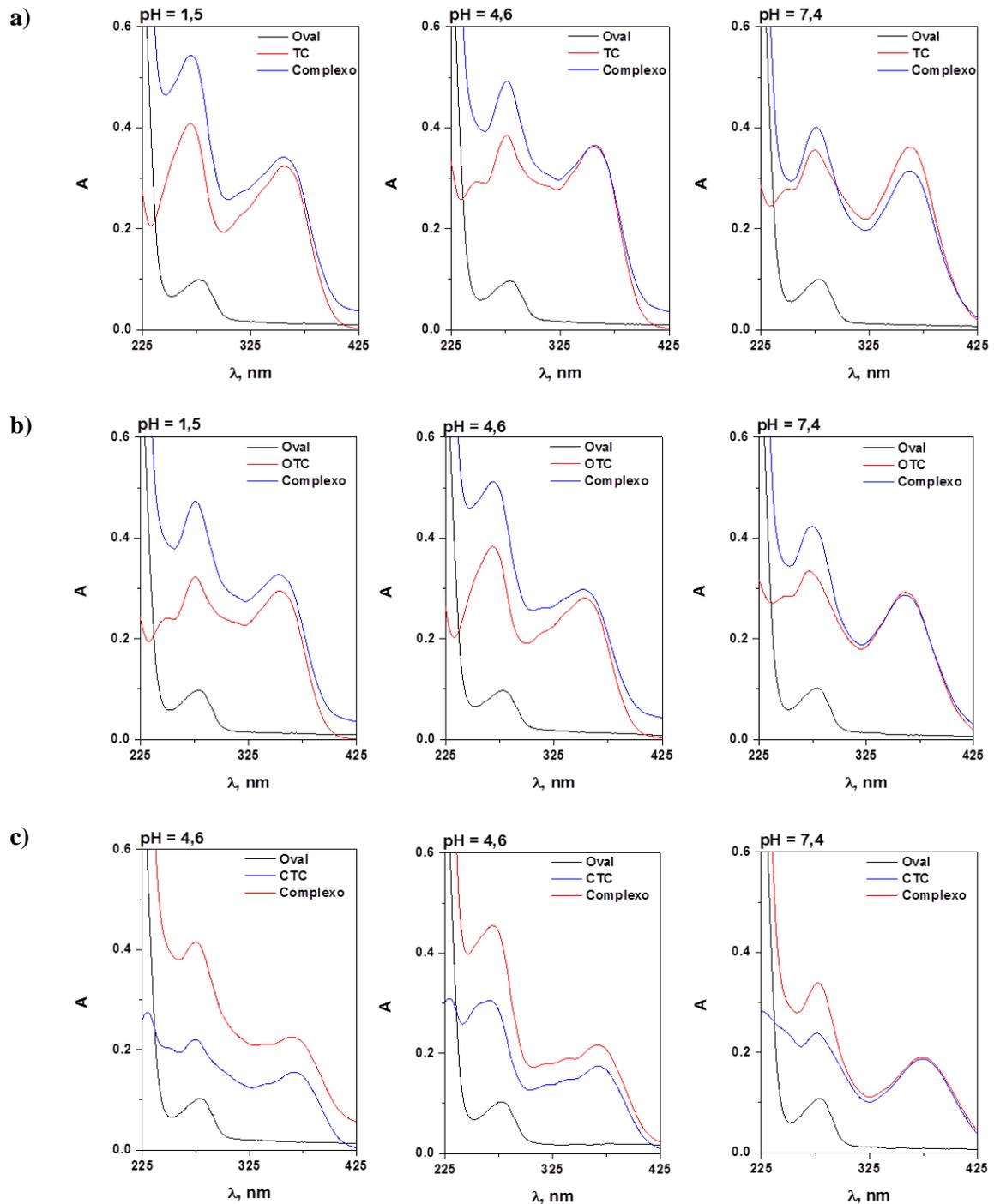


Fonte: elaborado pela autora, 2015.

A fim de avaliar o efeito do pH na interação da ovalbumina em função do tipo de tetraciclina foram realizados experimentos por UV-Vis utilizando a solução da proteína e tetraciclinas puras e a solução da mistura (complexo). Estes resultados são apresentados na

Figura 22 e Tabela 15. Como pode-se ver na Figura 20 com aumento do pH ocorreu diminuição da diferença entre o espectro referente ao complexo e a solução somente da tetraciclina, independente do ligante empregado.

**Figura 22.** Perfil espectral na região do UV-Vis da ovalbumina ( $0,35 \mu\text{M}$ ), tetraciclina ( $17,5 \mu\text{M}$ ) e o complexo formado entre proteína e ligante em diferentes valores de pH. Sendo a) TC; b) OCT e c) CTC.



Fonte: elaborado pela autora, 2015.

A Tabela 16 avalia de forma quantitativa a variação indicada na Figura 22. Como observado a variação calculada  $\Delta A = A_{\text{complexo}} - (A_{\text{proteína}} + A_{\text{tetraciclina}})$  nunca foi zero, indicando que em todos os casos ocorreu a formação do complexo entre proteína-ligante. Este perfil se manteve nos dois comprimentos de onda monitorados. Selecionou-se 277 nm referente a banda original da proteína e ~374 nm (com variações de  $\pm 5$  nm a depender da estrutura do composto) para as tetraciclinas. Em ambos os casos o perfil observado foi similar, conforme apresentado na Tabela 16. Deve ser considerado que a variação deste perfil de interação foi diretamente associada as alterações conformacionais da proteína e da distribuição de cargas das tetraciclinas em função da variação do pH do meio.

Foi verificado que com o aumento do pH e ocorria diminuição da variação da absorvância ( $\Delta A$ ), e por consequência a formação do complexo era desfavorecida (para todas as tetraciclinas avaliadas). Este fato corroborou com os valores das constantes de ligação calculadas por fluorescência, onde as maiores constantes foram obtidas em pH 1,5 e menor quando o pH era 7,4.

**Tabela 16.** Avaliação de parâmetros espectrais relacionadas às medidas espectrofotométricas da ovalbumina (0,35  $\mu\text{M}$ ), tetraciclinas (17,5  $\mu\text{M}$ ) e o complexo formado entre proteína e ligante.

Composto	$\lambda$ (nm)	Sistema	Absorvância (A)		
			pH 1,5	pH 4,6	pH 7,4
TC	277	Oval + TC	0,498	0,480	0,451
		Complexo	0,544	0,493	0,401
		$\Delta A$	<b>+0,046</b>	<b>+0,013</b>	<b>-0,050</b>
	374	Oval + TC	0,336	0,378	0,371
		Complexo	0,342	0,362	0,315
		$\Delta A$	<b>+0,006</b>	<b>-0,016</b>	<b>-0,056</b>
OTC	277	Oval + OTC	0,419	0,470	0,430
		Complexo	0,474	0,512	0,423
		$\Delta A$	<b>+0,055</b>	<b>+0,042</b>	<b>-0,007</b>
	374	Oval + OTC	0,307	0,293	0,301
		Complexo	0,327	0,297	0,287
		$\Delta A$	<b>+0,020</b>	<b>+0,004</b>	<b>-0,014</b>
CTC	277	Oval + CTC	0,319	<b>0,398</b>	0,345
		Complexo	0,415	0,454	0,339
		$\Delta A$	<b>+0,096</b>	<b>+0,056</b>	<b>-0,006</b>
	374	Oval + CTC	0,171	0,192	0,196
		Complexo	0,225	0,216	0,189
		$\Delta A$	<b>+0,054</b>	<b>+0,024</b>	<b>-0,007</b>

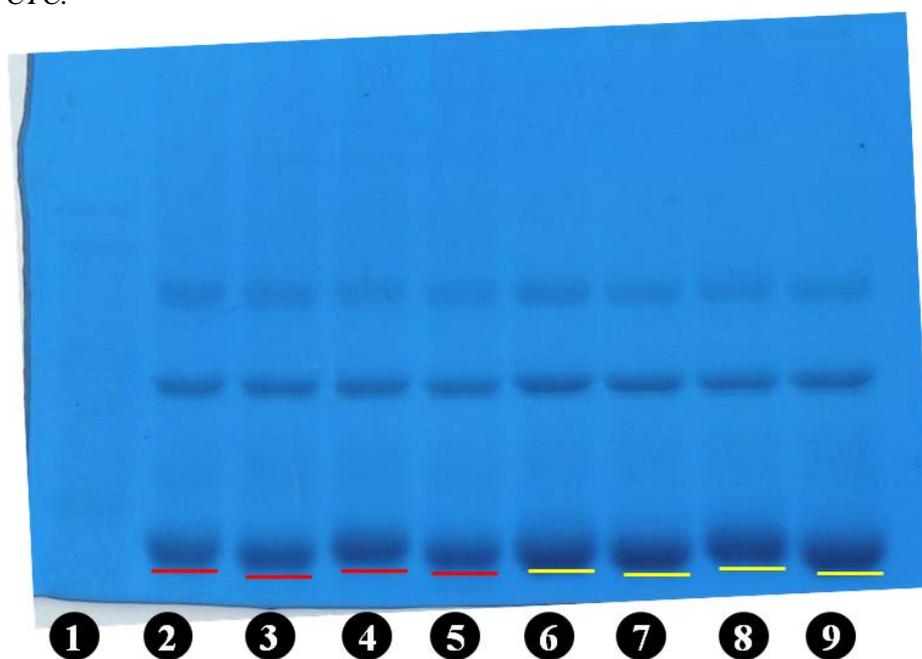
$$\Delta A = A_{\text{complexo}} - (A_{\text{proteína}} + A_{\text{tetraciclina}})$$

Fonte: elaborado pela autora, 2015.

#### 4.13 Native-PAGE e SDS-PAGE

Para avaliar o efeito da migração eletroforética da proteína do ovo comercial e *in natura* na ausência e na presença de diferentes tetraciclinas realizou-se estudos por eletroforese em gel de poliacrilamida (Native-PAGE e SDS-PAGE). Neste estudo, avaliou-se o efeito da adição de três tetraciclinas (TC, OTC e CTC) (9,0 mM, excesso de 500 vezes) em relação a ovalbumina comercial e *in natura* (18 µM), no valor de pH fixo (pH = 7,4). Os resultados para este estudo estão apresentados nas Figuras 23 e 24.

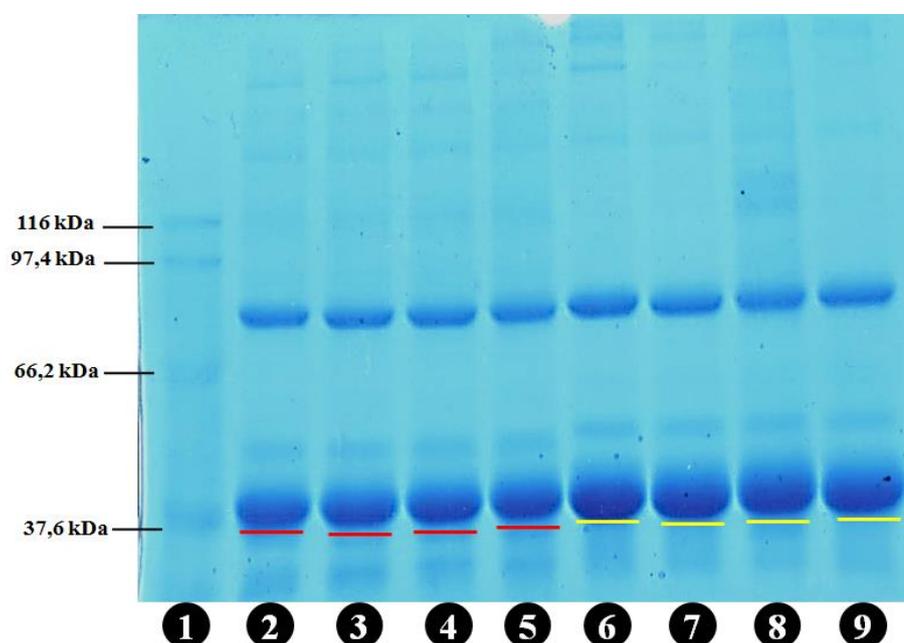
**Figura 23.** Efeito da adição das tetraciclinas (TC, OTC e CTC) a ovalbumina comercial e *in natura* na mobilidade eletroforética por Native-PAGE. 1) marcador molecular, 2) ovalbumina comercial, 3) ovalbumina comercial + TC, 4) ovalbumina comercial + OTC, 5) ovalbumina comercial + CTC, 6) ovalbumina *in natura*, 7) ovalbumina *in natura* + TC, 8) ovalbumina *in natura* + OTC e 9) ovalbumina *in natura* + CTC.



Fonte: elaborado pela autora, 2015.

De acordo com os resultados obtidos (Figuras 23 e 24) observou-se que a *native*-PAGE (Figura 23) apresentou três bandas e a SDS-PAGE (Figura 24) apresentou apenas duas bandas. As alterações da ovalbumina após a adição das tetraciclinas (TC e CTC) foram exercidas com o alargamento da banda da proteína, bem como uma maior mobilidade eletroforética da amostra. A adição da OTC provocou alargamento da banda e reduziu a mobilidade eletroforética da ovalbumina.

**Figura 24.** SDS-PAGE efeito da adição das tetraciclinas (TC, OTC e CTC) a OVAL comercial e *in natura* na mobilidade eletroforética da OVAL. 1) marcador molecular, 2) OVAL comercial, 3) OVAL comercial + TC, 4) OVAL comercial + OTC, 5) OVAL comercial + CTC, 6) OVAL *in natura*, 7) OVAL *in natura* + TC, 8) OVAL *in natura* + OTC e 9) OVAL *in natura* + CTC.



Fonte: elaborado pela autora, 2015.

De acordo com Sun & Pan (1999), quando há interação proteína-ligante, a mobilidade eletroforética é alterada, e a migração ocorre de uma forma diferente quando comparada com a proteína na ausência do ligante. Com base nos resultados obtidos (Figura 23) podemos observar que houve maior migração eletroforética ao adicionar TC e CTC a ovalbumina comercial e *in natura*. Possivelmente este comportamento se deve em função da proteína tornar-se mais aniônica ao interagir com a TC e CTC (TRNKOVÁ, et al., 2011). Por outro lado, a adição da OTC conduziu a uma redução na migração eletroforética para ambas as proteínas.

De acordo com os resultados obtidos (Figura 24) podemos observar que a adição das três tetraciclinas (TC e CTC) levou a um aumento na migração eletroforética para ambas proteínas (comercial e *in natura*) em função da interação na superfície alterando a carga global a ovalbumina.

Os resultados dos estudos de eletroforese corroboram com os estudos de fluorescência molecular e espectroscopia UV-Vis realizados neste trabalho, uma vez que confirma a interação entre as tetraciclinas e a ovalbumina. Foram empregadas várias técnicas para avaliar a interação entre as tetraciclinas e a ovalbumina, contudo até o momento não se sabe qual região da molécula de TC (por exemplo) interagiu com a proteína. Para inferir qual a região da molécula

de TC interage com a ovalbumina realizou-se estudos utilizando RMN  $^1\text{H}$ . Neste estudo foram avaliados o deslocamento químico ( $\delta$ ) e tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ).

#### 4.14 Deslocamento químico ( $\delta$ )

Para monitorar as variações dos sinais do ligante (TC) na presença da ovalbumina realizou-se estudos de deslocamento químico ( $\delta$ ) utilizando ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$ . Neste estudo, avaliou-se o efeito da adição da ovalbumina a TC no valor de pH fixo (pH = 7,4). Utilizou-se como padrão de referência interna o trimetilsililpropionato de sódio (TMSP). Os resultados para este estudo estão apresentados nas figuras 25 e 26 e Tabela 17.

**Tabela 17.** Variação dos deslocamentos químicos ( $\delta$ ) para tetraciclina na presença e ausência da ovalbumina em pH 7,4.

$\delta_{1\text{H}}$ , ppm (mult., J (Hz))		$\Delta\delta$
TC pura	TC + OVAL	
7,61 (t) 8,4 Hz	7,62 (t) 9,2 HZ	0,01
7,24 (d) 7,6 Hz	7,25 (d) 8,31 Hz	0,01
7,02 (d) 9,3 Hz	7,03 (d) 9,1 Hz	0,01
3,85 (s)	3,84 (sl)	0,01
3,10 (dd)	3,12 (dd)	0,02
2,95 (s)	2,94 (s)	0,01
2,77 (dd)	2,78 (dd)	0,01
1,66 (s)	1,67 (s)	0,01

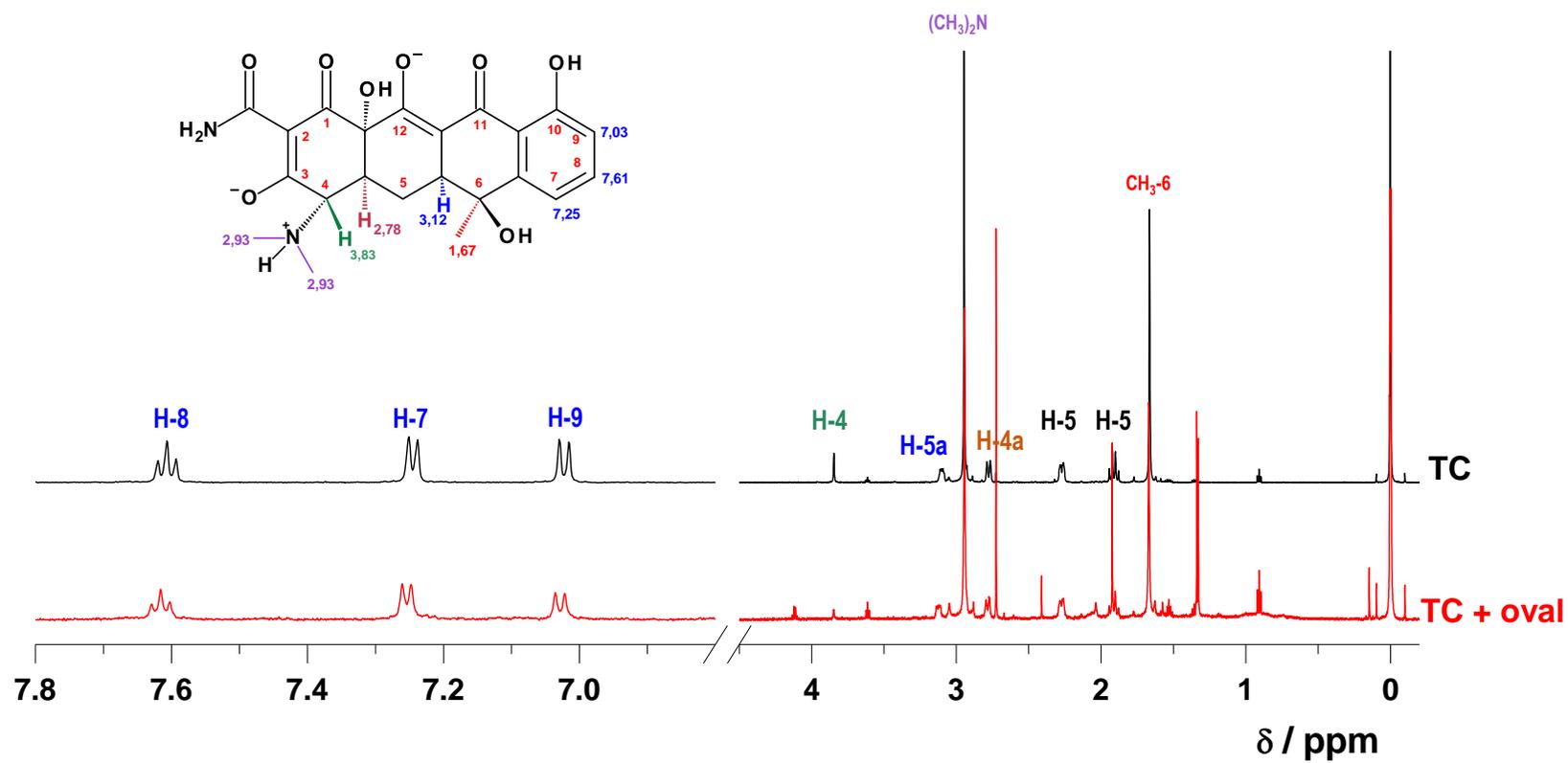
Referência:TMSP

Fonte: elaborado pela autora, 2015.

A partir dos resultados obtidos (Figura 25) observou-se o espectro de RMN  $^1\text{H}$  da tetraciclina na ausência e na presença da ovalbumina, onde foi realizada a atribuição dos sinais para todos os hidrogênios da TC. Observou-se que o espectro da TC na ausência da ovalbumina não apresentou deslocamentos ou alterações. Na presença de ovalbumina os sinais da TC apresentaram alargamento e variação no deslocamento químico para todos os hidrogênios como pode ser visualizado nas ampliações dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  da TC na ausência e na presença da ovalbumina (Figura 26). Estas alterações foram provocadas pela interação intermolecular entre a TC e a OVAL. Uma vez que, o deslocamento químico é um parâmetro determinado pelo campo magnético local, está associado aos elétrons que circundam o núcleo, e o campo frequentemente se opõe ao campo externo aplicado. O deslocamento dos sinais da TC na presença da ovalbumina sugeriu que o campo magnético efetivo da TC diminuiu após a interação com a proteína (ZHOU, et al., 2012). Para avaliar quantitativamente a interação entre

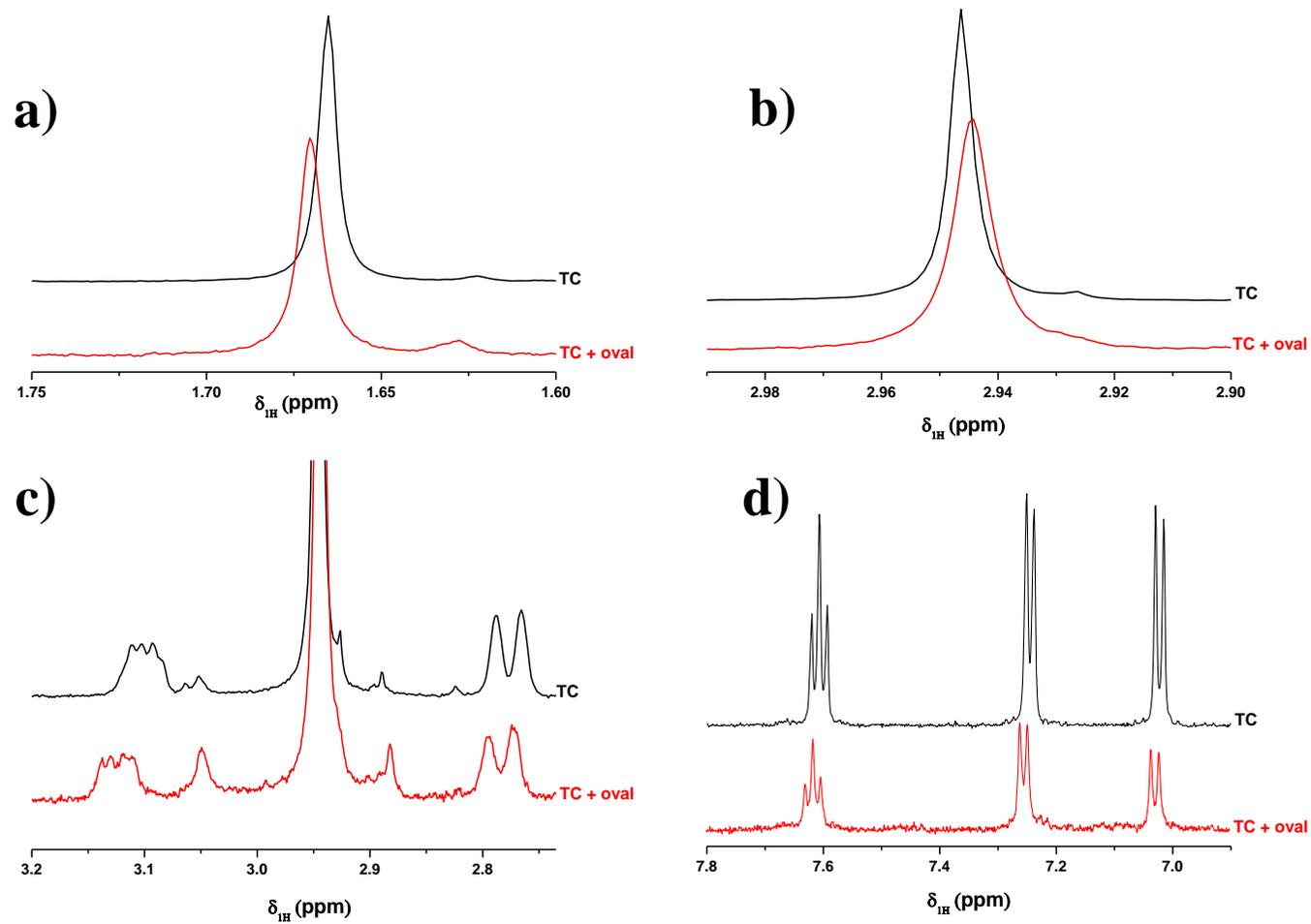
a TC e a OVAL calculou-se os valores dos deslocamentos químicos para todos os hidrogênios da TC na ausência e na presença da OVAL, (Tabela 17), e através destes resultados verificou-se que a variação nos deslocamentos químicos dos hidrogênios da TC foram de 0,01 a 0,02, indicando que todos os hidrogênios da molécula de TC foram deslocados ao interagir com a ovalbumina.

**Figura 25.** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) para tetraciclina na presença e ausência da ovalbumina em pH 7,4.



Fonte: elaborado pela autora, 2015.

**Figura 26.** Expansão de diferentes regiões (a, b, c e d) dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) para TC na presença e ausência da ovalbumina em pH 7,4.



Fonte: elaborado pela autora, 2015.

#### 4.15 Tempos de relaxação longitudinal ( $T_1$ )

Para avaliar qual região da molécula de tetraciclina está interagindo com a ovalbumina realizou-se estudos de tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ). Calculou-se os valores de ( $T_1$ ) para todos os hidrogênios da TC na ausência e na presença da OVAL. Os resultados para este estudo estão apresentados na Tabela 18.

**Tabela 18.** Tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) para tetraciclina na presença e ausência da ovalbumina em pH 7,4.

$\delta_{1H}$ (ppm)	$T_1$ (s)	
	Tetraciclina	TC + OVAL
7,61 (H-8)	1,45	1,52
7,25 (H-7)	0,86	0,84
7,03 (H-9)	2,60	2,32
3,83 (H-4)	0,63	0,78
2,12 (H-5a)	0,83	0,72
2,94 (NCH <sub>3</sub> )	0,56	0,54
2,78 (H-4a)	0,69	0,59
1,67 (CH <sub>3</sub> -6)	0,27	0,26

Fonte: elaborado pela autora, 2015.

A partir dos resultados obtidos (Tabela 18) observou-se que os valores de  $T_1$  para os hidrogênios (H-8 e H-4) da tetraciclina foram aumentados na presença da ovalbumina, enquanto que os valores de  $T_1$  para os hidrogênios e grupos (H-7, H-9, H-5a, NCH<sub>3</sub>, H-4a e CH<sub>3</sub>-6) da molécula de TC tiveram os valores de  $T_1$  diminuídos após adição de TC quando comparados com hidrogênios da TC na ausência da OVAL. Estes resultados indicam que a região dos hidrogênios e grupos (H-7, H-9, H-5a, NCH<sub>3</sub>, H-4a e CH<sub>3</sub>-6) da molécula de TC preferencialmente interagiu com a OVAL (BOJKO, et al., 2009; WANG, Y., et al., 2013). Como as macromoléculas relaxam rapidamente devido a sua alta massa molecular, espera-se que os hidrogênios do ligante que mais se aproximam da ovalbumina tenham seu tempo de relaxação ( $T_1$ ) diminuído.

## 5 CONCLUSÕES

Com relação à avaliação da interação entre a ovalbumina (comercial e *in natura*) e as tetraciclinas (TC, OTC e CTC) em diferentes condições de pH e temperatura, as técnicas espectroscópicas utilizadas (UV-Vis e fluorescência molecular) mostraram-se eficientes, uma vez que permitiram avaliar o tipo de *quenching*, as constantes de ligação quanto à força da interação do complexo formado entre a proteína e as tetraciclinas estudadas, além de dados termodinâmicos e distâncias intermoleculares.

As constantes relativas à formação dos complexos intermoleculares entre a ovalbumina e as tetraciclinas estudadas apresentaram os seguintes valores de  $K_b$  para a TC variaram de 2,11 a  $25,8 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ , para a OTC variaram de 3,96 a  $58,4 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ , e por fim para a CTC variaram de 2,45 a  $32,4 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ . Onde observou-se que para os três valores de pH avaliados (1,5; 4,6 e 7,4) a magnitude da interação seguiu a seguinte ordem: TC < CTC < OTC. O número de sítios de ligação em todas as condições foi próximo à unidade. O mecanismo de interação foi estudado e os dados experimentais demonstraram que o processo de interação entre a ovalbumina e as tetraciclinas (TC, OTC e CTC) ocorreu através de *quenching* estático com formação de complexos não-fluorescentes. Os dados termodinâmicos calculados indicaram que as interações ocorrem espontaneamente ( $\Delta G^\circ < 0$ ), e as forças de ligação predominantes são ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals e interações eletrostáticas, a depender do valor de pH do meio.

A partir dos estudos por fluorescência sincronizada observou-se que não houve deslocamento do máximo de emissão para o resíduo de tirosina nos valores de pH 1,5 e 4,6; independente da molécula avaliada frente a ovalbumina. Contudo, em pH 7,4 ocorreu deslocamento do máximo de emissão da proteína (de 1 a 4 nm) para todas as tetraciclinas avaliadas, assim como, para ovalbumina comercial e *in natura*. Com relação aos resíduos de triptofano foram observados deslocamentos de 1 a 2 nm quanto ao máximo de emissão da proteína, em todos os valores de pH.

Através dos estudos por fluorescência 3D observou-se que houve redução na intensidade de fluorescência dos picos 2 e 3 para as proteínas comercial e *in natura* independente da tetraciclina adicionada. Para a TC os picos 2 e 3 da proteína comercial apresentou redução da intensidade do sinal correspondente a 59,6 e 77,9%, respectivamente. Para a ovalbumina *in natura* os picos 2 e 3 apresentaram uma redução de 53,2 e 65,2%, respectivamente. Para a OTC foi observada redução dos picos 2 e 3 da ovalbumina comercial de 65,7 e 71,9%, respectivamente. Para a ovalbumina *in natura* observou-se redução da fluorescência de 62,7 e 69,8%, para os picos 2 e 3 respectivamente. A adição de CTC levou a

redução da fluorescência dos picos 2 e 3 da ovalbumina comercial correspondente a 69,5 e 76,5%, respectivamente. Para a ovalbumina *in natura* os picos 2 e 3 apresentaram redução de 61,9 e 68,3%, respectivamente. Estes resultados indicam que ocorreu interação entre as três tetraciclinas avaliadas (TC, OTC e CTC) e a ovalbumina de diferentes origens (comercial e *in natura*).

Através de estudos por transferência de energia não-radioativa (FRET) foi possível calcular as distâncias intermoleculares entre a ovalbumina e as três tetraciclinas estudadas em diferentes condições de pH. Os valores das distâncias  $r_0$  entre as tetraciclinas TC, OTC e CTC e os resíduos de triptofanos da ovalbumina variaram de 2,95 a 3,52 nm, estes resultados foi inferior a 10 nm e desta forma, indicaram que houve transferência de energia não-radioativa entre as tetraciclinas avaliadas neste trabalho e a ovalbumina independente do pH.

Com os estudos de competição observou-se que a interação entre TC e OVAL foi aumentada com a adição dos íons Ca(II), Zn(II), Cu(II) e Fe(III). Houve competição pelo sítio de ligação da ovalbumina apenas para o íon Mg(II) e a TC. Para a OTC, houve competição pelo sítio de ligação da proteína entre todos os íons avaliados. Por fim, para CTC, a adição dos íons Ca(II), Mg(II) e Cu(II) provocou competição entre estes íons e a CTC pela proteína. A adição dos íons Zn(II) e Fe(III) aumentaram a ligação entre a CTC e a ovalbumina.

Com base nos resultados dos estudos por UV-Vis verificou-se que houve a formação de complexos entre a OVAL e as diferentes tetraciclinas avaliadas neste trabalho, independente do pH do meio.

A partir dos estudos por eletroforese em gel de poliacrilamida foi possível avaliar o efeito da interação entre ovalbumina e as tetraciclinas através do perfil de migração eletroforética, onde a TC e CTC alteraram de forma mais significativa o perfil de migração relativa à banda da ovalbumina.

Por fim, através dos estudos de variação de deslocamento químico ( $\delta$ ) por RMN  $^1\text{H}$  foi possível verificar que houve variação e alargamento para todos os hidrogênios da molécula de tetraciclina ao interagir com a ovalbumina. E através dos estudos utilizando tempo de relaxação ( $T_1$ ) observou-se que os tempos de relaxação da tetraciclina foram diminuídos na presença da ovalbumina. Estes resultados indicaram que ocorreu interação entre a tetraciclina e ovalbumina.

Através dos estudos realizados neste trabalho concluiu-se que houve interação entre as três tetraciclinas (TC, OTC e CTC) avaliadas e a ovalbumina (comercial e *in natura*) independente do pH e da temperatura do meio. E dentre as tetraciclinas estudadas a oxitetraciclina foi a que apresentou maior interação com a ovalbumina quando comparada com a tetraciclina e clorotetraciclina.

## 5.1 Perspectivas futuras

Abaixo estão apresentadas algumas perspectivas futuras para este trabalho:

- i)* Avaliar a interação entre a oxitetraciclina e clorotetraciclina com a ovalbumina utilizando RMN  $^1\text{H}$ ;
- ii)* Avaliar a interação entre as tetraciclinas estudadas e a ovalbumina por dicroísmo circular;
- iii)* Realizar estudos empregando modelagem molecular para avaliar a interação entre as tetraciclinas avaliadas e a ovalbumina.

## REFERÊNCIAS

- ALBANI, J.R. **Principles and applications of fluorescence spectroscopy**. Estados Unidos: Blackwell Publishing, 2007.
- ALBERTS, et al. **Biologia molecular da célula**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- ALFREDSSON, G., et al. Simple and rapid screening and confirmation of tetracyclines in honey and egg by a dipstick test and LC-MS/MS. **Analytica chemical acta**, Holanda, v.529, p.47-51, Jan., 2005.
- ALLISON, et al. Computational design of protein-small molecule interfaces. **Journal of structural biology**, Estados Unidos, v.185, p.193–202, Fev., 2014.
- ANAND, U., et al. Exploring the mechanism of fluorescence quenching in proteins induced by tetracycline. **The journal of physical chemistry B**, Estados Unidos, v.115, p.6312–6320, Abr., 2011.
- AO, J., et al. Interaction mechanisms between organic UV filters and bovine serum albumin as determined by comprehensive spectroscopy exploration and molecular docking. **Chemosphere**, Reino Unido, v.119, p.590–600, Jan., 2015.
- BABIĆ, S., et al. Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. **Trends in analytical chemistry**, Holanda, v.26, n.11, p.1043-1061, Dez., 2007.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.
- BHATT, V.K.; JEE, R.D. Micro-ionization acidity constants for tetracyclines from fluorescence measurements. **Analytica chimica acta**, Holanda, v.167, p.233-240, 1985.
- BHATTACHARYA, M.; MUKHOPADHYAY, S. Structural and dynamical insights into the molten-globule form of ovalbumin. **Journal of physical chemistry B**, Estados Unidos, v.116, p.520-531, Jan., 2012.
- BI, S., et al. Investigation on the interactions of clenbuterol to bovine serum albumin and lysozyme by molecular fluorescence technique. **Spectrochimica acta part A: molecular and biomolecular spectroscopy**, Holanda, v.120, p.456–461, Fev., 2014.
- BI, S., et al. Molecular spectroscopic study on the interaction of tetracyclines with serum albumins. **Spectrochimica acta part A**, Inglaterra, v.61, p.629–636, Fev., 2005.
- BOGIALLI, S. et al. A rapid confirmatory method for analyzing tetracycline antibiotics in bovine, swine, and poultry muscle tissues: matrix solid-phase dispersion with heated water as extractant followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of agriculture and food chemistry**, Estados Unidos, v.54, n.5, p.1564–1570, Jul., 2006.
- BOJKO, B., et al. Investigations of acetaminophen binding to bovine serum albumin in the presence of fatty acid: fluorescence and <sup>1</sup>H NMR studies. **Journal of molecular structure**, Holanda, v.924–926, p.332–337, Jan., 2009.

- CARUSO, I.P., et al. Exploring the binding mechanism of Guaijaverin to human serum albumin: fluorescence spectroscopy and computational approach. **Spectrochimica acta part A: molecular and biomolecular spectroscopy**, Inglaterra, v.97, p.449–455, Nov., 2012.
- CHANG, R. **Físico-química para as ciências químicas e biológicas**. 3.ed. São Paulo: McGraw-Hill, 2009, v.2.
- CHI, Z., et al. Toxic interaction mechanism between oxytetracycline and bovine hemoglobin. **Journal of Hazardous Materials**, Holanda, v.180, p.741–747, Ago., 2010.
- CHI, Z.; LIU, R. Phenotypic characterization of the binding of tetracycline to human serum albumin. **Biomacromolecules**, Estados Unidos, v.12, p.203–209, Jan., 2011.
- Commission Regulation (EU) n° 37/2010 of 22 December (2009). On pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin, Official Journal, L 15, p. 1, 2010.
- COUTO, C. M. C. M.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M.; REIS, S. Complexação da tetraciclina, da oxitetraciclina e da clortetraciclina com o catião cobre (II). Estudo potenciométrico. **Química Nova**, São Paulo, SP, v.23, n.4, p.457-460, Jul./Ago., 2000.
- COX, M.M.; DOUDNA, J.A.; O'DONNELL, M. **Biologia molecular: princípios e técnicas**. Porto Alegre: Artmed, 2012.
- CROGUENNEC, T. et al. Interfacial properties of heat-treated ovalbumin. **Journal of colloid and interface science**, Estados Unidos, v.315, p. 627–636, Jul., 2007.
- DE RICCO, R., et al. NMR investigations of metal interactions with unstructured soluble protein domains. **Coordination chemistry reviews**, Holanda, v.269, n.15, p.1–12, Jun., 2014.
- DONG, C.; MA, S.; LIU, Y. Studies of the interaction between demeclocycline and human serum albumin by multi-spectroscopic and molecular docking methods. **Spectrochimica acta part A: molecular and biomolecular spectroscopy**, Inglaterra, v.103, n.15, p.79–186, Fev., 2013.
- DORRAJI, M.S.S.; AZAR, V.P.; RASOULIFARD, M.H. Interaction between deferiprone and human serum albumin: Multi-spectroscopic, electrochemical and molecular docking methods. **European journal of pharmaceutical sciences**, Estados Unidos, v.64, n.20, P.9–17, Nov., 2014.
- Estrutura cristalina da ovalbumina disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1UHG>>, acesso em: 27 de dezembro de 2014.
- FAO/WHO (2013). Residue evaluation Of certain Veterinary drugs. 78<sup>th</sup> meeting 2013 of the Joint FAO/WHO expert committee on food additives. FAO JECFA Monographs 15.
- FIGUEIREDO, I.M.; MARSAIOLI, A.J. Mapeamento das interações proteína-ligante através de técnicas de RMN de <sup>1</sup>H utilizando detecção do ligante. **Química nova**, São Paulo, SP, v.30, n.7, p.1597-1605, Ago., 2007.

- FU, L., et al. Characterization of the interactions of human serum albumin (HSA), gatifloxacin, and metronidazole using spectroscopic and electrochemical methods. **Journal of luminescence**, Inglaterra, v.149, p.208–214, Jan., 2014.
- GE, F., et al. Study on the interaction between theasinesin and human serum albumin by fluorescence spectroscopy. **Journal of luminescence**, Inglaterra, v.130, p.168–173, Jan., 2010.
- GUO, X., et al. A spectroscopic study on the interaction between p-nitrophenol and bovine serum albumin. **Journal of luminescence**, Inglaterra, v.149, p.353–360, Maio, 2014.
- HALDER, U.C., et al. Tryptophan dynamics in the exploration of micro-conformational changes of refolded b-lactoglobulin after thermal exposure: a steady state and time-resolved fluorescence approach. **Journal of photochemistry and photobiology B: biology**, Holanda, v.109, p. 50–57, Abr., 2012.
- HALL, N., et al. **Neoquímica**. A química moderna e suas aplicações. Porto Alegre: Bookman, 2004.
- HELD, et al. Mechanisms of Protein-Ligand Association and Its Modulation by Protein Mutations. **Biophysical journal**, Estados Unidos, v.100, n.3, p.701-719, Fev., 2011.
- HOUSAINDOKHT, M. R., et al. Investigation of the behavior of HSA upon binding to amlodipine and propranolol: Spectroscopic and molecular modeling approaches. **Spectrochimica acta part A**, Holanda, v.85, p.79– 84, Jan., 2012.
- 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.
- HU, Y., et al. Spectroscopic studies on the interaction between methylene blue and bovine serum albumin. **Journal of photochemistry and photobiology A: chemistry**, Reino Unido, v.179, p.324–329, Set., 2006.
- HUNTINGTON, J.A.; STEIN, P. E. Structure and properties of ovalbumin. **Journal of chromatography B**, Holanda, v.756, n.25, p.189–198, Maio, 2001.
- JAMESON, D.M. **Introduction to fluorescence**. New York: CRC Press, 2014.
- JIMÉNEZ-SAIZ, R., et al. In vitro digestibility and allergenicity of emulsified hen egg. **Food research international**, Malásia, v.48, p.404–409, Out., 2012.
- JIN, L., et al.  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  bind tetracycline with distinct stoichiometries and linked deprotonation. **Biophysical chemistry**, Holanda, v.128, p.185–196, Jul., 2007.
- KABOUDIN, B., et al. The fluorescence spectroscopic studies on the interaction of novel aminophosphinic acids with bovine serum albumin. **Journal of luminescence**, Inglaterra, v.139, p.104–112, Jul., 2013.
- KAMILYA, T.; PAL, P.; TALAPATRA, G. B. Interaction of ovalbumin with phospholipids Langmuir-Blodgett film. **Journal of physical chemistry B**, Estados Unidos, v.111, p.1199-1205, Jan., 2007.

KANDAGAL, P.B., et al. Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: Spectroscopic approach. **Journal of pharmaceutical and biomedical Analysis**, Holanda, v.41, p.393–399, Maio, 2006.

KANG, D., et al. pH-induced structural changes of ovalbumin studied by 2D correlation IR spectroscopy. **Journal of molecular structure**, Holanda, v.1069, p.299–304, Jul., 2014.

KATRAHALLI, U.; JALDAPPAGARI, S.; KALANUR, S.S. Probing the binding of fluoxetine hydrochloride to human serum albumin by multispectroscopic techniques. **Spectrochimica acta part A**, Holanda, v.75, p.314–319, Jan., 2010.

KESWANI, N.; KISHORE, N. Calorimetric and spectroscopic studies on the interaction of anticancer drug mitoxantrone with human serum albumin. **Journal chemistry thermodynamics**, Estados Unidos, v.43, p.1406–1413, Set., 2011.

KHAN, A.B., et al. Interaction of amphiphilic drugs with human and bovine serum albumins. **Spectrochimica acta part A: molecular and biomolecular spectroscopy**, Holanda, v.97, p.119–124, Nov., 2012.

Khan, M. A. Muzammila, S.; Musarrat, J. Differential binding of tetracyclines with serum albumin and induced structural alterations in drug-bound protein. **International Journal of biological Macromolecules**, Holanda, v.30, p.243–249, Out., 2002.

KULSHRESTHA, P.; GIESE, R. F.; AGA, D.S. Investigating the Molecular Interactions of Oxytetracycline in Clay and Organic Matter: Insights on Factors Affecting Its Mobility in Soil. **Environmental science & technology**, Estados Unidos, v.38, n.15, p.4097–4105, Jun., 2004.

KUMARAN, R.; RAMAMURTHY, P. Photophysical studies on the interaction of amides with bovine serum albumin (BSA) in aqueous solution: fluorescence quenching and protein unfolding. **Journal of luminescence**, Inglaterra, v.148, p.277–284, Abr., 2014.

LAKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3.ed. Baltimore: Springer, 2006.

LEESON, L.J.; KRUEGER, J.E.; NASH, R.A. Concerning the second and third acidity constants tetracycline antibiotics. **Tetrahedron letters**, Reino Unido, v.4, n.18, p.1155–1160, 1963.

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

LI, X. et al. Study of interaction between human serum albumin and three antioxidants: ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol, and proanthocyanidins. **European journal of medicinal chemistry**, Itália, v.70, p.22–36, Dez., 2013.

LI, Z., et al. Adsorption of tetracycline on kaolinite with pH-dependent surface charges. **Journal of Colloid and Interface Science**, Estados Unidos, v.351, p.254–260, Nov., 2010.

LIU, Y., et al. High-performance liquid chromatography using pressurized liquid extraction for the determination of seven tetracyclines in egg, fish and shrimp. **Journal of chromatography B**, Holanda, v.917–918, p.11–17, Fev., 2013.

- LODISH, H., et al. **Biologia celular e molecular**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- LU, Y., et al. Interaction of quercetin with ovalbumin: spectroscopic and molecular modeling studies. **Journal of luminescence**, Inglaterra, v.129, p.1048–1054, 2009.
- MADRAKIAN, T., et al. Spectroscopic and molecular docking techniques study of the interaction between oxymetholone and human serum albumin. **Journal of luminescence**, Inglaterra, v.155, p. 218–225, Nov., 2014.
- MARTIN, S.R. Equilibrium and kinetic studies on the interaction of tetracyclines with calcium and magnesium. **Biophysical chemistry**, Holanda, v.10, p.319-326, Nov., 1979.
- MEHRANFAR, et al. Spectrofluorometric and molecular docking study on the interaction of bisdemethoxycurcumin with bovine  $\beta$ -casein nanoparticles. **Journal of luminescence**, Inglaterra, v.143, p.687–692, Nov., 2013.
- MEYER, B.; PETERS, T. NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors. **Angewandte chemie international edition**, Reino Unido, v.42, P.864 – 890, Fev., 2003.
- MIRANDA, J.M.; Rodríguez, J.A.; Galán-Vidal, C.A. Simultaneous determination of tetracyclines in poultry muscle by capillary zone electrophoresis. **Journal of chromatography A**, Holanda, v.1216, p.3366–3371, Abr., 2009
- MOLINA-BOLÍVAR, J. A., et al. Spectroscopic investigation on the interaction of maslinic acid with bovine serum albumin. **Journal of luminescence**, Inglaterra, v.156, p.141–149, Dez., 2014.
- MORAES, C.S. et al. **Métodos experimentais no estudo de proteínas**. Rio de Janeiro: Instituto Osvaldo Cruz, 2013.
- MOREIRA, M. B., et al. Investigação da supressão de fluorescência de soro albumina bovina e humana por complexo de rutênio. **Química nova**, São Paulo, v.XY, p.1-6, Dez., 2014.
- NAKAI, S.; KASON, C. M. A fluorescence study of the interactions between  $\kappa$ - and  $\alpha_{s1}$ -casein and between lysozyme and ovalbumin. **Biochimica et biophysica acta**, Holanda, v.351, p.21-27, 1974.
- NASERI, A., et al. Interaction of norfloxacin with bovine serum albumin studied by different spectrometric methods; displacement studies, molecular modeling and chemometrics approaches. **Journal of luminescence**, Inglaterra, v.157, p.104–112, Jan., 2015.
- NAVEENRAJ, S., et al. Interaction between toxic azo dye C.I. Acid Red 88 and serum albumins. **Journal of luminescence**, Inglaterra, v.143, p.715–722, Nov., 2013.
- NEBOT, C., et al. Monitoring the presence of residues of tetracyclines in baby food samples by HPLC-MS/MS. **Food control**, Holanda, v.46, p.495-501, Dez., 2014.
- NEELAM, S., et al. Interaction studies of coumaroyltyramine with human serum albumin and its biological importance. **Journal of physical chemistry B**, Estados Unidos, v.114, p.3005–3012, Jan., 2010.

NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 5ed, São Paulo: Sarvier, 2011.

NIU, F., et al. Phase separation behavior and structural analysis of ovalbumin-gum arabic complex coacervation. **Food hydrocolloids**, Holanda, v.43, p.1-7, Jan., 2015.

OJHA, B.; DAS, G. The Interaction of 5-(Alkoxy)naphthalen-1-amine with bovine serum albumin and its effect on the conformation of protein. **Journal of physical chemistry B**, Estados Unidos, v.114, p.3979–3986, Fev., 2010.

PADAYACHEE, E.R.; WHITELEY, C.G. Spectrofluorimetric analysis of the interaction of amyloid peptides with neuronal nitric oxide synthase: Implications in Alzheimer's disease. **Biochimica et biophysica acta**, Holanda, v.1810, p.1136–1140, Dez., 2011.

PAROLO, M. E., et al. Adsorption and circular dichroism of tetracycline on sodium and calcium-montmorillonites. **Colloids and surfaces A: physicochem. eng. aspects**, Holanda, v.417, p. 57– 64, Jan., 2013.

PHILIPPI, S.T. **Pirâmide dos alimentos: Fundamentos básicos da nutrição**. Barueri: Manole, 2008.

PIEHLER, J. New methodologies for measuring protein interactions *in vivo* and *in vitro*. **Current opinion in structural biology**, Reino Unido, v.15, p.4–14, Fev., 2005.

QIANG, Z.; ADAMS, C. Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. **Water research**, Reino Unido, v.38, P.2874–2890, Jul., 2004.

RANJBAR, 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**, v.2013, p.4-13, Set., 2013.

RIVERA-UTRILLA, J. et al. Tetracycline removal from water by adsorption/bioadsorption on activated carbons and sludge-derived adsorbents. **Journal of environmental management**, Estados Unidos, v.131, p.16-24, Dez., 2013.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia**. São Paulo: Editorial Premier, 1997.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L.S.G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-Vis. **Química nova**, São Paulo, Sp, v.27, n.5 p.807-812, Out., 2004.

ROJAS, E.E.G., et al. Hydrophobic interaction adsorption of hen egg white proteins albumin, conalbumin, and lysozyme. **Journal of chromatography B**, Holanda, v.840, p.85–93, Ago., 2006.

ROUESSAC, F.; ROUESSAC, A. **Chemical analysis modern instrumentation methods and techniques**. 2.ed. France:Wiley, 2007.

ROY, A.S., et al. The influence of common metal ions on the interactions of the isoflavone genistein with bovine serum albumin. **Spectrochimica acta part A: molecular and biomolecular spectroscopy**, Inglaterra, v.102, p.393–402, Jan., 2013.

ROY, V.K.; KUMAR, N.S.; GURUSUBRAMANIAN, G. Proteins – structure, properties and their separation by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. **Science Vision**, v.12, p.1-12, 2012.

SALENTIN, S., et al. Polypharmacology rescored: Protein-ligand interaction profiles for remote binding site similarity assessment. **Progress in biophysics and molecular biology**, v.116, Reino Unido, p.174-186, Nov.-Dez., 2014.

SANLI, S.; SANLI, N.; ALSANCAKB, N. Determination of protonation constants of some tetracycline antibiotics by potentiometry and LC methods in water and acetonitrile-water binary mixtures. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, SP, v.20, n.5, p.939-946, 2009.

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

SHALABY, A.R., et al. Validation of HPLC method for determination of tetracycline residues in chicken meat and liver. **Food chemistry**, Reino Unido, v.124, p.1660–1666, Fev., 2011.

SHARMA; ANANDAKUMAR; ILANCHELIA. A combined spectroscopic and molecular docking study on site selective binding interaction of Toluidine blue O with human and bovine serum albumins. **Journal of luminescence**, v.151, p.206–218, Fev., 2014.

SHI, J., et al. Characterization of interaction between isoliquiritigenin and bovine serum albumin: Spectroscopic and molecular docking methods. **Journal of Luminescence**, Inglaterra, v.145, p.643–650, Jan., 2014.

SHU, Y., et al. Interaction of erucic acid with bovine serum albumin using a multi-spectroscopic method and molecular docking technique. **Food chemistry**, Reino Unido, v.173, p.31–37, Abr., 2015.

SILVA, E.P.; SOUZA, J.R.; CALDAS, E.D. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. **Química nova**, São Paulo, SP, v.37, n.1, p.111-122, Set., 2014.

SITHOLE, B. B.; GUY, R. D. Models for tetracycline in aquatic environments: I. interaction with bentonite clay systems. **Water, air, and soil pollution**, Holanda, 32, p.303-314, Out., 1987.

SKOOG, et al. **Fundamentos de química analítica**. 8.ed. São Paulo: Cengage Learning, 2006.

SOTOMAYOR, M.D.P.T., et al. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. **Química nova**, São Paulo, SP, v.31, n.7, p.1755-1774, Set., 2008.

SOUSA, F.F.O., et al. NMR techniques in drug delivery: Application to zein protein complexes. **International journal of pharmaceuticals**, Holanda, v.439, p.41–48, Dez., 2012.

STEPHENS, C. K., et al. Acidity constants of the tetracycline antibiotics. **Journal of the american chemical society**, Estados Unidos, v.78, p.4155–4158, Fev., 1956.

SUN, F., et al. Micro-environmental influences on the fluorescence of tryptophan. **Spectrochimica acta part A**, Inglaterra, v.76, p.142–145, maio, 2010.

SUN, Y., et al. Interactions between 4-(2-dimethylaminoethoxy)-N-octadecyl-1,8-naphthalimide and serum albumins: Investigation by spectroscopic approach. **Journal of luminescence**, Inglaterra, v.132, p.879–886, Abr., 2012.

TAI, S., et al. Spectroscopic studies on the interactions of bovine serum albumin with alkyl sulfate gemini surfactants. **Colloids and surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, Holanda, v.441, p.532–538, Jan., 2014.

TIAN, F., et al. Synthesis of a novel hydrazone derivative and biophysical studies of its interactions with bovine serum albumin by spectroscopic, electrochemical, and molecular docking methods. **Journal of physical chemistry B**, Estados Unidos, v.114, p.14842–14853, Set., 2010.

TIAN, Z., et al. Spectroscopic study on the interaction between mononaphthalimide spermidine (MINS) and bovine serum albumin (BSA). **Journal of photochemistry and photobiology B: biology**, Holanda, v.142, p.103–109, Jan., 2015.

TRNKOVÁ, L., et al. Study on the interaction of catechins with human serum albumin using spectroscopic and electrophoretic techniques. **Journal of molecular structure**, Holanda, v.985, p. 243–250, Jan., 2011.

V. K. BHATT, V. K.; JEE, R. D. Micro-ionization acidity constants for tetracyclines from fluorescence measurements. **Analytica chimica acta**, Holanda, v.167, p.233-240, 1985.

VALEUR, B. **Molecular fluorescence principles and applications**. Germany: Wiley-VCH, 2001.

VENÂNCIO, et al. Medida Rápida e Simultânea dos Tempos de Relaxação Longitudinal e Transversal por RMN-CWFP. São Carlos: Comunicado Técnico 66, **Embrapa instrumentação agropecuária**, p.1-6, 2005.

WANG, H., et al. Oxidation of tetracycline antibiotics induced by Fe (III) ions without light irradiation. **Chemosphere**, Reino Unido, v.119, p.1255–1261, Jan., 2015.

WANG, Q., et al. Study on the interaction characteristics of cefamandole with bovine serum albumin by spectroscopic technique. **Spectrochimica acta part A: molecular and biomolecular spectroscopy**, v.136, p. 321–326, Fev., 2015.

WANG, R. et al. Comparative study of the binding of pepsin to four alkaloids by spectrofluorimetry. **Spectrochimica acta part A: molecular and biomolecular spectroscopy**, Holanda, v.108, p.62–74, Maio, 2013.

WANG, R., et al. Study on the interaction between bovine serum albumin and 4-azido-2-deoxyfluoroarabinocytidine or analogs by spectroscopy and molecular modeling.

**Spectrochimica acta part A: molecular and biomolecular spectroscopy**, Inglaterra, v.132, p.786–794, Nov., 2014.

WANG, X., et al. Spectroscopic investigation on the food components–drug interaction: The influence of flavonoids on the affinity of nifedipine to human serum albumin. **Food and chemical toxicology**, Reino Unido, v.78, p.42–51, Fev., 2015.

WANG, Y., et al. Synthesis and binding with BSA of a new gemini surfactant. **Colloids and surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, Holanda, v.436, p.1159–1169, Set., 2013

WEIJERS, M., et al. Rheology and structure of ovalbumin gels at low pH and low ionic strength. **Food hydrocolloids**, Holanda, v.16, p.269-276, Maio, 2002.

WILLIAMSON, M. P. Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding. **Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy**, 73, p.1–16, 2013.

WU, X., et al. Spectroscopic and molecular modeling evidence of clozapine binding to human serum albumin at subdomain IIA. **Spectrochimica acta part A**, Holanda, v.79, p.1202–1209, Abr., 2011.

XIAO, J., et al. Analysis of binding interaction between puerarin and bovine serum albumin by multi-spectroscopic method. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, Holanda, v.45, p. 609–615, Out., 2007.

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.

XU, T., et al. Multiple spectroscopic studies on the interaction between olaquinox, a feed additive, and bovine serum albumin. **Food and chemical toxicology**, Reino Unido, v.50, p.2540–2546, Jul., 2012.

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**, Holanda, v.1084, p.229–235, Mar., 2015.

YU, X., et al. Study on the interaction between carbonyl-fused N-confused porphyrin and bovine serum albumin by spectroscopic techniques. **Spectrochimica acta part A: molecular and biomolecular spectroscopy**, Inglaterra, v.133, p.372–377, 2014.

YUE, Y., et al. Interaction of nobiletin with human serum albumin studied using optical spectroscopy and molecular modeling methods. **Journal of luminescence**, Inglaterra, v.128, p.513–520, Mar., 2008.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA; C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos Métodos existentes. **Química nova**, São Paulo, SP, v.21, n.6, p.787-793, Jun., 1998.

ZHANG, G., et al. Multispectroscopic studies on the interaction of maltol, a food additive, with bovine serum albumin. **Food chemistry**, Reino Unido, v.133, p.264–270, Jul., 2012.

ZHANG, G., et al. Study of the interaction between icariin and human serum albumin by fluorescence spectroscopy. **Journal of molecular structure**, Holanda, v.881, p.132–138, Jun., 2008.

ZHANG, Y., et al. Interaction of malachite green with bovine serum albumin: determination of the binding mechanism and binding site by spectroscopic methods. **Journal of hazardous materials**, Holanda, v.163, p.1345–1352, Abr., 2009.

ZHANG, Y., et al. Studies of the interaction between sudan I and bovine serum albumin by spectroscopic methods. **Journal of molecular structure**, Holanda, v.888, p.152–159, Out., 2008.

ZHANG, Y., et al. Interactions of Chromium (III) and Chromium (VI) with Bovine Serum Albumin Studied by UV Spectroscopy, Circular Dichroism, and Fluorimetry. **Biological trace element research**, Estados Unidos, v.130, p.172–184, Ago., 2009.

ZHOU, N.; LIANG, Y.Z.; WANG, P. Characterization of the interaction between furosemide and bovine serum albumin. **Journal of molecular structure**, Holanda, v.872, p.190–196, Jan., 2008.

ZHOU, Q., et al. Analysis of tetracyclines in chicken tissues and dung using LC e MS coupled with ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis. **Food control**, Holanda, v.46, p.324–331, Dez., 2014.

ZHOU, X., et al. NMR, multi-spectroscopic and molecular modeling approach to investigate the complexes between C.I. Acid Orange 7 and human serum albumin in vitro. **Dyes and Pigments**, Holanda, v.92p.1100-1107, Mar., 2012.